

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

VI Seminario di aggiornamento

**Epatite da virus HCV e nuovi virus
potenzialmente epatitici: diagnosi,
epidemiologia, prevenzione e terapia**

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 27-28 novembre 2003**

Atti a cura di Maria Rapicetta
Laboratorio di Virologia

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
03/29**

Istituto Superiore di Sanità

VI Seminario di aggiornamento. Epatite da virus HCV e nuovi virus potenzialmente epatitici: diagnosi, epidemiologia, prevenzione e terapia. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 27-28 novembre 2003.

Atti a cura di Maria Rapicetta

2003, iii, 139 p. Rapporti ISTISAN 03/29 (in italiano e inglese)

Il Seminario affronta gli aspetti virologici e patogenetici che hanno suscitato negli ultimi anni maggiore interesse nel campo dell'infezione da HCV, in particolare in relazione agli studi sull'agente virale, sulle sue caratteristiche genomiche e 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

VI Updating Seminar. HCV hepatitis virus and new putative hepatitis viruses: diagnosis, epidemiology, prevention and therapy. Istituto Superiore di Sanità. Rome, November 27-28, 2003.

Proceedings edited by Maria Rapicetta

2003, iii, 139 p. Rapporti ISTISAN 03/29 (in Italian and 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 achievement on new viruses potentially related to hepatitis infections is 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 Anna Tobelli e Giulia Cecere per la collaborazione tecnica prestata per la realizzazione del presente rapporto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: rapicett@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2003 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Introduzione <i>Maria Rapicetta</i>	1
PRIMA SESSIONE EZIOLOGIA E PATOGENESI	
Moderatori: <i>M. Rapicetta, A. Zanetti</i>	3
New and emerging viruses <i>Jean Pier Allain</i>	5
Nuovi farmaci antivirali <i>Raffaele De Francesco</i>	6
Vaccinazione preventiva e terapeutica <i>Sergio Abrignani</i>	9
TAVOLA ROTONDA. PATOGENESI VIRALE	
Moderatori: <i>A.L. Zignego, F. Piccinino</i>	11
Coinfezione cronica da virus epatitici B e C <i>Giovanni Raimondo, Gaia Caccamo, Teresa Pollicino, Giovanni Squadrito</i>	13
Coinfezione da HCV nel paziente HIV+ <i>Massimo Puoti, Barbara Zanini, Valeria Putzolu, Monica Airoidi, Chiara Baiguera, Katiela Prestini, Maria Giulia Antonini, Paola Pagani, Fabio Zacchi, Giampiero Carosi</i>	19
Crioglobulinemia mista <i>Gabriele Pozzato</i>	26
Virus dell'epatite C e steatosi <i>Francesco Negro</i>	35
TAVOLA ROTONDA. IMMUNOPATOGENESI	
Moderatori: <i>M. Levrero, M. Mondelli</i>	41
Vaccination and immunological memory <i>Antonio Lanzavecchia</i>	43
Risposta immune anti-HCV <i>Carlo Ferrari, Gabriele Missale, Simona Urbani</i>	44
Manifestazioni autoimmuni <i>Francesco B. Bianchi</i>	48
Modelli animali per lo studio della patogenesi delle epatiti B e C <i>Luca Guidotti</i>	52

TAVOLA ROTONDA. MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE E DELLA MALATTIA	
Moderatori: <i>P. Pontisso, M. Chiaramonte</i>	59

Istopatologia dell'epatite C	
<i>Francesco Callea</i>	61

Ruolo dell'ecotomografia	
<i>Luigi Bolondi</i>	62

SECONDA SESSIONE

TRASMISSIONE, STORIA NATURALE E TERAPIA DELL'INFEZIONE DA HCV

Moderatori: <i>E. Villa, A. Attili</i>	65
--	----

La terapia dell'infezione da HCV: consenso, controversie e prospettive	
<i>Alfredo Alberti</i>	67

Epatocarcinoma: eziologia, storia naturale e trattamento	
<i>Massimo Lavarone, Massimo Colombo</i>	70

Liver Unit Networks Association	
<i>Ferruccio Bonino</i>	77

TAVOLA ROTONDA. LA SICUREZZA VIRALE DI SANGUE ED EMODERIVATI

Moderatori: <i>M. Rapicetta, G. Aprili</i>	83
--	----

NAT in routine in Italia: due anni di esperienza	
<i>Claudio Velati</i>	85

Epatite postrasfusionale da HCV: biologia e clinica	
<i>Daniele Prati</i>	92

Allestimento delle preparazioni di riferimento nazionali	
<i>Giulio. Pisani</i>	95

Validazione virale nella produzione di emoderivati	
<i>Anna Rita Ciccaglione, Maria Rapicetta</i>	99

TAVOLA ROTONDA. TRASMISSIONE E STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE DA HCV

Moderatori: <i>A. Zanetti, E. Sagnelli</i>	105
--	-----

Diffusione dell'infezione da HCV oggi	
<i>Alfonso Mele, Andrea Mariano</i>	107

The natural history of chronic hepatitis C	
<i>Antonio Craxì</i>	112

Variabilità virale ed infezione da HCV	
<i>Claudio Argentini, Stefano Dettori, Maria Rapicetta</i>	116

TAVOLA ROTONDA. IL TRAPIANTO DI FEGATO

Moderatori: *G.B. Pinzello, M. Tisone* 121

Il trapianto di fegato in Italia

*Sante Venettoni, Massimo Rossi, Lucia Rizzato,
Francesco Gabbrielli, Alessandro Nanni Costa* 123

Storia naturale dell'epatite C post-trapianto di fegato

Mario Angelico, Paola Piccolo, Daniele Di Paolo, Giuseppe Tisone 131

Cirrosi HCV e trapianto di fegato

Mauro Salizzoni, Paolo Strignano, Bruna Lavezzo 134

INTRODUZIONE

Maria Rapicetta

Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'entusiasmante identificazione del virus dell'Epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) per mezzo di tecniche di biologia molecolare è stato un chiaro esempio delle innumerevoli potenzialità di tale tecnologia. Sulla scia di questo primo successo, il lavoro di virologia molecolare ha successivamente chiarito numerosi aspetti dell'infezione da HCV.

Negli ultimi anni, lo sviluppo di sistemi autonomi di replicazione dell'HCV RNA e il perfezionamento di sistemi di espressione delle proteine di HCV ha fornito un nuovo e importante strumento per lo studio dei meccanismi di replicazione del virus e di inibizione della risposta antivirale innata. Inoltre, ha consentito la valutazione sperimentale di nuovi composti antivirali e delineato alcuni meccanismi di farmaco-resistenza, aprendo la strada a nuove opportunità terapeutiche.

Allo stesso tempo lo studio della variabilità genomica dell'HCV ha in questi ultimi tempi disegnato un complesso scenario in cui l'evoluzione delle quasispecie virali assume un ruolo determinante sia per l'andamento finale dell'infezione che per il trattamento terapeutico. In aggiunta, la molteplicità dei subtipi e genotipi dell'HCV, evidenziata dagli studi di epidemiologia molecolare, si è rivelata un importante marcatore epidemiologico di progressione della malattia e di risposta alla terapia con interferon.

Nel campo della immunopatogenesi studi recenti hanno fornito un'iniziale definizione della qualità delle risposte immunitarie cellulari che possono influenzare la rimozione o la persistenza del virus. Inoltre, sono stati chiariti meccanismi di evasione dell'HCV capaci di inibire in maniera specifica cellule dell'immunità innata. Futuri sviluppi in questa direzione sono auspicabili sia per una maggiore conoscenza dei fenomeni patogenetici che per applicazioni immunoterapeutiche.

Negli ultimi anni, il costante livello di attenzione sulle possibilità di rischio di trasmissione di HCV e altri virus attraverso il sangue e i farmaci emoderivati nonché l'emergenza di virus nuovi ha stimolato un intenso lavoro di standardizzazione di nuove tecnologie per l'identificazione virale e per l'eliminazione di virus nei processi di produzione. La continua crescita tecnologica e il lavoro reciproco delle ditte produttrici e delle autorità regolatorie costituiscono la base per il mantenimento futuro di un livello di sicurezza elevato.

Il VI Seminario di Aggiornamento si propone di affrontare i temi che hanno suscitato negli ultimi anni maggiore interesse nel campo dell'infezione da HCV. Nel corso del Seminario vengono riportati i dati sperimentali e le conoscenze più attuali nei settori della patogenesi, storia naturale ed epidemiologia dell'HCV. Vengono inoltre trattate problematiche relative a nuovi virus potenzialmente correlati ad infezione epatica. Alcuni degli studi presentati sono il risultato di indagini pianificate anche a livello nazionale promosse e coordinate dall'Istituto Superiore di Sanità con la collaborazione delle strutture del Servizio Sanitario Nazionale.

PRIMA SESSIONE

Eziologia e patogenesi

Moderatori: *M. Rapicetta, A. Zanetti*

NEW AND EMERGING VIRUSES

Jean Pier Allain

Department of Haematology, University of Cambridge, UK

The development of new technologies leads to the discovery of new viruses. For each of these new infectious agents relevance to transfusion needs to be assessed. The questions to be answered are transmissibility by transfusion, pathogenicity, prevalence in blood donors, persistence and the availability of screening assays. Since 1995, three new viruses have been identified and extensively studied. GBV-C/HGV, a relatively rare virus with some homology with and epidemiological features of HCV, was thought to be related to post-transfusion hepatitis but was proven to be unrelated to hepatitis and is still in search of a disease. HHV-8 is a major factor in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma and other tumours related to immunodeficiency. HHV-8 transmission by organ transplantation, but not by transfusion, has been demonstrated. TTV is a ubiquitous virus infecting a very high proportion of humans in infancy. No clinical symptoms or pathogenicity is attached to TTV. To date, none of these emerging viruses have been proven relevant to transfusion. For the past two years, West Nile Virus (WNV) became epidemic in North America and has been transmitted by transfusion, causing the death of immunocompromised recipients. WNV being endemic in Europe does not seem to be a threat. The Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) agent appears contained but indicates the fragility of public health systems to prevent the worldwide spread of an emerging infectious agent.

NUOVI FARMACI ANTIVIRALI

Raffaele De Francesco

Dipartimento di Biochimica, Istituto di Ricerca di Biologia Molecolare "P. Angeletti", Pomezia (Roma)

L'infezione con il virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) è uno dei maggiori problemi di salute pubblica. La World Health Organization (WHO) ha recentemente pubblicato una stima globale dell'incidenza di HCV, che suggerisce che il 3% della popolazione mondiale è stato infettato con HCV e che più di 170 milioni di individui sono portatori cronici a rischio di sviluppare epatite cronica, cirrosi e/o cancro del fegato. Le terapie oggi disponibili contro l'epatite C, basate sull'uso di interferone, usato da solo o in combinazione con il farmaco antivirale ribavirina, sono estremamente costose, associate con gravi effetti collaterali, ed efficaci in solo metà dei casi della malattia. Inoltre, non esiste un vaccino in grado di prevenire nuove infezioni. Pertanto, esiste un urgente bisogno di sviluppare nuove terapie che siano più efficaci e meglio tollerate nella maggior parte dei pazienti.

HCV è un virus a RNA di polarità positiva, membro del genere Hepacivirus, che appartiene alla famiglia delle *Flaviviridae*. Sulla base delle sequenze genomiche, HCV può essere a sua volta classificato in 6 principali genotipi. I genotipi 1a, 1b, 2a, 2b, 2c e 3a sono responsabili di più dell'80% delle infezioni presenti nel mondo industrializzato. L'estrema variabilità della sequenza del genoma virale e la conseguente esistenza di forme multiple di questo virus costituisce un problema sia per quel che riguarda lo sviluppo di vaccini che di terapie efficaci.

Ciclo di replicazione di HCV e target molecolari per nuove terapie antivirali

Il ciclo di replicazione virale di HCV è schematicamente riassunto nella Figura 1. La membrana esterna di HCV, o *envelope*, contiene due glicoproteine di origine virale, E1 ed E2. La membrana circonda il nucleocapside, composto a sua volta dalla proteina Core (C) e dal genoma a singolo filamento di RNA, lungo circa 9.6 kb. Le proteine che si ritiene abbiano un ruolo come recettore cellulare del virus HCV includono CD81, il recettore di LDL e il recettore scavenger SRB-I. Tuttavia, la loro funzione durante l'infezione di HCV non è stata ancora chiarita con certezza. In principio, il legame del virus all'epatocita potrebbe essere bloccato con anticorpi neutralizzanti o con antagonisti dei suddetti recettori. La mancanza di saggi di infezione *in vitro* ha però precluso la possibilità di verificare queste ipotesi e ha rallentato le attività di ricerca in queste aree. La mancanza di sistemi per studiare l'infettività del virus in laboratorio ha anche precluso la possibilità di identificare agenti che interferiscano con l'ingresso del virus e inibitori della fusione della membrana del virus con quella della cellula ospite.

Il primo stadio della replicazione virale che può essere riprodotto in laboratorio è la traduzione dell'RNA virale. L'iniziazione della traduzione dell'RNA di HCV è mediato da una sequenza di RNA altamente conservata che funziona da sito di ingresso per il ribosoma (Internal Ribosome Entry Site o IRES). Questa sequenza offre un primo potenziale target per inibire dunque la replicazione del virus. Ad oggi, sono stati descritti numerosi oligonucleotidi antisenso e ribozimi che riconoscono specificamente questa regione dell'RNA virale inibendone l'efficiente traduzione in sistemi *in vitro*. Alcuni di questi agenti stanno venendo utilizzati in studi clinici al fine di verificarne l'efficacia nei pazienti di epatite C.

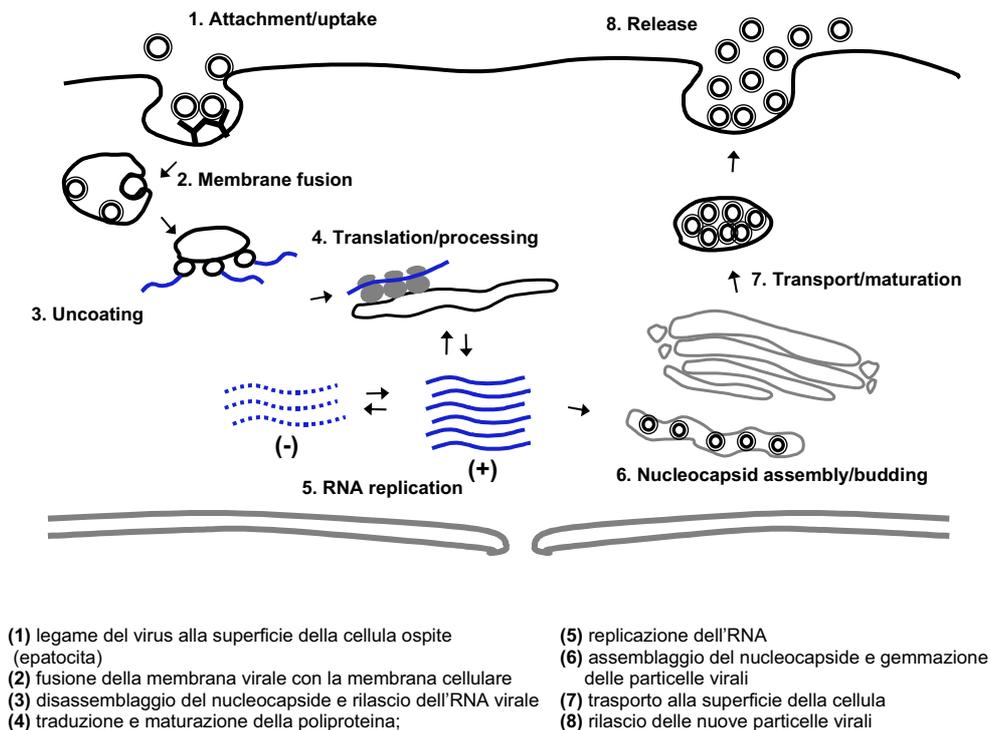


Figura 1. Ciclo di replicazione di HCV con i differenti stadi della replicazione virale

La traduzione dell'RNA genomico virale produce una poliproteina di circa 3000 amminoacidi. La poliproteina è a sua volta soggetta a maturazione proteolitica da parte di una combinazione di proteasi codificate sia da geni cellulari che da geni virali. Il processamento proteolitico della poliproteina da parte di 4 proteasi diverse, 2 virali e due cellulari, ha come risultato la generazione di 10 proteine mature, nell'ordine C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B (Figura 2).

Gli enzimi cellulari peptidasi della sequenza segnale ed SPP (signal peptide peptidase) sono insieme responsabili della maturazione delle proteine strutturali, da C a p7. La proteasi virale NS2/3 è responsabile, mediante un evento autocatalitico, della scissione fra NS2 ed NS3, mentre il complesso NS3-NS4A contiene la proteasi responsabile della generazione delle altre proteine non strutturali. La maturazione proteolitica della poliproteina rappresenta uno step essenziale per la formazione di un complesso in grado di dirigere la replicazione del genoma di HCV e pertanto le due proteasi virali, NS2/3 ed NS3-NS4A, sono target ideali per lo sviluppo di composti antivirali che siano selettivi per HCV. Il complesso di replicazione di HCV contiene probabilmente la maggior parte delle proteine virali non strutturali, da NS3 ad NS5B, insieme con un numero ancora imprecisato di proteine cellulari. Il primo stadio nella replicazione dell'RNA virale è la sintesi di un filamento di RNA complementare all'RNA genomico. L'RNA complementare così generato serve poi da stampo per la sintesi di più RNA genomici che possono venire a loro volta tradotti, replicati o esportati nella particella virale. La attività di RNA elicasi e di RNA polimerasi dipendente da RNA (RdRp), contenute in rispettivamente NS3 ed NS5B, sono le principali componenti enzimatiche dell'apparato molecolare preposto alla replicazione del genoma virale e pertanto esse rappresentano altri potenziali target per l'intervento terapeutico.

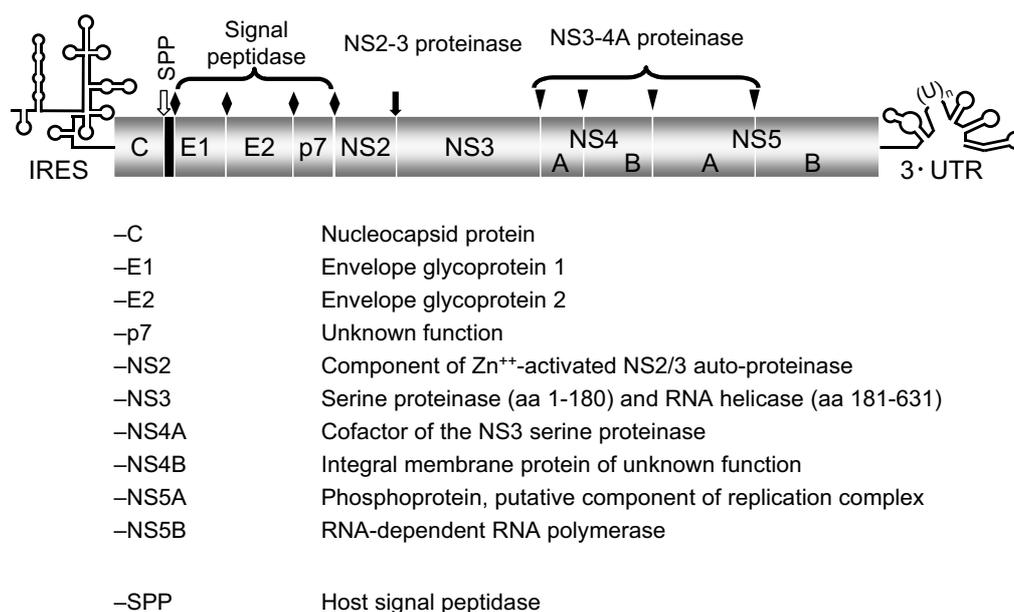


Figura 2. Organizzazione molecolare del genoma di HCV e riassunto degli eventi che portano alla maturazione proteolitica della poliproteina: le frecce indicano i siti di proteolisi da parte delle diverse proteasi cellulari e virali. I rombi nelle regioni E1 ed E2 indicano la glicosilazione delle glicoproteine di membrana

Nel corso degli ultimi anni sono stati descritti numerosi agenti in grado di inibire le attività enzimatiche di questi enzimi in saggi biochimici. Alcuni di tali composti hanno inoltre dimostrato di poter interferire con la replicazione del genoma di HCV in cellule in coltura. In un numero limitato di casi, inibitori delle attività enzimatiche associate con HCV sono diventati l'oggetto di preliminari studi pre-clinici e clinici per verificarne tollerabilità ed efficacia.

Conclusioni

La terapia ideale per i pazienti con epatite C cronica dovrebbe essere altamente efficace, indicata per la maggior parte dei pazienti, priva di effetti collaterali significativi e accessibile ad un costo ragionevole. Alcuni nuovi agenti terapeutici che potranno aumentare le opzioni terapeutiche per l'epatite C sono a diversi stadi di sviluppo pre-clinico e clinico. Questi agenti includono principalmente inibitori dell'IRES (oligonucleotidi antisense e ribozimi) e inibitori delle funzione enzimatiche dell'HCV (proteasi, RNA elicasi e RdRp).

I nuovi agenti antivirali dovranno dimostrare di essere più efficaci e meglio tollerati delle attuali terapie in appropriati studi clinici prima che possano venire usati come farmaci alternativi per la maggior parte dei pazienti di epatite C. Inoltre, come nel caso dell'HIV, terapie che combinino diversi agenti saranno necessarie per prevenire o diminuire l'insorgenza di ceppi virali resistenti. Per tutte queste ragioni, i nuovi agenti antivirali, che sono oggi alle loro prime fasi di sviluppo, non saranno a disposizione dei medici per l'uso clinico generale prima dei prossimi 5-7 anni.

VACCINAZIONE PREVENTIVA E TERAPEUTICA

Sergio Abrignani
Istituto di Ricerche Immunologiche, Siena

Un vaccino contro il virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) non è ancora disponibile e la migliore terapia, l'IFN- α abbinato alla ribavirina, ha un'efficacia inferiore al 50%. Considerato che a livello mondiale sono state stimate circa 200 milioni di infezioni croniche da HCV, esiste la necessità pressante di sviluppare delle strategie di vaccinazione mirate alla prevenzione e possibilmente all'eradicazione dell'infezione da HCV.

In generale, l'HCV tiene testa con molta efficacia al sistema immunitario dell'ospite. Dopo il suo ingresso nell'organismo, l'HCV viene eliminato in modo spontaneo solo in un terzo dei pazienti. Inoltre, solo una minoranza delle infezioni da HCV insorge con una sintomatologia acuta, essendo la maggioranza delle infezioni asintomatica prima di diventare cronica ed essere quindi diagnosticata. Dal punto di vista del sistema immunitario, l'alta percentuale di infezioni croniche da HCV può dipendere dal fatto che il virus sfugga alle risposte immunitarie protettive o dall'inabilità dell'HCV di indurre una risposta immunitaria protettiva. In genere, la protezione (cioè l'immunità) da qualsiasi virus dipende da anticorpi neutralizzanti, e/o da risposte di cellule T CD4+ "helper"/infiammatorie, e/o da risposte di cellule T CD8+ citotossiche. Nonostante la maggior parte delle infezioni da HCV induca delle risposte immunitarie, mancano prove certe di un qualsiasi tipo di immunità indotta dall'infezione naturale.

Non vi è dubbio che un vaccino efficace contro l'HCV apporterebbe dei benefici considerevoli alla sanità pubblica. Se si considera l'alto tasso di infezioni croniche e l'efficacia limitata delle terapie attualmente disponibili, la prevenzione di nuove infezioni sarebbe una strategia conveniente per il controllo della malattia. Nonostante l'incidenza dell'HCV sia diminuita in modo considerevole, vi è circa il 3% della popolazione mondiale infettata in modo cronico. Inoltre, alcune vie di trasmissione, come l'uso di droghe iniettabili, continueranno a rappresentare un notevole rischio di trasmissione nel prossimo futuro.

Per delineare e stimare i problemi relativi allo sviluppo di un vaccino contro l'epatite C, 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, dal 15 al 30% delle infezioni acute da HCV si risolvono spontaneamente, presumibilmente grazie, in parte, 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 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 un vaccino 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.

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 non si replica efficientemente *in*

vitro, quindi le conoscenze sulla particella virale di HCV sono molto limitate. Inoltre, le uniche specie che possono essere infettate dall'HCV sono l'uomo e lo scimpanzé.

Da cosa dovrebbe proteggere un vaccino contro l'HCV?

Un vaccino ideale dovrebbe ovviamente proteggere dall'infezione, dovrebbe cioè indurre un'immunità sterilizzante. In realtà, questa è una meta alquanto ambiziosa nell'era della PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Infatti, anche quando la risposta anticorpale all'antigene S dell'HBV viene analizzata con la PCR come indice dell'eliminazione virale, si evidenzia una protezione dalla malattia ma non dalla presenza di DNA di HBV in una elevata percentuale di casi. Oltre l'immunità sterilizzante, ci sono altre alternative possibili per lo sviluppo di un vaccino contro un virus che nella maggioranza dei casi induce infezione cronica e quindi malattia cronica. Nel caso dell'HCV, in cui l'infezione può solo essere accertata tramite PCR, una meta più realistica potrebbe essere rappresentata dallo sviluppo di vaccini in grado di proteggere dall'infezione cronica. Dopo tutto, l'epatite C acuta non è un problema sanitario grave e la maggior parte di noi sarebbe soddisfatta di avere un vaccino che permetta un'infezione subclinica acuta che si risolva prima della cronicizzazione. Un'altra alternativa comporterebbe l'uso di un vaccino, o di una vaccinoterapia che, benché incapace di eliminare l'infezione in qualsiasi fase, fosse in grado di prevenire l'evoluzione dell'infezione verso la malattia cronica.

Un aspetto critico dell'HCV che deve essere preso in considerazione per qualsiasi strategia di vaccinazione è l'alta mutabilità delle proteine dell'involucro virale (E1/E2). È stato ipotizzato che gli anticorpi neutralizzanti sono indotti nei pazienti affetti da HCV ma non riescono a indurre protezione perché il virus è continuamente in grado di alterare i propri antigeni di superficie. A causa della considerevole variazione dei genotipi e delle sottospecie di HCV, la maggior parte degli anticorpi neutralizzanti indotti a seguito della vaccinazione potrebbero solo proteggere da una successiva infezione con un virus omologo. Se si considera l'alta probabilità con cui nel corso della propria esistenza un soggetto vaccinato verrebbe in contatto con un ceppo eterologo di HCV, si comprende come questi anticorpi risulterebbero di scarsa utilità.

In questa sede si discuterà delle risposte immunitarie protettive contro l'HCV e della possibilità di sviluppare un vaccino contro l'HCV che protegga dalla cronicizzazione dell'infezione piuttosto che un vaccino che induca l'immunità sterilizzante.

Tavola rotonda
Patogenesi virale

Moderatori: *A.L. Zignego, F. Piccinino*

COINFEZIONE CRONICA DA VIRUS EPATITICI B E C

Giovanni Raimondo, Gaia Caccamo, Teresa Pollicino, Giovanni Squadrito
Unità di Epatologia Clinica e Biomolecolare, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Messina

I virus dell'epatite B (Hepatitis B Virus, HBV) e dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) condividono le medesime modalità di trasmissione e ciò rende relativamente frequente le condizioni di coinfezione, soprattutto nelle aree geografiche in cui entrambi i virus sono presenti in modo endemico e tra i soggetti ad alto rischio di infezione parenterale (1-5).

Inoltre la prevalenza della coinfezione HBV/HCV è maggiore di quanto comunemente ritenuto. Molti studi hanno infatti dimostrato che genomi di HBV possono essere presenti anche in pazienti negativi per l'antigene di superficie (HBsAg), e ciò avviene con maggior frequenza nei soggetti affetti da epatite cronica HCV-correlata (6-8).

Questa condizione è comunemente denominata "infezione occulta da HBV". Molte evidenze sperimentali suggeriscono che la coinfezione HBV/HCV possa essere un evento di notevole rilevanza clinica, ma sono ancora sconosciuti molti degli aspetti virologici e clinici che la riguardano.

Benché siano pochi gli studi finora condotti sulle epatiti acute che si verificano in caso di doppia infezione da HBV e HCV, tutti concordano sul fatto che i due virus si influenzano reciprocamente in modo rilevante (9,10). La presente trattazione, comunque, verterà esclusivamente sulle epatopatie croniche HCV-correlate nel caso di una coinfezione "tipica" od "occulta" da HBV.

Infezione da HCV associata ad infezione *tipica* da HBV

In molte aree geografiche, incluso il bacino del Mediterraneo, i pazienti affetti da epatite cronica HBsAg/anti-HCV positiva rappresentano una quota rilevante di tutti i pazienti affetti da epatite cronica (11). Inoltre, numerose evidenze suggeriscono che la doppia infezione da HBV e HCV abbia notevole rilevanza clinica (1, 5, 12, 13). Tuttavia i dati riguardanti i pazienti coinfecti sono al momento insufficienti. Questa lacuna è principalmente dovuta al fatto che la gran parte degli studi clinici finora condotti sulla storia naturale e sul decorso post-trattamento dell'epatite cronica C escludono dall'arruolamento i pazienti HBsAg positivi. Viceversa, i pazienti anti-HCV positivi sono stati esclusi dagli studi condotti sulla epatopatia HBV-correlata.

Dal punto di vista virologico i dati al momento disponibili fanno ipotizzare che, in corso di coinfezione, l'HBV e l'HCV si influenzino reciprocamente nell'attività replicativi. In particolare, numerose osservazioni cliniche hanno rilevato che molti dei pazienti coinfecti presentano livelli bassissimi di viremia HBV e livelli rilevabili di viremia HCV (13-16).

Due diverse considerazioni supportano l'ipotesi che l'interferenza fra i due virus sia più frequentemente caratterizzata dalla inibizione dell'HBV da parte dell'HCV: (1) l'infezione *occulta* da HBV (caratterizzata da bassi livelli replicativi del virus) è altamente prevalente nei pazienti infetti da HCV; (2) studi *in vitro* hanno individuato la proteina core di HCV come responsabile di tale inibizione, ed è stato dimostrato che le serine fosforilate in posizione 99 e 116 sono indispensabili per questa funzione (17, 18). Va tuttavia considerato che la regione core di HCV è una porzione altamente conservata del genoma virale, e ciò in modo del tutto

indipendente dalla contemporanea presenza dell'HBV e dal suo livello di replicazione (19). Pertanto la variabilità del gene core di HCV non può essere ritenuta responsabile della sua influenza sulla replicazione dell'HBV.

In realtà i profili virologici dei pazienti coinfecti sono molteplici. Infatti, sebbene in molti casi si riscontri una attiva replicazione dell'HCV, in alcuni casi il numero di copie genomiche di HBV per ml di siero è superiore a 10^5 , mentre la viremia HCV è a livelli molto bassi. Analogamente, l'attività di replicazione dei due virus sembra essere intensificata in alcuni casi e soppressa in altri (4, 19). In questo quadro non si può escludere che, in corso di doppia infezione HBV/HCV, uno od entrambi i virus possano avere fasi alterne di attivazione e soppressione della loro replicazione.

Il principale limite alla verifica di tale ipotesi è posto dal fatto che i dati attualmente disponibili provengono da studi trasversali e, di conseguenza, non è possibile stabilire se l'attività mostrata da ciascuno dei due virus nel singolo paziente sia l'espressione di una condizione che permane tale a lungo termine, o sia invece solo un evento temporaneo, parte di una complessa cinetica replicativa che si svolge nel corso di anni di infezione cronica. Questo aspetto assume grande rilievo sia in termini di corretta diagnosi che di approccio terapeutico in caso di coinfezione HBV-HCV, e verrà chiarito solo se un numero appropriato di pazienti verrà studiato longitudinalmente, quantificando le due viremie su campioni di siero raccolti nel tempo.

I risultati di numerosi studi hanno evidenziato che la doppia infezione da HBV e HCV è associata ad una epatopatia cronica ad impronta severa e al rischio di sviluppo di epatocarcinoma (HCC). Inoltre, sembra che i pazienti coinfecti abbiano scarse probabilità di risposta al trattamento con interferone (IFN) (20, 21). Dal punto di vista patogenetico, quindi, i due virus sembrano avere una azione sinergica più che antagonistica. In particolare, nei pazienti affetti da epatite cronica HCV-correlata, la coinfezione con HBV è un importante fattore di progressione della fibrosi, e favorisce in tal modo l'instaurarsi della cirrosi epatica (22). Ancor più evidente è l'azione sinergica delle due infezioni nello sviluppo del carcinoma epatico (23, 25). È stato dimostrato infatti che i cirrotici HBsAg/HCV positivi hanno un rischio significativamente più alto di sviluppare HCC rispetto ai soggetti infetti da solo HBV o HCV (26).

La risposta al trattamento con IFN dei pazienti HCV positivi coinfecti con HBV è stata scarsamente studiata (27). Tuttavia, nonostante la loro esiguità, i dati della letteratura indicano in modo univoco che i pazienti con epatite cronica C e positività per HBsAg hanno ridotte probabilità di risposta alla terapia con IFN. I meccanismi alla base di questa ulteriore interferenza negativa sono tuttora sconosciuti e non sono stati oggetto di studi sperimentali.

Da quanto esposto appare evidente la necessità – per questa categoria di pazienti – di disegnare degli studi clinici e terapeutici che includano un numero adeguato di pazienti “stratificati” accuratamente sulla base del loro profilo virologico.

Infezione da HCV associata ad infezione *occulta* da HBV

L'avvento di test molecolari altamente sensibili per l'HBV-DNA ha reso possibile rivelare la presenza di genomi di HBV in un numero considerevole di soggetti HBsAg negativi (28-31). La tecnica di elezione per l'identificazione di questa peculiare forma di infezione (denominata “infezione occulta da HBV”) è la *nested PCR* (reazione polimerasica a catena in due fasi) eseguita su DNA estratto da tessuto epatico.

L'infezione occulta da HBV è di frequente riscontro nei soggetti infetti da HCV, e la più alta prevalenza si registra nella popolazione asiatica (31). In Italia circa un terzo dei pazienti con epatite cronica C sono portatori di tale infezione occulta, il cui aspetto più importante è chiaramente il suo potenziale impatto clinico (8). Come riportato in una recente *review* da Toberson e Thomas (31), la gran parte degli studi sull'argomento segnalano un aumento della frequenza di cirrosi nei pazienti infetti da HBV occulto, soprattutto se coinfecti con HCV. Attualmente non si conosce il meccanismo attraverso cui l'infezione nascosta da HBV produce o contribuisce al danno epatico.

Si può ipotizzare che l'infezione occulta da HBV si riattivi frequentemente. Tali riattivazioni verrebbero abitualmente sopresse dalla risposta immunitaria specifica anti-HBV, mediata dai linfociti T. Verosimilmente tale risposta, pur non essendo da sola in grado di indurre un danno epatico significativo, in presenza di una concausa di epatopatia quale è l'infezione da HCV, potrebbe fungere da cofattore e determinare l'aggravarsi della malattia epatica (30).

Tale ipotesi sembra confermata da uno studio recentemente condotto su marmotte in convalescenza dopo epatite acuta da virus dell'epatite specifico (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV), studio che ha dimostrato come persistano, per tutta la vita dell'animale, piccole quantità di virus che replicano e mantengono una lieve ma costante attività necroinfiammatoria epatica (32).

Considerato che la cirrosi epatica è il principale fattore di rischio per lo sviluppo di HCC, assume grande significato l'osservazione che l'infezione occulta da HBV sia associata all'epatopatia cronica in fase avanzata. In questo contesto va sottolineato che molti studi epidemiologici e molecolari eseguiti sin dagli anni '80 segnalavano che un'infezione persistente da HBV potesse giocare un ruolo critico nel favorire lo sviluppo di HCC anche nei soggetti HBsAg negativi (33-35).

Questo dato è confermato dalle evidenze tratte dai modelli animali che mostrano che, una volta infettati col rispettivo Hepadnavirus, sia la marmotta che lo scoiattolo di terra hanno un aumentato rischio di sviluppare HCC, pur avendo apparentemente eliminato il virus (36, 37).

Dal momento che l'HBV occulto può persistere nel fegato infetto sia in forma integrata che in forma episomale, esso contribuirebbe alla trasformazione epatocellulare attraverso gli stessi meccanismi tradizionalmente considerati alla base delle proprietà tumorigeniche dell'infezione tipica da HBV, vale a dire la potenziale attività pro-oncogenica della proteina X e la capacità del virus integrato di riarrangiare il genoma dell'ospite, come recentemente rivisto da Brechot *et al.* (38).

Secondo numerosi studi, l'infezione occulta da HBV condiziona in senso negativo la risposta alla terapia con IFN nei pazienti affetti da Epatite cronica C (28-31). Inoltre, l'associazione tra infezione criptica da HBV e mancata risposta alla terapia risulta essere indipendente da altri fattori ad un'analisi multivariata (39). È sconosciuto il meccanismo con cui l'HBV occulto *aiuterebbe* l'HCV a resistere alla terapia con IFN. Possiamo ipotizzare che in tali casi, sebbene l'attività dell'HBV sia inibita, i pochi genomi virali presenti negli epatociti siano capaci di interferire con le proteine cellulari ad attività antivirale e facilitino così la replicazione dell'HCV. In questo quadro, va ricordato uno studio recente che mostra una diminuzione della espressione intraepatica dell'mRNA e delle proteine per il recettore dell'IFN in corso di infezione occulta da HBV (40).

Il numero totale di soggetti portatori cronici di HCV con coinfezione tipica od occulta da HBV è rilevante. Considerato che i dati presenti in letteratura supportano l'ipotesi che la doppia infezione da HBV e HCV si associ a forme di epatopatia severa scarsamente sensibili all'IFN e a un alto rischio di sviluppo di HCC, è opportuno che nel futuro l'attenzione dei ricercatori si rivolga maggiormente a questa – fino ad ora – poco studiata categoria di pazienti.

Bibliografia

1. Pontisso P, Ruvoletto MG, Fattovich G, Chemello L, Gallorini A, Ruol A, Alberti A. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis infections. *Gastroenterology* 1993; 105: 1529-33.
2. Sato S, Fujiyama S, Tanaka M., Yamasaki K, Kuramoto I, Kawano S, Sato T, Mizuno K, Nonaka S. Coinfection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 1994;21:159-166.
3. Crespo J, Lozano JL, de la Cruz F, Rodrigo L, Rodriguez M, San Miguel G, rtinano E, Pons-Romero F. Prevalence and significance of hepatitis C viremia in chronic active hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1147-51.
4. Alberti A, Pontisso P, Chemello L, Fattovich G, Benvegnù L, Belussi F, De Mitri MS. The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J Hepatol* 1995;22(Suppl.1):38-41.
5. Zarski J-P, Bohn B, Bastie A, Pawlotsky JM, Baud M, Bost-Bezeaux F, Tran van Nhiew J, Seigneurin JM, Buffet C, Dhumeaux D. Characteristic of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J Hepatol* 1998;28:27-33.
6. Liang TJ, Baruch Y, Ben-Porath E, Enat R, Bassan L, Brown NV, Raimon N, Blum HE, Wands JR. Hepatitis B virus infection in patients with idiopathic liver disease. *Hepatology* 1991; 13: 1044-51.
7. Zhang Y-Y, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, 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.
8. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-6.
9. Mimms LT, Mosley JW, Hollinger FB, Aach RD, Stevens CE, Cunningham M, Vallari DV, Barbosa LH, Nemo GJ. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *Br Med J* 1993;307:1095-7.
10. Sagnelli E, Coppola N, Messina V, Di Caprio D, Marrocco C, Marotta A, Onofrio M, Scolastico C, Filippini P. HBV superinfection in hepatitis C virus chronic carriers, viral interaction, and clinical course. *Hepatology* 2002;36:1285-91.
11. Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, Costantino A, Condili LA, Menniti-Ippolito F, Caroleo B, Costa C, Griffo G, Loiacono L, Pisni V, Foca A, Piazza M. 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.
12. Liaw YF. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995;22:1101-8.
13. Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, Piccinino F. Virological and clinical aspects of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and Delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2000;32:1106-10.
14. Sheen J-S, Liaw Y-F, Chu C-M, Pao CC. Role of hepatitis C virus infection in spontaneous hepatitis B surface antigen clearance during chronic hepatitis B virus infection. *J Infect Dis* 1992;165:831-4.
15. Fong T-L, DiBisceglie AM, Waggoner JG, Banks SM, Hoofnagle JH. The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1991;14:64-7.
16. Raimondo G, Pollicino T, Squadrito G. Clinical virology of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology* 2003; 39:S26-S30.

17. Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen S-Y, Lee Y-HW. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993;67:5823-32.
18. Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YH. Modulation of the *trans*-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Virol* 1995;69:1160-71.
19. Squadrito G, Orlando ME, Pollicino T, Raffa G, Restuccia T, Cacciola I, D Marco V, Picciotto A, Colucci G, Craxi A, Rimondo G. Virological profiles in patients with chronic hepatitis C and overt or occult HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1518-23.
20. Weltman MD, Brotodihardjo A, Crewe EB, Farrel 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 responds poorly to interferon-alpha treatment. *J Viral Hepat* 1995;2:39-45.
21. Mazzella G, Saracco G, Festi D, Rosina F, Marchetto S, Jaboli F, Sostegni R, Pezzoli A, Zzaroni F, Cancellieri C, Montagnani M, Roda E, Pizzetto M. Long-term results with interferon therapy in chronic type B hepatitis: a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2246-50.
22. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S35-S46.
23. Simonetti RG, Cammà C, Fiorello F, Cottone M, Rapicetta M, Marino L, Fiorentino G, Craxi A, Ciccaglione A, Giuseppetti R. Hepatitis C virus infection and a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Ann Intern Med* 1992;116:97-102.
24. 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;74:2442-8.
25. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002;36:S74-S83.
26. 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.
27. Strader DB. Understudied populations with hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S226-S236.
28. Raimondo G, Balsano C, Craxi A, Farinati F, Levrero M, Mondelli M, Pollicino T, Squadrito G, Tiribelli C. Occult hepatitis B virus infection. *Digest and Liver Disease* 2000;32:822-6.
29. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001;34:194-203.
30. Raimondo G. Occult HBV infection and liver disease: fact or fiction? (Editorial) *Journal of Hepatology* 2001;34:471-3.
31. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-86.
32. Michalak TI, Pardoe IU, Coffin CS, Churchill ND, Freake DS, Smith P, Trelegan CL. Occult lifelong persistence of infectious hepatitis B virus and residual liver inflammation in woodchucks convalescent from acute viral hepatitis. *Hepatology* 1999;29:928-38.
33. Shafritz DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, Kew MC. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1981;305:1067-73.
34. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terre S, D'Errico A, Grigioni W, Nalpas B, Franco D, Wands J, Kew M. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1990;323:80-5.

35. Sheu JC, Huang GT, Shih LN, Lee WC, Chou HC, Wang JT, Lee PH, Lai MY, Wang CY, Yang PM. Hepatitis C and B viruses in hepatitis B surface antigen-negative hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1992;103:1322-7.
36. Korba BE, Wells FV, Baldwin B, Cote PJ, Tennant BC, Popper H, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks: presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. *Hepatology* 1989;9:461-70.
37. Marion PL. Ground squirrel hepatitis virus. In: McLachlan A (Ed.). *Molecular biology of Hepatitis B Virus*. London: CRC Press, 1991. p. 39-51.
38. Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular basis for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Seminars in Cancer Biology*, 2000;10: 211-31.
39. De Maria N, Colantoni A, Friedlander L, Leandro G, Idilman R, Harig J, Van Thiel DH. The impact of previous HBV infection on the course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3529-36.
40. Fukuda R, Ishimura N, Hamamoto S, Moritani M, Uchida Y, Ishihara S, *et al.* Co-infection by serologically-silent hepatitis B virus may contribute to poor interferon response in patients with chronic hepatitis C by down regulation of type 1 interferon receptor gene expression in the liver. *J Med Virol* 2001;63:220-7.

COINFEZIONE DA HCV NEL PAZIENTE HIV+

Massimo Puoti, Barbara Zanini, Valeria Putzolu, Monica Airoidi, Chiara Baiguera, Katiela Prestini, Maria Giulia Antonini, Paola Pagani, Fabio Zacchi, Giampiero Carosi
Clinica di Malattie Infettive e Tropicali Università degli Studi di Brescia - AO Spedali Civili, Brescia

Epidemiologia della coinfezione da HCV

Come è ben noto, l'efficienza di trasmissione del virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus HCV) è molto elevata attraverso il sangue e gli emoderivati, mentre è nettamente inferiore per via sessuale e materno infantile. Inoltre l'infezione da HCV cronicizza nel 70-80% dei soggetti infetti. Per questo motivo la prevalenza della coinfezione da HCV è molto elevata tra i soggetti HIV+ con storia di tossicodipendenza od emotrasfusi tra i quali raggiunge percentuali superiori all'80%, mentre è molto meno frequente tra i pazienti con esposizione sessuale, tra i quali la prevalenza della coinfezione è in genere inferiore al 10%.

Impatto della coinfezione da HCV sulla malattia da HIV

L'ipotesi che la coinfezione da HCV acceleri la progressione della malattia da HIV ha due ordini di basi biologiche. Da una parte l'infezione cronica da HCV è associata a una persistente attivazione del sistema immunitario e dei CD4 specifici che ne facilita l'infezione da parte dell'HIV. D'altra parte vi sono diverse evidenze di un'attiva replicazione dell'HCV nei tessuti linfatici (1), nonché nei linfociti CD4 dei soggetti coinfetti (2) ed è stata osservata una correlazione tra infezione da HCV delle cellule mononucleate periferiche e l'apoptosi mediata da Fas (3).

Tuttavia la maggior parte degli studi trasversali, longitudinali prospettici anche in coorti di sieroconvertitori (soggetti in cui è noto o stimato il momento della prima infezione da HIV) condotti in era pre-HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapy) non hanno dimostrato né un più rapido decremento dei CD4 né una più rapida progressione verso l'AIDS né una maggiore mortalità dopo la diagnosi di AIDS nei soggetti con coinfezione da HCV (4-12). Recentemente è stata invece osservata in 2 coorti europee di pazienti HIV+ un ridotto recupero dei CD4 in corso di HAART nei pazienti con coinfezione da HCV (13-14) cui fa riscontro una maggiore morbilità e mortalità correlate all'HIV (13).

Impatto della coinfezione da HIV sull'epatite da HCV

La coinfezione da HIV è associata a livelli di viremia HCV e di HCV RNA intraepatici più elevati (15-17), maggiore frequenza di trasmissione sessuale verticale dell'infezione (15) e più rapida evoluzione della fibrosi verso la cirrosi epatica (15, 18-28) in rapporto al decremento del numero dei linfociti CD4 ovvero della progressione dell'immunodeficit che renderebbe più "fibrogenico" il microambiente epatico (28-29). Questo ha fatto ipotizzare che l'incremento dei CD4 indotto dalla terapia anti HIV potesse rallentare questa accelerata progressione della malattia verso la cirrosi (29).

Trattamento della coinfezione da HCV

Obiettivi del trattamento dell'epatite da HCV

L'obiettivo principale del trattamento dell'epatite da HCV nel paziente con (o senza) coinfezione da HIV è l'eradicazione dell'infezione da HCV, che nel paziente con coinfezione non solo rallenterebbe od arresterebbe la progressione verso l'epatopatia in fase terminale, ma eliminerebbe anche un cofattore di progressione dell'infezione da HIV. Vi sono inoltre altri obiettivi del trattamento dell'infezione da HCV, che non passano per l'eradicazione dell'infezione, ma semplicemente per una attenuazione della conseguente attività necro-infiammatoria:

- il rallentamento della progressione della fibrosi e del conseguente disturbo architetturale accelerati dalla coinfezione da HIV; questo risultato è stato ottenuto in pazienti senza coinfezione da HIV sopprimendo l'attività replicativa dell'HCV pur in assenza di eradicazione;
- la remissione delle riacutizzazioni di epatite cronica C correlate all'immunoricostruzione indotta dalla terapia antiretrovirale, che consentirebbe la prosecuzione di una terapia antiretrovirale "salvavita" senza pagare il prezzo dell'aggravamento dell'epatopatia.

Strumenti terapeutici e risultati conseguibili

Dato che il controllo della progressione dell'infezione da HIV rimane prioritario nei pazienti coinfecti, gli schemi terapeutici impiegati per il trattamento dell'infezione da HCV, non solo devono essere efficaci e ben tollerati, ma non devono accelerare la progressione dell'infezione da HIV (aumentando la replicazione HIV e/o riducendo il *pool* di linfociti CD4+), né ridurre l'efficacia o aumentare la tossicità dei farmaci antiretrovirali, né influenzare negativamente l'aderenza del paziente agli schemi di terapia anti HIV. Queste caratteristiche costituiscono i parametri su cui misurare il rapporto costo-beneficio di qualsiasi schema di terapia anti HCV nei pazienti infetti da HIV.

La coinfezione da HIV è stata considerata un criterio di esclusione in tutti i *trial* controllati mirati a valutare efficacia e tollerabilità della monoterapia con interferone anche peghilato e a compararla con quelle della combinazione con ribavirina.

I dati disponibili dalla letteratura sull'efficacia della terapia anti HCV nei soggetti HIVAb+ derivano da studi pilota non controllati e da studi comparativi, in cui i risultati ottenuti in pazienti anti HIV positivi sono stati confrontati con quelli ottenuti in pazienti anti HIV negativi. Sono in corso diversi studi controllati finalizzati a confrontare, in pazienti con coinfezione da HIV efficacia e tollerabilità di:

- diversi regimi di interferoni alfa ricombinanti in combinazione con ribavirina e/o con amantadina;
- interferoni peghilati vs interferoni non peghilati a somministrazione settimanale in combinazione con ribavirina;
- ribavirina in combinazione con: interferoni peghilati vs interferoni non peghilati.

I risultati degli studi fino ad ora disponibili indicano:

- la scarsissima efficacia della monoterapia con interferoni non peghilati negli studi pubblicati negli ultimi 5 anni che in nessuno studio ha indotto percentuali di risposta sostenuta superiori al 12% (30-35);
- che la combinazione di interferone standard non peghilato più ribavirina è nettamente meno efficace nei pazienti con infezione da HIV rispetto a quanto lo sia nei pazienti anti

HIV sieronegativi (36). Infatti questa terapia è stata in grado di indurre risposta sostenuta solo nel 18% dei 251 pazienti trattati in 5 studi pilota non controllati, con ampie differenze a seconda del genotipo HCV infettante (41% nei soggetti con infezione da genotipo 2 e 3 e 6% nei soggetti con infezione da genotipo 1 o 4) (37-41);

- che secondo i dati preliminari del primo studio pilota non controllato di trattamento con interferone peghilato il 28% dei 68 pazienti arruolati ha mostrato una risposta sostenuta, con importanti differenze tra: pazienti con infezione da genotipo favorevole che hanno mostrato una risposta sostenuta nel 52% dei casi e pazienti con infezione da genotipo sfavorevole che hanno mostrato una risposta nel 22% dei casi (42). In questo studio solo il 15% dei pazienti ha sospeso il trattamento volontariamente o per effetti collaterali.

In due studi ancora in corso mirati a comparare efficacia e tollerabilità interferone peghilato in combinazione con ribavirina *vs*, rispettivamente, interferone peghilato in monoterapia e interferone standard a somministrazione trisettimanale in combinazione con ribavirina la terapia con interferone peghilato e ribavirina è stata sospesa rispettivamente nel 41% e nel 30% dei pazienti per effetti collaterali o per volontà del paziente (43-44). Nell'ultimo studio 57 pazienti su 206 trattati con PEG IFN in combinazione con ribavirina hanno mostrato eventi avversi gravi (43).

Non è stata osservata una perdita di efficacia della terapia antiretrovirale e, in particolare di stavudina e zidovudina, in corso di terapia con ribavirina (45-46).

Sono stati osservati alcuni decessi in pazienti arruolati in studi sulla tollerabilità ed efficacia della terapia con interferone (peghilato e non) e ribavirina. Alcuni di questi sono attribuibili ad acidosi lattica e/o pancreatite insorte in pazienti che assumevano didanosina (47).

Indicazioni al trattamento dell'epatite da HCV nei pazienti anti HIV positivi

Il trattamento della coinfezione da HCV è indicato in pazienti con ipertransaminasemia da almeno 6 mesi, senza altre cause risolvibili di danno epatico, con malattia da HIV stabile con CD4 > 200/mm³ e HIVRNA < 10.000 cp/ml, senza controindicazioni ad alfa interferone e/o ribavirina, che non presentano tossicodipendenza attiva o abuso alcolico.

Nei pazienti con infezione da genotipo favorevole (genotipi 2 e 3), date le buone percentuali di risposta ottenute nei primi studi pubblicati, il trattamento può essere intrapreso in presenza di fibrosi (F1 secondo i sistemi di classificazione Knodell e METAVIR) e attività necroinfiammatoria significativa. Dato che nelle serie di biopsie pubblicate in pazienti con infezione da HIV solo il 5-10% dei pazienti non presenta fibrosi, nei pazienti con infezione da genotipo 2 e 3 che non presentano altre possibili cause di danno epatico la biopsia pre trattamento si può ritenere non indispensabile. Nei pazienti con infezione da genotipo sfavorevole (genotipi 1 e 4), date le basse probabilità di risposta e la scarsa tollerabilità della terapia anti HCV, il trattamento con interferone può essere considerato in presenza di infezione da HCV recente e/o di importante attività infiammatoria, nei pazienti in cui l'istologia bioetica dimostri assenza di setti fibrosi e in tutti i pazienti in cui l'istologia bioetica dimostri presenza di setti fibrosi.

Schede terapeutiche

La terapia va condotta impiegando la combinazione di interferone e di ribavirina alla dose minima di 10,6 mg/kg/die nei soggetti con infezione da genotipo sfavorevole, mentre nei pazienti con infezione da genotipo favorevole può anche essere considerata una dose fissa di 800 mg al giorno di ribavirina in due somministrazioni. Nei pazienti con infezione da genotipo sfavorevole è da preferirsi la terapia con interferoni peghilati alle dosi indicate in precedenza,

mentre non vi sono dati che dimostrino un rapporto costo beneficio sicuramente superiore di questa terapia rispetto alla terapia standard nei pazienti con infezione da genotipo favorevole.

Nei soggetti in terapia con interferoni peghilati che non presentano negativizzazione dell'HCV RNA o riduzione dei suoi livelli di almeno 2 logaritmi dopo 12 settimane di terapia le probabilità di risposta sono estremamente ridotte, per cui se l'obiettivo del trattamento è quello di ottenere una risposta virologica sostenuta la terapia può essere interrotta. La durata ottimale della terapia per i soggetti con infezione da genotipo sfavorevole è di almeno 48 settimane. Non vi sono ancora dati certi se la durata ottimale della terapia nei pazienti con infezione da genotipo favorevole sia di 6 o 12 mesi.

In considerazione della mancanza di dati conclusivi dalla letteratura e dell'elevato numero di questioni ancora aperte sulla tollerabilità ed efficacia del trattamento con interferone e ribavirina in questa categoria di pazienti e sulla potenziale interferenza con la terapia antiretrovirale e l'evoluzione della malattia da HIV, si dovrebbe cercare di trattare i pazienti nell'ambito di studi controllati in maniera tale da poter acquisire in breve tempo il massimo possibile di informazioni per orientare le scelte terapeutiche.

Monitoraggio della tossicità e dell'efficacia della terapia

Nei pazienti in terapia antiretrovirale con didanosina è preferibile sostituire questo con un farmaco alternativo prima di iniziare la terapia con ribavirina. Durante il trattamento dei pazienti che assumono comunque analoghi nucleosidici occorre monitorare con attenzione i livelli di acido lattico, lipasi e amilasi dato il rischio di acidosi lattica e pancreatite. Nei pazienti anti HIV positivi il monitoraggio degli effetti collaterali di interferone e ribavirina deve essere particolarmente attento, specie in coloro che assumono farmaci a tossicità additiva con interferone e ribavirina.

Bibliografia

1. Laskus T, Radkowski M, Wang L-F, Vargas H, Rakela J. The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1998;178:1189-92.
2. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, *et al.* Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocyte/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000;181:442-8.
3. Taya N, Torimoto Y, Shindo M, Hirai K, Hasebe C, Kohgo Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br J Haematol.* 2000;110:89-97.
4. Staples CT Jr, Rimland D, Dudas D. Hepatitis C in the HIV Atlanta V.A. Cohort study (HAVACS): the effect of coinfection on survival. *Clin Infect Dis* 1999;29:150-4.
5. Wright TL, Hollander H, Pu X. Hepatitis C in HIV-infected patients with and without AIDS: prevalence and relationship to survival. *Hepatology* 1994;20:1152-55.
6. Sabin CA, Telfer P, Phillips AN, Bhagani S, Lee CA. The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men. *J Infect Dis* 1997;175:164-8.
7. Dorrucchi M, Pezzotti P, Phillips AN, Cozzi Lepri A, Rezza G for the Italian Seroconversion Study. Coinfection of hepatitis C virus with human immunodeficiency virus and progression to AIDS. *J Infect Dis* 1995;172:1503-8.
8. Llibre JM, Garcia E, Aloy A, Valls J. Hepatitis C virus infection and progression of infection due to human immunodeficiency virus [letter]. *Clin Infect Dis* 1993;16:182.

9. Haydon GH, Flegg PJ, Blair CS, Brettle RP, Burns SM, Hayes PC. The impact of chronic hepatitis C virus infection on HIV disease and progression in intravenous drug users. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10(6):485-9.
10. Piroth L, Duong M, Quantin C, *et al.* Does hepatitis C coinfection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients? *AIDS* 1998;12:381-8.
11. Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Stoll M, Manns MP, Schmidt RE. Hepatitis B and C in HIV-infected patients. Prevalence and prognostic value. *J Hepatol* 1997;27:18-24.
12. Daar ES, Lynn H, Donfield S, *et al.* The relationship between hepatitis C virus and HIV infection in hemophiliacs [abstract 280]. *7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, 2000, p.129.
13. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, *et al.* Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus co-infection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2000;356:1800-5.
14. De Luca A, Bugarini R, Cozzi Lepri A *et al.* Coinfection with hepatitis viruses and outcome of the first antiretroviral regimen in previously naive HIV-infected subjects *Arch Int Med* 2002 in press.
15. Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. *Arch Intern Med* 2000;160(22):3365-73.
16. Cribier B, Rey D, Schmitt C, Lang JM, Kirm A, Stoll-Keller. High hepatitis C viremia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. *AIDS* 1995;9:1131-36.
17. Bonacini M, Govindarajan S, Blatt LM, Schmid P, Conrad A, Lindsay K. Patients coinfecting with human immunodeficiency virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *J Viral Hepatitis* 1999;6:203-8.
18. Martin P, DiBisceglie AM, Kassianides C, Lisker-Melman M, Hoofnagle JH. Rapidly progressive non-A, non-B hepatitis in patients with HIV infection. *Gastroenterology* 1989;97:1559-61.
19. Mazza C, Puoti M, Ravaggi A, Castelnuovo F, Albertini A, Cariani E. Molecular analysis of mixed infection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in a patient infected simultaneously. *J Med Virol* 1996;50:276-82.
20. Eyster ME, Diamondstone LS, Lien JM, Ehmann C, Quan S, Goedert JJ. Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus. *J Acq Immun Def Syndr* 1993;6:602-10.
21. Telfer P, Sabin C, Devereux H, Scott F, Dusheiko G, Lee C. The progression of HCV-associated liver disease in a cohort of haemophilic patients. *Br J Haematol* 1994;88:397-9.
22. Makris M, Preston FE, Rosendaal FR, Underwood FR, Rice KM, Triger DR. The natural history of chronic hepatitis C in hemophiliacs. *Br J Haematol* 1996;94:746-52.
23. Darby SC, Ewart DW, Giangrande PLF, *et al.* Mortality from liver cancer and liver disease in haemophilic men and boys in UK given blood products contaminated with hepatitis C. *Lancet* 1997;350:1425-31.
24. Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, *et al.* Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997;26:1-5.
25. Pol S, Fontaine H, Carnot F, *et al.* Predictive factor for development of cirrhosis in parenterally acquired chronic hepatitis C: a comparison between immunocompetent and immunocompromised patients. *J Hepatol* 1998;29:12-9.

26. Rockstroh JK, Spengler U, Sudhop T, *et al.* Immunosuppression may lead to progression of hepatitis C virus-associated liver disease in hemophiliacs coinfecting with HIV. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2563-8.
27. Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V *et al.* Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C Virus coinfecting patients. *Hepatology* 1999;30:1054-8.
28. Puoti M, Bonacini M, Spinetti A, *et al.* Liver fibrosis progression is related to CD4 cell depletion in patients co-infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2001;183(3):134-7.
29. Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M, *et al.*, Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected and hepatitis C virus-coinfecting patients: impact of protease inhibitor therapy, *Hepatology* 2001;34:283-7.
30. Prestileo T, Mazzola G, Di Lorenzo F *et al.*. Response-adjusted alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:373-8.
31. Hayashi K, Fukuda Y, Nakano I *et al.* Poor response to interferon treatment for chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus-infected haemophiliacs. *Haemophilia* 2000;6:677-81.
32. Bruno R, Sacchi P, Filice C, Filice G Aggressive daily interferon therapy in HIV-HCV coinfecting patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;25:372-3.
33. Ramos Paesa C, Arazo Garces P, Pascual Catalan A, Hermida Lazcano I, Aguirre Errasti JM Interferon treatment of chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus infected patients. *Rev Clin Esp* 1998;198:221-5.
34. Causse X, Payen JL, Izopet J, Babany G, Girardin MF Does HIV-infection influence the response of chronic hepatitis C to interferon treatment? A French multicenter prospective study. French Multicenter Study Group. *J Hepatol* 2000;32(6):1003-10.
35. Di Martino V, Thevenot T, Boyer N, Cazals-Hatem D, Degott C, Valla D, Marcellin P.; HIV coinfection does not compromise liver histological response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *AIDS* 2002;16(3):441-5.
36. Puoti M, Zanini B, Quinzan P, Santantonio T, Cavaliere R, Castelli F, Zaltron S, Quiros Roldan E, Suter F, Pastore G and Carosi G Human immune deficiency virus co-infection impairs responsiveness to interferon and ribavirin combination in patients with chronic hepatitis C: preliminary results of a comparative study. *Hepatology* 2002;36:289A.
37. Sauleda S, Juarez A, Esteban JI *et al.* Interferon and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus-infected patients with congenital coagulation disorders. *Hepatology* 2001;34(5):1035-40.
38. Landau A, Batisse D, Piketty C, Long term efficacy of combination therapy with interferon-alpha2b and ribavirin for severe chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS* 2001;15(16):2149-55.
39. Nasti G, Di Gennaro G, Tavio M, Cadorin L, Tedeschi RM, Talamini R, Carbone A, Tirelli U. Chronic hepatitis C in HIV infection: feasibility and sustained efficacy of therapy with interferon alfa-2b and ribavirin. *AIDS* 2001 15(14):1783-7.
40. Rockstroh JK, Mudar M, Lichterfeld M, Nischalke HD, Klausen G, Golz J, Dupre S, Nothies G, Stein L and Mauss S for the German Clinical AIDS Working Group Pilot study of interferon alpha high-dose induction therapy in combination with ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-co-infected patients. *AIDS* 2002;16:2083-5.
41. Perez Olmeda M, Asensi V, Romero M, Sanchez-Montero F, Santin M, Ochoa A, Guardiola J, Blanch J, Garcia-Samaniego J, Soriano V. Efficacy and safety of combination therapy with interferon plus ribavirin in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *AIDS* 2003 in press.

42. Romero M, Nunez M, Perez-Olmeda M, Gonzalez J, Castro A, Ramon Arribas J, Barreiro P, Soriano V Garcia-Samaniego J. Therapy with pegylated interferon plus ribavirin in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:363A.
43. Perronne C, Carrat F, Banisadr F, Morand P, Lunel F, Rosenthal E, Pol S. ARNS HC02-RIBAVIC: a randomized controlled trial of pegylated interferon 2b plus ribavirin vs. interferon a2b plus ribavirin as primary treatment of chronic hepatitis C in HIV coinfecting patients. *Hepatology* 2002;36:283A.
44. Cargnel A, Angeli E, Casella A, Gubertini G, Mainini A, Orlando G. An open multicenter randomized trial comparing pegylated interferon alpha 2b (PEG-IFN) plus ribavirin (RBV) versus PEG-IFN for treatment of HIV/HCV coinfecting patients. *Hepatology* 2002;36:363A.
45. Morsica G, De Bona A, Uberti C, Sitia G, Finazzi R, Lazzarin A. Ribavirin therapy for chronic hepatitis C does not modify HIV viral load in HIV-1 positive patients under antiretroviral treatment. *AIDS* 2000;14:1656-8.
46. Landau A, Batisse D, Piketty C, Jian R, Kazatchkine M. Lack of interference between ribavirin and nucleoside analogues in HIV/HCV coinfecting individuals undergoing concomitant antiretroviral and anti-HCV combination therapy. *AIDS* 2000;14:1857-8.
47. Lafeuillade A, Hittinger G, Chadapaud S. Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. *Lancet* 2001;357(9252):280-1.

CRIOGLOBULINEMIA MISTA

Gabriele Pozzato
Ospedale di Gattinara, Trieste

La Crioglobulinemia Mista (CM) è una malattia sistemica, caratterizzata da lesioni vasculitiche a carico della cute e degli organi interni, secondarie alla deposizione di immunocomplessi circolanti crioprecipitabili e di frazioni del complemento. La CM viene classificata nell'ambito delle vasculiti sistemiche interessanti i vasi di medio e piccolo calibro. Clinicamente è caratterizzata dalla sindrome "crioglobulinemica", i cui sintomi principali sono la porpora, l'astenia e le artralgie (Triade di Lo Spalluto-Meltzer) ai quali possono associarsi un coinvolgimento epatico, renale e del sistema nervoso periferico. Le crioglobuline possono essere classificate (5) in 3 tipi:

- Tipo I (Crioglobulina singola monoclonale)
In questo caso le immunoglobuline sono solo monoclonali, e tipicamente della classe delle IgM. Questo tipo di crioglobuline si riscontra di solito nella malattia di Wäldenstrom, più raramente nel mieloma multiplo.
- Tipo II (Crioglobulinemia mista con componente monoclonale)
La crioglobulinemia viene definita di tipo II quando coesistono una componente monoclonale (di solito della classe delle IgM) e una componente policlonale, di solito della classe delle IgG. La componente monoclonale possiede specificità anticorpale nei confronti delle immunoglobuline della classe IgG (attività tipo "fattore reumatoide"). La forma di tipo II è la più comune tra le crioglobulinemie.
- Tipo III (Crioglobulinemia mista con componenti esclusivamente policlonali)
La crioglobulinemia mista di tipo III comprende immunoglobuline policlonali delle classi IgG e IgM, che possono essere dotate o meno di attività fattore reumatoide.

La crioglobulinemia di tipo I è costantemente associata presenza di malattie linfoproliferative clonali, mentre la crioglobulinemia di tipo II è di solito considerata una malattia linfoproliferativa monoclonale a cellule B solo in quella frazione di pazienti in cui è possibile evidenziare un infiltrato linfoide midollare o splenico. 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 espressione di una malattia linfoproliferativa.

Eziologia

Nella CM erano segnalati da moltissimi anni una alterazione degli indici di funzione epatica e, istologicamente, quadri variabili da lesioni minime a epatite cronica attiva e a cirrosi epatica. Per molti anni i ricercatori indagarono su un possibile ruolo eziologico di un qualche virus epatotropo, anche al fine di capire se il coinvolgimento epatico fosse secondario o meno alla vasculite sistemica. Tali quesiti rimasero senza risposta fino a quando non venne scoperto il

virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV). Una volta disponibili le metodiche per la ricerca degli anticorpi anti-HCV, i pazienti con CM vennero studiati per la presenza dell'HCV e con grande sorpresa risultarono quasi tutti positivi. Infatti da ormai oltre 10 anni, numerosi autori hanno riportato una stretta associazione tra l'infezione da HCV e la crioglobulinemia mista (2, 8). Questa associazione è stata confermata in tutto il mondo e perciò non può essere considerata casuale, ma di natura eziopatogenetica. Poiché l'HCV possiede una notevole variabilità genomica, questa caratteristica ha suggerito la possibilità che la comparsa della CM potesse essere associata a un genotipo particolare dell'HCV. Molti ricercatori hanno indagato tale possibilità, ma la maggior parte degli studi ha evidenziato una prevalenza del genotipo 1b, analogamente a quanto riscontrato nei soggetti HCV positivi senza crioglobulinemia. Tuttavia, alcuni autori (22, 26), hanno osservato un'alta prevalenza del genotipo 2ac tra i pazienti affetti da CM.

Sulla base di questi risultati, l'HCV sembra essere associato alla CM nella quasi totalità dei casi, anche in assenza di malattia cronica di fegato. L'infezione virale è presente nelle CM tipo II come pure in quelle di tipo III, suggerendo la presenza di uno stesso tipo di meccanismo eziopatogenetico. Il coinvolgimento dell'HCV nella CM di tipo I non è stato ancora chiarito: in un lavoro preliminare (19) veniva riscontrata la presenza dell'HCV-RNA nella maggioranza dei casi, mentre altri gruppi di studio (21) non hanno confermato questa osservazione. Altri autori (7) hanno riportato la presenza dell'infezione da HCV in una ampia percentuale (62%) di pazienti affetti da M. di Wäldestrom e pertanto il problema è tuttora aperto (6).

L'insieme di questi dati tende a sottolineare uno stretto nesso patogenetico tra l'HCV e la CM, tanto da poter affermare che non è più accettabile parlare di crioglobulinemia mista "essenziale". In realtà una minima frazione di soggetti con CM non associata all'HCV esiste, e di solito in tali casi è presente una malattia di tipo reumatologico come il LES o l'artrite reumatoide. Forse in questi casi sarebbe più appropriata la denominazione di CM di tipo "secondario".

Epidemiologia

Stante l'associazione tra HCV e crioglobulinemia, sembrerebbe verosimile che la prevalenza della CM vada di pari passo con la prevalenza dell'infezione virale. Al contrario, la percentuale di soggetti che presentano una CM in corso di infezione cronica da HCV sembra estremamente variabile nei numerosi studi pubblicati (dal 20 al 60% dei casi). Inizialmente si pensò che questa variabilità dipendesse dalle diverse metodologie con le quali le crioglobuline venissero ricercate, mentre studi successivi, condotti con metodi standard hanno evidenziato notevoli differenze tra le varie popolazioni. I risultati di tali ricerche sono per certi versi sorprendenti, infatti mentre in Italia, Spagna e Francia e verosimilmente anche negli altri Paesi che affacciano sul Mediterraneo, la prevalenza della sindrome crioglobulinemica è elevata (dal 30 al 50% dei soggetti infettati dall'HCV) (1) nei Paesi anglosassoni (UK, USA) tale prevalenza è bassissima (2% circa). Parimenti in Giappone e in Corea la prevalenza della CM di secondo tipo è praticamente zero (23), mentre la percentuale di quelle di terzo tipo è sempre molto bassa. Questi rilievi di ordine epidemiologico hanno importanti risvolti dal punto di vista concettuale in quanto dimostrano che sebbene l'agente eziologico sia unico (HCV) una malattia linfoproliferativa si sviluppa solo in presenza di una "predisposizione" individuale di natura al momento non definibile.

Patogenesi

Stante l'ormai scontato concetto che l'agente eziologico della CM risulta essere l'HCV, non risulta ancora ben chiaro come tale virus sia in grado di determinare la comparsa di un disordine linfoproliferativo. Comunque, sulla patogenesi delle alterazioni linfoproliferative indotte dall'HCV si sono recentemente fatti numerosi passi avanti.

Già nel 1995, si era dimostrato che i pazienti affetti da CM risultavano portatori di una monoclonalità B-cellulare nel sangue periferico. Questa monoclonalità era presente non solo in tutti i soggetti con CM, ma anche nel 30% dei casi con infezione da HCV senza alcun segno né clinico né laboratoristico di CM (11). Risultava quindi evidente che l'espansione clonale dei linfociti B non era legata alla CM, ma all'infezione stessa da HCV. Successivamente altri ricercatori hanno sviluppato questi aspetti dell'infezione da HCV, studiando la presenza della traslocazione 14-18 nei soggetti con epatite C e con CM. I risultati sono stati molto sorprendenti in quanto si evidenziò che non solo i soggetti con CM presentavano tale traslocazione (nel 75% dei casi), ma che anche i soggetti con epatite C senza CM presentavano tale anomalia genica (nel 30% dei casi) (27). Ancora una volta dunque sembra proprio il virus HCV a determinare tale traslocazione che, al contrario, si verifica spontaneamente solo in una minima proporzione nei controlli (4%). L'effetto di tale traslocazione è piuttosto complesso, ma determina il riarrangiamento del gene *bcl-2*, un gene anti-apoptotico. L'attivazione di questo gene determina un eccesso della proteina codificata dal gene *bcl-2*, con alterazione del rapporto tra proteina *bcl-2* e la proteina Bax che, al contrario, favorisce l'apoptosi. Da segnalare che il riarrangiamento del *bcl-2* è presente in tutti i linfomi non-Hodgkin di tipo follicolare e che studi sperimentali hanno evidenziato come tale alterazione determini un'instabilità del sistema B con facile sviluppo di patologie linfoidi maligne molto aggressive. Un recente studio evidenzia che, in effetti, nei soggetti con CM si verifica uno squilibrio tra proteina *bcl-2* e proteina Bax con effetto anti-apoptotico sulle cellule linfoidi B. Questo squilibrio è presente nella gran parte (90%) dei soggetti con CM, ma anche nel 30% dei soggetti con epatite senza CM (28). Di grande interesse risulta il fatto che, durante la terapia antivirale, tali alterazioni scomparivano in concomitanza con l'eliminazione del virus. Questi risultati sono particolarmente importanti in quanto indicano come sia proprio l'attiva replicazione virale la causa di tali complessi fenomeni che portano alla CM e verosimilmente anche ai linfomi non-Hodgkin.

Dal momento che tutti i fenomeni sopra descritti regrediscono con lo scomparire dell'infezione da HCV, i danni provocati dal virus non sono dunque irreversibili, ma dipendono dalla continuativa stimolazione dei linfociti B. In quale modo tale stimolazione continuativa si verifichi non risulta ancora chiaro, ma è noto che uno dei principali recettori che determinano l'adesione dell'HCV sui linfociti B risulta essere il CD81. Questa molecola è una tetraspanina, una classe di recettori molto diffusi sia sulle cellule B che T, la quale ha un ruolo prevalentemente di stimolo sui linfociti B e T abbassandone la soglia di attivazione. Recentemente sono stati descritti almeno due altri tipi di recettore per l'HCV: il recettore per le LDL (24) e lo Scavenger Receptor Class B Type 1 (SR-B1) (20). Questi recettori però sembrano importanti solo per l'internalizzazione e quindi per l'infezione da HCV, mentre non hanno alcun effetto funzionale sui linfociti B o T. Al contrario il CD81 non solo abbassa la soglia di attivazione dei linfociti B, ma determina anche una serie di modificazioni dell'immunofenotipo di membrana che sembrano peculiari dell'infezione da HCV e non verificabili in altre patologie epatiche o virali in genere.

Lo studio dell'espressione di alcuni antigeni di attivazione dei linfociti B quali il CD69, CD71 e il CD86 ha evidenziato che la stimolazione dei linfociti mediante gli abituali mezzi, quali il SAC, era fondamentalmente diversa dal risultato che si ottiene mediante la stimolazione del CD81, ottenuta mediante l'utilizzo di proteine dell'envelope del virus HCV. Parimenti

anche lo studio dell'espressione dei recettori per le chemochine indicava una differenza notevole tra quanto ottenuto mediante l'attivazione del CD81 (iper-espressione del recettore CXCR3 e downregulation del recettore CXCR4) rispetto a quanto ottenuto tramite la stimolazione dei recettori comuni delle cellule B (17). Non è ancora chiaro come tali alterazioni immunologiche possano correlarsi alla regolazione dell'apoptosi delle cellule B, ma comunque indicano che il virus HCV è in grado di modificare lo stato di attivazione dei linfociti B in un modo peculiare, non riscontrabile in nessuna altra patologia umana. Ad ogni modo tali alterazioni dei linfociti B giustificano la nota associazione clinica tra HCV e malattie linfoproliferative a immunofenotipo B quali appunto la CM, ma anche la vasta categoria dei linfomi non-Hodgkin e il morbo di Waldenstrom.

Terapia

Tradizionalmente la CM veniva trattata con farmaci immunosoppressori nell'ipotesi di una patogenesi autoimmune. In alternativa, quando clinicamente si manifestava una patologia linfoproliferativa, venivano usati i farmaci citostatici e, se la componente IgM era molto elevata, veniva utilizzata la plasmaferesi. Allo stato attuale delle conoscenze, si tende a utilizzare di meno la terapia immunosoppressiva nel timore di favorire la replicazione virale. Oggi la disponibilità di nuove classi di farmaci in primo luogo dell'interferone ha rivoluzionato l'approccio terapeutico alla CM

Lo scopo della terapia della CM è quello di:

1. contrastare gli agenti eziologici responsabili della CM;
2. inibire la sintesi delle crioglobuline da parte dei linfociti B;
3. ridurre la formazione degli immunocomplessi circolanti;
4. rimuovere gli immunocomplessi circolanti;
5. ridurre la componente infiammatoria.

La terapia della sindrome crioglobulinemica si avvale delle seguenti opzioni terapeutiche:

1. Terapia di supporto;
2. Terapia eziologica;
3. Terapia immunosoppressiva;
4. Terapia antiproliferativa;
5. Terapia per la rimozione degli immunocomplessi circolanti (plasmaferesi);
6. Terapia ipoantigenica;
7. Terapia antiinfiammatoria (FANS e Colchicina).

Terapia di supporto

La terapia di supporto si avvale di semplici regole di vita, come ad esempio evitare l'esposizione alle basse temperature o al freddo, proteggendo le estremità del corpo con indumenti adeguati, evitare una eccessiva attività fisica ed evitare una stazione eretta per periodi prolungati.

Terapia eziologica

L'impiego dell'interferone alfa (IFN) nella CM iniziò nel 1987 (4) non appena questa classe di farmaci si rese disponibile. Non essendo ancora nota l'eziologia della malattia, l'IFN veniva utilizzato per la sua azione antiproliferativa e immunomodulante e il successo terapeutico venne

attribuito alla capacità del farmaco di inibire selettivamente i cloni B linfocitari produttori delle crioglobuline. Dopo la scoperta dell'HCV e i successi ottenuti con l'IFN nella terapia dell'epatite cronica HCV-positiva, è sembrato razionale l'impiego di tale farmaco nella CM. L'IFN infatti costituisce 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 sua azione immunomodulante, in quanto si riscontra un miglioramento della sintomatologia anche nei soggetti in cui non si ottiene la eradicazione dell'HCV. Nei primi studi, la risposta primaria dell'IFN in monoterapia variava, a seconda dei vari autori, dal 30 al 60% (9) ma l'eradicazione dell'HCV si verificava soltanto in una piccola percentuale di casi (15-20%), e inoltre, alla sospensione del trattamento, la grande maggioranza dei pazienti presentava una recidiva clinica e la ricomparsa dell'HCV-RNA. (16). Anche se i successi con l'IFN in monoterapia erano limitati, si intuì subito che l'IFN risultava comunque l'unico trattamento in grado di portare a remissione completa la CM.

Dopo la dimostrazione che, nelle epatiti croniche da HCV, l'inserimento di nuovo farmaco antivirale, la ribavirina, risultava particolarmente utile nel trattamento dei soggetti non-responsivi o ricaduti, la terapia di combinazione è stata utilizzata, con le medesime indicazioni, anche nella terapia della CM. L'estensione delle indicazioni della terapia di combinazione anche ai casi *naïve*, ha consentito di trattare con i due farmaci anche i soggetti con CM ottenendo risultati molto incoraggianti. Comunque, in tutti gli studi pubblicati la percentuale di guarigioni virologiche si è dimostrata molto inferiore a quanto ottenuto nei soggetti con epatiti croniche HCV-correlate senza CM. Da pochi mesi sono disponibili le nuove formulazioni di interferone peghilato, che consentono la somministrazione del farmaco una sola volta alla settimana, con non solo un notevole vantaggio pratico per il paziente, ma con anche un notevole vantaggio in termini di efficacia e tollerabilità. La terapia di combinazione con l'IFN peghilato determina non solo una maggiore adesione di pazienti al trattamento, ma anche una percentuale di guarigioni molto più alta che la terapia di combinazione classica. Nei pazienti con genotipo favorevole infatti (Tipo 2 o 3), la percentuale di eradicazione della malattia arriva a oltre il 90% dopo solo 6 mesi di trattamento combinato, il quale, d'altra parte, è capace di guarire circa il 60% dei casi con genotipo sfavorevole (Tipo 1-4) (12). Non vi sono studi pubblicati sull'efficacia della combinazione PEG-IFN più ribavirina nella CM, ma nostri dati preliminari (Mazzaro et al, dati non pubblicati), pur indicando un netto miglioramento rispetto al trattamento convenzionale, nuovamente segnalano una percentuale di risposte virologiche ben lontano da quelle ottenute nella maggior parte dei trial clinici in cui tale terapia è stata utilizzata in soggetti *naïve* senza CM. Non sono chiare le ragioni di tale discrepanza, si possono invocare una serie di motivi quali l'età di solito più avanzata dei soggetti con CM, la lunga durata della malattia o una malattia di fegato avanzata, ma anche nei casi più giovani e senza malattia epatica, la percentuale di risposte rimane bassa. È verosimile che le ben note alterazioni immunologiche indotte dal virus HCV siano particolarmente accentuate nella CM determinando una scarsa reattività del sistema immune alla terapia con IFN.

Il trattamento antivirale inoltre, contestualmente all'eradicazione dell'HCV, determina una regressione della linfoproliferazione monoclonale presente a livello del midollo o nel sangue periferico, prevenendo l'ulteriore sviluppo di tale patologia verso malattie più aggressive come i linfomi non-Hodgkin.

Terapia immunosoppressiva

L'uso degli steroidi costituisce la terapia tradizionale della CM. Questi farmaci sono indicati nelle CM paucisintomatiche, oppure in quelle con esteso e grave impegno viscerale. Infatti, anche a basso dosaggio, i cortisonici sono in grado di controllare gran parte delle manifestazioni

cliniche della CM per periodi prolungati. Sono utili per controllare la sintomatologia purpurica e artralgica, ma funzionano più per la loro attività anti-infiammatoria che per l'inibizione della sintesi delle crioglobuline, infatti il miglioramento clinico dei pazienti trattati non sembra correlato con una riduzione della concentrazione delle crioglobuline. Inoltre in nessun studio è stato dimostrato che tale classe di farmaci sia in grado di modificare la storia naturale della malattia (13).

Anche questi farmaci presentano una serie di effetti collaterali importanti (diabete, ulcera e osteoporosi per citarne i più comuni) accentuati dal fatto che vengono utilizzati per periodi molto lunghi. Vi sono osservazioni di aumento della viremia nei pazienti trattati con steroidi e pertanto questi vengono consigliati soltanto nelle forme in cui vi siano manifestazioni vasculitiche acute o nella fase di acuzie della glomerulonefrite crioglobulinemica. Recentemente sono stati introdotti in terapia gli anticorpi monoclonali anti-CD20. Questi anticorpi rappresentano un'evoluzione "estrema" della terapia immunosoppressiva in quanto in grado di distruggere le cellule B CD20 positive, che sono le cellule che producono anticorpi. Il grande vantaggio di tale terapia è quello di non avere gli effetti collaterali degli steroidi e di essere molto più potenti di ogni trattamento immunosoppressivo convenzionale. Vi sono 2 recentissimi studi sulla efficacia e tollerabilità di tali anticorpi nella CM (Zaja et al 2003; Sansonno et al 2003). Sebbene con sfumature diverse, entrambi indicano la ottima tollerabilità della terapia e la grande efficacia nella risoluzione dei fenomeni vasculitici e della sintomatologia soggettiva. A lungo termine però gli effetti del trattamento svaniscono e la patologia tende a ripresentarsi. Il trattamento perciò risulta molto efficace nel breve termine e soprattutto quando bisogna risolvere un problema vasculitico acuto, mentre la malattia tenderà sempre a ripresentarsi, dal momento che il trattamento non solo non elimina il virus, ma tende ad aumentarne la replicazione.

Terapia con citostatici

Nella terapia della CM si possono utilizzare anche farmaci citostatici che, per la loro azione litica sulle cellule B, sono in grado di ridurre la concentrazione plasmatica delle crioglobuline. I farmaci citostatici si sono dimostrati particolarmente efficaci nelle CM di tipo I e II, dove in effetti è quasi sempre presente una patologia linfoproliferativa monoclonale (10). In assenza di studi clinici controllati, le terapie citostatiche venivano in genere utilizzate quando la terapia steroidea non risultava più efficace. I citostatici più utilizzati sono il clorambucil e soprattutto la ciclofosfamide. Attualmente, vista la stretta associazione tra l'HCV e la CM, l'uso di questi farmaci risulta ristretto solamente ai casi di CM di tipo I, e a quelli in cui la patologia linfoproliferativa evolve verso un linfoma conclamato, oppure ancora nei casi in cui è presente una sindrome da iperviscosità.

Dieta a basso contenuto antigenico

Una dieta a basso contenuto di antigeni alimentari si è dimostrata efficace nel controllare le manifestazioni cliniche minori della malattia. Il razionale della dieta consiste nel fatto che comporta la riduzione del numero di macromolecole esogene che, tramite il sangue portale, giungono al fegato, ove vengono processate dalle cellule di Kupfer, riducendone la capacità di clearance nei confronti degli immunocomplessi circolanti. Ecco allora che fornendo una dieta a basso contenuto di macromolecole, risulta alleviata la funzione del sistema monocito-macrofagico, con una migliore capacità di clearance degli immunocomplessi, tra cui anche le crioglobuline (3). La dieta, somministrata in modo intermittente, sembra determinare un

beneficio solo sulle manifestazioni minori della CM, ma effetti sui parametri di laboratorio (criocrito e fattore reumatoide) sono modestissimi. La dieta è efficace nei casi paucisintomatici, ma vi sono notevoli problemi di “compliance” da parte dei pazienti nel lungo termine.

Plasmaferesi

La plasmaferesi tradizionale (PE) o selettiva (DFPP), è una metodica che consente la sostituzione del plasma del paziente con emocomponenti o succedanei, permettendo la rimozione di sostanze patogene esogene (tossici, veleni), o endogene (autoanticorpi, immunocomplessi, e crioglobuline). La plasmaferesi presenta scarsi effetti collaterali, quali modesta anemia e deplezione proteica, la quale può essere corretta somministrando albumina o plasma a secondo delle diverse tecniche usate. Vi sono una serie di studi non controllati che evidenziano come la plasmaferesi sia di particolare utilità nella CM. Il meccanismo d'azione è, ovviamente, la rimozione delle crioglobuline, assieme ad una azione favorente sulla attività del sistema reticolo-endoteliale. La plasmaferesi ha efficacia limitata nel tempo e se non è associata ad altre terapie farmacologiche fornisce risultati del tutto temporanei. In genere durante o subito dopo le aferesi, il paziente viene trattato con ciclofosfamide (2 mg/kg/die) o con una combinazione di ciclofosfamide e corticosteroidi per ridurre l'effetto rebound provocato alla sottrazione delle crioglobuline dal circolo (15). Poiché si è dimostrata particolarmente efficace nel trattamento di alcune manifestazioni acute della CM, le indicazioni attuali alla plasmaferesi sono la glomerulonefrite crioglobulinemica, la sindrome da iperviscosità, la neuropatia periferica sensitivo-motoria grave e le ulcere cutanee.

Anti-infiammatori

Nella vasculite crioglobulinemica una utile opzione terapeutica è rappresentata dalla colchicina e dagli antiinfiammatori non steroidei (FANS). La colchicina è un farmaco usato nell'artrite acuta gottosa, in cui ha un'efficacia straordinaria. Il farmaco ha molteplici azioni: interferendo con la formazione dei microtubuli impedisce le mitosi dei linfociti e dei monociti, riduce la chemiotassi e l'adesività dei granulociti neutrofili e blocca la secrezione delle immunoglobuline. In considerazione di tali proprietà anche la colchicina è stata utilizzata nella CM. In uno studio non controllato, la colchicina è stata usata al dosaggio di 1 mg/die per lunghi periodi (6-48 mesi) con risultati soddisfacenti soprattutto dal punto di vista clinico, mentre scarsa era stata l'efficacia sui livelli di criocrito e di fattore reumatoide). Poiché il farmaco presenta effetti collaterali non trascurabili sia a livello gastroenterico (diarrea, epigastralgie, ecc.) che ematologico (leuco-piastrinopenia) un trattamento con colchicina può essere raccomandato solo nel caso di fallimento o di intolleranza verso tutti gli altri presidi farmacologici (14)

Gli anti-infiammatori non steroidei vengono usati dai pazienti nei casi di riacutizzazioni delle artralgie a scopo esclusivamente antalgico. Sicuramente un loro uso esteso e prolungato non è consigliabile stante il frequente coinvolgimento renale in corso di CM. Inoltre i noti effetti collaterali dei FANS a livello gastrico ne consigliano un uso molto cauto in presenza di malattia cronica di fegato.

Bibliografia

1. Adinolfi LE, Utili R, Attanasio V, *et al.* Epidemiology, clinical spectrum and prognostic value of mixed cryoglobulinemia in hepatitis C virus patients: a prospective study. *J Hepatol Gastroenterol* 1996;28:1-9.
2. Agnello G, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia? *N Engl J Med* 1992;327:1490-6.
3. Bombardieri S, Ferri C. Low antigen content diet in the management of immuno-mediated diseases. *Isr J Med Sci* 1992;28:117-20.
4. Bonomo L, Casato M, Afeltra A, *et al.* Treatment of idiopathic mixed cryoglobulinemia with alpha-interferon. *Am J Med* 1987;83:726-31.
5. Brouet JC, Clauvel J, Damon F, *et al.* Biological and clinical significance of cryoglobulins. *Am J Med* 1974;57:775-8.
6. Colantoni A, De Maria N, Idilman R, Van Thiel DH. Polymerase chain reaction for the detection of HCV-RNA: cryoglobulinemia as a cause of false negative results. *J Hepatol Gastroenterol* 1997;29:273-4.
7. De Rosa G, Gobbo ML, De Renzo A, *et al.* High prevalence of hepatitis C virus infection in patients with B-cell lymphoproliferative disorders in Italy. *Am J Hematol* 1997;55:77-82.
8. Ferri C, Greco F, Longobardo G, *et al.* Association between hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:95-96.
9. Ferri C, Marzo E, Longobardo G, *et al.* Alpha -interferon in mixed cryoglobulinemia patients: a randomized crossover controlled trial. *Blood* 1993;81:1132-6.
10. Frankel AH, Singer DRJ, Winearsls CG, *et al.* Type II essential mixed cryoglobulinemia : presentation, treatment and outcome in 13 patients. *Q J Med* 1992;298:101-24.
11. Franzin F, Pozzato G, Efremov D *et al.* Clonal B-cell expansions in peripheral blood of HCV-infected patients. *Br J Haematol* 1995;90:548-2.
12. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975-82.
13. Gorevic PD, 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.
14. Invernizzi F, Monti G. Colchicine and mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 1993;36:722-3.
15. L'Abbate A, Maggiore Q, Caccamo A, *et al.* Efficacy of cyclofosfamide in prolonging the effects of apheretic treatment in mixed cryoglobulinemia. *J Art Organs* 1989; 12: 79-82
16. 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.
17. Rosa D, Saletti G, Valiante N *et al.* HCV activates naive B cells via CD81 engagement: a pathogenetic mechanism for B cell disturbances in HCV infection. *Proceedings of 9th International Symposium on Hepatitis C Virus*. San Diego (USA); 2002.
18. Sansonno D, De Re V, Lauletta G *et al.* Monoclonal antibody treatment of mixed cryoglobulinemia resistant to interferon alpha with an anti-CD20. *Blood* 2003;101(10):3818-26.
19. Santini GF, Crovatto M, Modolo ML *et al.* Waldenstrom's macroglobulinemia: a role of HCV infection? *Blood* 1993;9:2932.
20. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R *et al.* The human scavenger receptor class B type 1 is a novel candidate for hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21(19): 5017-25.

21. Silvestri F, Barillari G, Fanin R *et al.* The genotype of the hepatitis C virus in patients with HCV-related B-cell non Hodgkin's lymphoma. *Leukaemia* 1997; 11:2157-61.
22. Sinico RA, Ribero ML, Fornasieri A *et al.* Hepatitis C virus genotype in patients with essential mixed cryoglobulinaemia. *QJM* 1995; 88(11): 805-10.
23. Tanaka K, Aiyama T, Imai J, *et al.* Serum cryoglobulin and chronic hepatitis C virus disease among Japanese patients. *Am J Gastroenterol* 1996;90:1847-52.
24. Wünschmann S, Medh JD, Klinzmann D *et al.* Characterization of Hepatitis C Virus (HCV) and HCV E2 Interactions with CD81 and Low-Density Lipoprotein Receptor. *J Virol* 2000;74(21):10055-62.
25. Zaja F, De Vita S, Mazzaro C *et al.* Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2003;101(10):3827-34.
26. Zehender G, de Maddalena C, Monti G *et al.* HCV genotypes in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:S87-90.
27. Zignego AL, Giannelli F, Marrocchi ME *et al.* T(14;18) traslocation in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2000;31(2):474-9.
28. Zignego AL, Ferri C, Giannelli F *et al.* Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphoma. *Ann Med* 2002;137(7):571-82.

VIRUS DELL'EPATITE C E STEATOSI

Francesco Negro

Divisioni di Gastroenterologia ed Epatologia e di Patologia Clinica, Ospedale Cantonale Universitario, Ginevra, Svizzera

La patogenesi dell'epatite cronica C è poco conosciuta. L'osservazione secondo la quale il livello di replicazione C intraepatico non è correlato con l'attività necroinfiammatoria, unita a numerosi dati di immunità cellulare, suggeriscono che il danno epatico indotto dal virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) è immunomediato (1). Tuttavia, alcuni aspetti istopatologici, come la steatosi (2), sono compatibili con effetto citopatico dell'HCV. Se si escludono le cause più frequenti di accumulo di grassi nel fegato, si riscontra una steatosi nel 30-40% dei pazienti affetti da epatite cronica virale C, con conseguenze anche sul piano diagnostico.

La steatosi epatica che si riscontra nei pazienti affetti da epatite cronica C è dovuta all'HCV?

La responsabilità diretta dell'HCV nella patogenesi della steatosi è dimostrata da varie osservazioni. In primo luogo, l'associazione con l'infezione da parte del genotipo 3 dell'HCV, segnalata per la prima volta nel 1997 (3) e in seguito confermata da numerosi studi (4-8), suggerisce l'implicazione di specifiche sequenze virali nella patogenesi dell'accumulo intracellulare di lipidi. In secondo luogo, la severità della steatosi correla con il livello di replicazione dell'HCV, sia nel siero sia nel fegato. Infine, la risposta al trattamento antivirale, temporanea o definitiva, è associata alla scomparsa della steatosi dal fegato, mentre la recidiva dell'infezione da HCV dopo la fine del trattamento è accompagnata da una recidiva della steatosi. L'insieme di queste osservazioni ci ha portati a concludere che la steatosi è l'espressione morfologica di un effetto citopatico dell'HCV (4).

Qual è la proteina dell'HCV responsabile dell'accumulazione di lipidi negli epatociti?

Gli studi *in vitro* (9) nonché il modello del topo transgenico (10) hanno dimostrato che la proteina del nucleocapside dell'HCV è capace di indurre un accumulo di lipidi. Dati di microscopia elettronica (9) e di immunofluorescenza indiretta combinata alla colorazione dei grassi con olio rosso O (11) hanno dimostrato che, dopo transfezione di differenti linee cellulari, la proteina del nucleocapside dell'HCV colocalizza con delle strutture globulari citoplasmatiche costituite da lipidi. L'esatto costituente di queste strutture che entrerebbe in contatto con la proteina virale è sconosciuto. Alcuni studi hanno identificato un'interazione con l'apolipoproteina apoAII (9, 12), uno dei componenti principali delle HDL. Tuttavia, il fatto che i pazienti affetti da epatite C presentino dei livelli sierici ridotti di β -lipoproteine (5) suggerisce piuttosto un'interferenza con l'assemblaggio delle VLDL. I livelli sierici di apoB (una apolipoproteina delle VLDL) nei pazienti con epatite C non sono solamente più bassi, ma mostrano anche una correlazione inversa con la gravità della steatosi. Dopo guarigione indotta dal trattamento antivirale tali livelli si normalizzano (5). Un'interferenza con l'assemblaggio delle VLDL sarebbe inoltre compatibile con l'osservazione secondo la quale la proteina del

nucleocapside inibisce l'attività della *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) (13). Malgrado il fatto che un'interazione diretta con la MTP sia poco probabile, perché implicherebbe la secrezione della proteina del nucleocapside virale C nel lume del reticolo endoplasmico (mai dimostrata in modo convincente), l'inibizione della MTP potrebbe essere provocata secondo modalità indirette. Occorre tuttavia aggiungere che i topi transgenici che esprimono la proteina del nucleocapside virale C presentano, a differenza dei pazienti affetti da un'epatite cronica C, dei livelli di apoB nella norma (13).

Di recente, un gruppo americano ha dimostrato che l'espressione della proteina del nucleocapside dell'HCV nel topo transgenico può causare una steatosi attraverso una tossicità mitocondriale e la produzione di forme reattive dell'ossigeno (14, 15). Questo modello è interessante, perché potrebbe spiegare alcuni aspetti della storia naturale dell'epatite cronica C, come la progressione della fibrosi e la tumorigenesi. Un lavoro più recente ha anche suggerito un coinvolgimento della proteina virale non strutturale 5A nella patogenesi dell'accumulo di lipidi osservata *in vitro* (16). Questa proteina potrebbe interagire con l'apolipoproteina apoA1, ma solamente se la proteina del nucleocapside è co-espressa. Queste osservazioni confermano la complessità della patogenesi della steatosi nel corso dell'infezione virale C. Occorre ricordare che gli epatociti sono responsabili di numerose tappe del metabolismo dei lipidi. L'HCV potrebbe interferire in modo specifico con una di queste tappe, ma anche in modo meno specifico, come nel caso della produzione di forme reattive dell'ossigeno.

La steatosi riscontrata nei pazienti affetti da epatite cronica C è invariabilmente dovuta all'HCV?

Numerose osservazioni suggeriscono che le cose non stanno in questo modo. Pare infatti che la patogenesi della steatosi di grado lieve riscontrata nella maggior parte dei pazienti sia di origine metabolica, perché la sua gravità è ben correlata con la massa corporea (6). Al contrario, la steatosi moderata a severe, tipicamente associata all'infezione da parte del genotipo virale C 3, potrebbe essere di origine virale (4, 6). Questa ipotesi è stata elegantemente dimostrata da parte di un recente studio che ha valutato l'effetto dell'eradicazione dell'infezione virale C da parte del trattamento antivirale su presenza e livello di steatosi epatica (17). In questo lavoro, nei pazienti con steatosi e infezione da parte del genotipo 1, la gravità della steatosi si manteneva inalterata ed indipendente dall'evoluzione del trattamento, mentre nei pazienti con genotipo 3 la steatosi scompariva, ma unicamente in coloro che conseguivano una risposta definitiva al trattamento. Ciò dimostra che la steatosi osservata in corso di epatite C non è necessariamente dovuta all'infezione virale, ma che può riconoscere una patogenesi multifattoriale. Essendo la steatosi epatica una malattia abbastanza frequente nella popolazione generale (~15% secondo numerose stime), non è sorprendente che un'infezione virale C e una steatosi di origine differente dall'infezione da HCV possano coesistere nello stesso paziente.

I dati sperimentali suggeriscono un ruolo steatogeno del genotipo 1b, mentre le osservazioni cliniche parlano in favore di un ruolo del genotipo 3a. Chi ha ragione?

La dimostrazione che unicamente la steatosi associata al genotipo 3 dell'HCV è di origine virale è in evidente contraddizione con le osservazioni sperimentali, che sono state tutte effettuate con dei costrutti derivati dal genotipo 1 dell'HCV. Per valutare questa discrepanza, abbiamo realizzato un sistema di espressione *in vitro* transfettando delle linee di epatocarcinoma con dei plasmidi ricombinanti in cui avevamo inserito il gene del nucleocapside virale C di

differenti genotipi (1b, 3a, 3h). L'espressione di questa proteina virale in cellule Huh7 provocava la formazione nel citoplasma di strutture globulari lipidiche indipendentemente dal genotipo virale (Abid *et al*, risultati non pubblicati). Tuttavia, questo accumulo è più evidente dopo transfezione con il genotipo 3a. In particolare, la proporzione più elevata di cellule mostranti un accumulo di lipidi tra quelle esprimenti la proteina virale era riscontrata in seguito a transfezione con i genotipi 3h (82.3 ± 11.6) e 3a (77.6 ± 6.3) ($P = \text{NS}$ rispetto al 3h), mentre questa proporzione scendeva a 34.3 ± 4.7 con il genotipo 1b ($P < 0.001$ rispetto al 3a e al 3h). Questi risultati suggeriscono che, perlomeno *in vitro* e da un punto di vista qualitativo, l'accumulo intracellulare di lipidi è genotipo-indipendente. In secondo luogo, il frequente riscontro di casi caratterizzati da infezione con il genotipo 1b, un livello elevato di replicazione virale e la totale assenza di steatosi solleva la questione di un fattore specifico di questo genotipo in grado di proteggere *in vivo* gli epatociti dall'accumulo di lipidi. Questa ipotesi rimane, tuttavia, da dimostrare.

La steatosi associata all'HCV accelera la progressione della fibrosi epatica nei pazienti affetti da epatite cronica C?

La maggior parte degli studi ha dimostrato una correlazione tra presenza e/o gravità della steatosi e stadio della fibrosi (6, 19). Tuttavia, è difficile precisare il ruolo specifico della steatosi in questo contesto, considerando che l'epatite cronica C è sempre caratterizzata dalla presenza contemporanea di un'inflammazione intraepatica, che comunque costituisce il fattore più importante tra quelli associati alla fibrogenesi. Alcuni studi di coorte hanno dimostrato che la progressione di una epatopatia HCV-negativa nei pazienti con una steatosi semplice, anche se associata ad una infiammazione leggera e non specifica, era lieve o nulla (20, 21). Ci si potrebbe quindi porre la domanda se ci sia un sinergismo tra steatosi e infiammazione, ma questo problema potrà solo essere studiato nell'ambito di studi prospettici attualmente in corso.

Quale potrebbe essere il legame patogenetico tra steatosi e fibrosi epatica?

La risposta potrebbe venire da uno dei tre settori attualmente oggetto di intense ricerche: la perossidazione lipidica conseguente alla produzione di forme reattive dell'ossigeno, il sistema leptina/recettore della leptina, e la sindrome da resistenza all'insulina. Solamente degli studi prospettici su larga scala potranno chiarire il ruolo rispettivo di ciascuno di questi fattori nella progressione dell'epatite cronica C. Come segnalato sopra, l'eccesso di forme reattive dell'ossigeno prodotte nel corso dell'espressione della proteina del nucleocapside costituisce un interessante modello capace di spiegare l'associazione tra steatosi e fibrogenesi. I grassi accumulati negli epatociti potrebbero inoltre amplificare tale processo, poiché gli acidi grassi rappresentano un formidabile combustibile per la produzione di ulteriori radicali liberi tramite la perossidazione lipidica.

La steatosi associata all'HCV può influenzare la risposta al trattamento di una epatite cronica C?

Vari studi hanno suggerito un ruolo della steatosi nella risposta al trattamento antivirale. In un primo studio svedese (22) effettuato su 256 pazienti che avevano ricevuto la combinazione standard, la steatosi era associata all'assenza di risposta a lungo termine, ma solo nei pazienti infettati da parte di un genotipo 1 e nell'ambito di un'analisi univariata. Nell'analisi

multivariata, i soli fattori predittivi di risposta erano l'età, il sesso, il genotipo 2 o 3, e la negatività dell'RNA virale C nel siero 2 settimane dopo l'inizio del trattamento. In uno studio successivo (23), effettuato in Giappone su 394 pazienti tutti infettati da parte del genotipo virale C 2a, una steatosi moderata a severa era significativamente associata all'assenza di risposta a lungo termine. Questi due studi sono stati confermati da una recente, importante analisi multivariata su 1428 pazienti (24).

Conclusioni

In conclusione, nonostante la steatosi sia frequentemente associata all'infezione da HCV, la sua patogenesi non è sempre e necessariamente legata alla replicazione virale C intraepatica. Di conseguenza, la steatosi non virale risulta essere resistente al trattamento antivirale. Il contributo della steatosi (virale e non virale) alla progressione della fibrosi epatica, e quindi dell'epatite cronica C, è ben dimostrato. Tuttavia, la sua gestione terapeutica deve basarsi su di una migliore conoscenza dei meccanismi patogenetici alla base dell'accumulo di lipidi all'interno degli epatociti.

Bibliografia

1. Negro F, Krawczynski K, Quadri R, Rubbia-Brandt L, Mondelli M, Zarski JP, Hadengue A. Detection of genomic- and minus-strand of hepatitis C virus RNA in the liver of chronic hepatitis C patients by strand-specific semi-quantitative RT-PCR. *Hepatology* 1999;29:536-42.
2. Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection *Semin Liver Dis* 1995;15:70-81.
3. Mihm S, Fayyazi A, Hartmann H, Ramadori G. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology* 1997;25:735-9.
4. Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Male PJ, Mentha G, Spahr L, *et al.* Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 2000;33:106-15.
5. Serfaty L, Andreani T, Giral P, Carbonell N, Chazouilleres O, Poupon R. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:428-34.
6. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001;33:1358-64.
7. Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology* 2002;36:729-36.
8. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Mentha G, Quadri R, Negro F. Expression of liver steatosis in hepatitis C virus infection and pattern of response to alpha-interferon. *J Hepatol* 2001;35:307.
9. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, *et al.* 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.
10. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, *et al.* Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997;78:1527-31.
11. Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 2000;81:1913-25.

12. Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, Demaugre F, Kohara M, Matsuura Y, *et al.* Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* 1999;30:1064-76.
13. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002;16:185-94.
14. Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y, Okuda M, *et al.* Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002;122:352-65.
15. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002;122:366-75.
16. Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210.
17. Kumar D, Farrell GC, Fung C, George J. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes. Genotype-specific reversal of hepatic steatosis after sustained response to antiviral therapy. *Hepatology* 2002; in press.
18. Abid K, Rossi C, Latorre P, Rubbia-Brandt L, Hadengue A, Negro F. The core protein of HCV genotype 3a, 3h and 1b induces lipid accumulation in Huh7 cells. In: *Proceedings of the 9th International Meeting on HCV and Related Viruses*. San Diego, July 7-11, 2002. Abstract # P-166. p. 143.
19. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, Powell EE. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999;29:1215-9.
20. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995;22:1714-9.
21. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boda partei N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
22. Bjoro K, Bell H, Hellum KB, Skaug K, Raknerud N, Sandvei P, Doskeland B, Maeland A, Lund-Tonnesen S, Myrvang B. Effect of combined interferon-alpha induction therapy and ribavirin on chronic hepatitis C virus infection: a randomized multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:226-32.
23. Akuta N, Suzuki F, Tsubota A, Suzuki Y, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of interferon monotherapy to 394 consecutive naive cases infected with hepatitis C virus genotype 2a in Japan: therapy efficacy as consequence of tripartite interaction of viral, host and interferon treatment-related factors. *J Hepatol* 2002;37:831-6.
24. Poynard T, Ratziu V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, Zeuzem S, Younossi Z, Albrecht J. Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 2003;38.

Tavola rotonda
Immunopatogenesi

Moderatori: *M. Levriero, M. Mondelli*

VACCINATION AND IMMUNOLOGICAL MEMORY

Antonio Lanzavecchia

Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland

Vaccination acts by inducing the clonal expansion and differentiation of antigen specific lymphocytes that persist for a lifetime as memory cells. Memory cells mediate two functions: they confer immediate protection in peripheral tissue and mount recall responses in secondary lymphoid organs. These functions are carried out by distinct cell types. In the B lymphocyte system protective memory is mediated by plasma cells that secrete antibodies, while reactive memory is mediated by memory B cells that are present in lymphoid organs and proliferate and differentiate to plasma cells in response to secondary antigenic stimulation. A similar division of labour has been recently defined for T lymphocytes. Protective memory is mediated by effector memory T cells (T_{EM}) that home to inflamed peripheral tissues and display immediate effector function, while reactive memory is mediated by a distinct subset of central memory T cells (T_{CM}) that retain lymph node homing receptors and high proliferative capacity in response to antigenic challenge.

I will review the experimental evidence supporting a “stem cell model” of immunological memory. Memory B cells and central memory T cells are intermediates of a progressive differentiation process, which have acquired the capacity to proliferate and differentiate in response to polyclonal stimuli such as cytokines, microbial products or bystander T cell help. While self renewing, memory B cells and central memory T cells continuously spill out plasma cells and effector T cells, thus replenishing those that turn over. Furthermore I will describe in details the mechanisms that sustain serum antibody levels following vaccination and discuss the implications of these findings for vaccine design.

RISPOSTA IMMUNE ANTI-HCV

Carlo Ferrari, Gabriele Missale, Simona Urbani
Divisione Malattie Infettive ed Epatologia, Azienda Ospedaliera di Parma

HCV (Hepatitis C Virus) è un virus prevalentemente non citopatico, che riesce a persistere cronicamente nell'organismo infettato con grande efficienza (1). Le infezioni croniche da HCV rappresentano pertanto un problema socio-sanitario di primaria importanza, per il quale risulta fondamentale lo sviluppo di strategie preventive efficaci e di approcci terapeutici innovativi che possano permettere di migliorare ulteriormente l'efficacia delle terapie attualmente disponibili. In questa prospettiva, la conoscenza dei meccanismi patogenetici di danno epatico e di persistenza virale in corso di infezione da HCV rappresenta un requisito essenziale per conseguire la base di conoscenze necessaria per disegnare vaccini e terapie razionali.

Lo studio dell'immunità adattativa nelle fasi precoci di infezione indica che le risposte cellulo-mediate e umorali risultano dimostrabili, sia in corso di infezione naturale che nei modelli animali disponibili, solo dopo numerose settimane dal momento dell'infezione (2-9). I dati di cinetica virale dimostrano che HCV inizia a replicare attivamente subito dopo l'infezione, raggiungendo in pochi giorni elevate concentrazioni sieriche, che vengono mantenute o di poco incrementate nelle settimane successive (2, 5, 8, 10, 11). Quindi, le risposte immunitarie specifiche sembrano ignorare per alcune settimane alte concentrazioni di virus e di antigeni presenti nell'organismo infettato. Questo ritardo di comparsa delle risposte adattative nel sangue non sembra imputabile ad una preferenziale sequestrazione epatica dei linfociti, perché anche le risposte linfocitarie intraepatiche studiate nel modello dello scimpanzé mostrano la stessa cinetica di evoluzione (4).

In considerazione del ruolo essenziale svolto dal sistema immunitario innato non solo nel favorire il contenimento iniziale dell'infezione, ma anche nel permettere un'attivazione pronta ed efficiente delle risposte virus-specifiche, è ovvio domandarsi quale sia il comportamento dell'immunità innata in corso di infezione da HCV. I limitati dati disponibili indicano che la produzione di interferone di tipo I viene rapidamente indotta da HCV, con una cinetica sovrapponibile a quella di replicazione e diffusione del virus (12, 13), suggerendo che HCV sia un buon induttore di interferone. Tuttavia, il virus sembrerebbe avere sviluppato strategie per interferire con l'attività delle principali componenti del sistema immunitario innato. Esperimenti *in vitro* hanno mostrato infatti che le proteine E2 e NS3/4A di HCV sono in grado di inibire, attraverso meccanismi differenti, l'azione anti-virale dell'IFN (14, 15). Inoltre, la proteina E2 possiede *in vitro* un effetto inibitorio sulla funzione delle cellule NK (16, 17), interagendo sulla superficie di tali cellule con la molecola CD81, una tetraspannina descritta quale possibile recettore di HCV (18). Se l'attivazione e la funzione delle cellule NK è deficitaria, questo potrebbe riflettersi sulla maturazione delle cellule dendritiche, che si sa essere influenzata dall'interferone di tipo I e dall'interazione con le cellule NK stesse (19, 20). Inoltre, proteine virali, quali l'antigene core, sembrano capaci di inibire la maturazione delle cellule dendritiche (21). È pertanto possibile, anche se non provato direttamente, che le alte concentrazioni di virus che vengono rapidamente raggiunte nelle fasi iniziali dell'infezione possano innescare una serie di eventi, che potrebbero influenzare la maturazione delle cellule dendritiche (22,23) e la loro capacità di migrare verso i linfonodi e di indurre un'efficiente attivazione delle risposte T linfocitarie.

Nella fase precoce dell'infezione le risposte T linfocitarie non risultano soltanto ritardate, ma sembrano essere anche funzionalmente deficitarie. Uno studio longitudinale condotto in soggetti

infettati accidentalmente in seguito a puntura con aghi infetti indica infatti che i linfociti CD8 risultano dimostrabili nel sangue dopo 8-10 settimane dal momento dell'infezione, ma appaiono transitoriamente incapaci di esprimere IFN- γ (2). Ulteriori studi longitudinali eseguiti dal momento della presentazione clinica dell'infezione acuta confermano che i linfociti CD8 HCV-specifici risultano funzionalmente deficitari, in termini di proliferazione, attività litica, espressione di perforine e IFN- γ , indipendentemente dall'esito successivo dell'infezione (25-27). Esaurimento funzionale da alte concentrazioni di antigene, difetti funzionali dell'immunità innata, effetto inibitorio diretto di proteine virali, quale l'antigene core di HCV (28, 29), emergenza di mutazioni in regioni del virus immunologicamente rilevanti, capaci di permettere al virus di sfuggire al controllo immunitario (30-34), potrebbero contribuire all'inibizione funzionale delle risposte CD8 HCV-specifiche. Tale inibizione sarebbe selettiva per le risposte HCV-specifiche, come d'altronde suggerito indirettamente dall'assenza di manifestazioni cliniche associate di immunodepressione generalizzata nei pazienti con infezione da HCV. Mentre i linfociti dei pazienti che riescono a controllare il virus e a risolvere l'epatite recuperano un livello efficiente di funzione anti-virale, la depressione funzionale linfocitaria persiste invece nei pazienti che vanno incontro a cronicizzazione dell'infezione (26). Una simile differenza fra pazienti che risolvono e pazienti che cronicizzano l'infezione è dimostrabile anche per le risposte CD4-mediate, che risultano significativamente più intense in chi riesce a controllare spontaneamente il virus (35, 36).

Una volta che la cronicità si è instaurata, le risposte immunitarie virus-specifiche risultano depresse e le alte concentrazioni di virus e antigene svolgono probabilmente un ruolo fondamentale nel mantenimento di questa condizione di inibizione funzionale. In questa situazione, se da una parte la stimolazione delle risposte immunitarie virus-specifiche può rappresentare una strategia razionale di terapia, il problema maggiore risulta tuttavia quello di ripristinare la responsività dei linfociti in una condizione di persistente contatto con alte dosi di antigene. Il recupero funzionale dei linfociti T a seguito di terapia anti-virale in un'analoga condizione di epatite cronica causata da un altro virus capace di persistere cronicamente nell'organismo infettato, quale HBV (37, 38), suggerisce che il controllo della replicazione virale e la riduzione della viremia potrebbe rappresentare la strategia ottimale per ripristinare la suscettibilità dei linfociti a stimoli esogeni, prima di somministrare vaccini o immunoterapie volte a stimolarne la funzione effettrice.

Bibliografia

1. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
2. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-406.
3. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, *et al.* Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1999;116:135-43.
4. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purecell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15661-8.
5. Major ME, Mihalik K, Fernandez J, Seidman J, Kleiner D, Kolykhalov AA, Rice CM, Feistone SM. Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* 1999;73:3317-25.
6. Major ME, Mihalik K, Puig M, Rehmann B, Nascimbeni M, Rice CM, Feistone SM. Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol* 2002;76:6586-95.

7. Bassett SE, Brasky KM, Lanford RE. Analysis of hepatitis C virus-inoculated chimpanzees reveals unexpected clinical profiles. *J Virol* 1998;72:2589-99.
8. Bassett SE, Guerra B, Brasky K, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR, Lanford RE. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* 2001;33:1479-87.
9. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, Walzer CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2003;197:1645-55.
10. Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J, Wong DC, Shapiro M, Popkin T, Houghton M, Alter HS, Purcell LH. Early events in hepatitis C virus infection of chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6441-4.
11. Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003;38:4-13.
12. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-66.
13. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Buck J, Purcell RH, Schultz PG, Chiari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15669-74.
14. Taylor D, Shi S, Romano P, Barber G, Lai M. Inhibition of interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-10.
15. Foy E, Wang K, Sumpter R, Ikeda M, Lemon SM, Gale M. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-8.
16. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi P, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35-41.
17. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-49.
18. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
19. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195:335-341.
20. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002;12:957-64.
21. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrascueta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002;76:5062-70.
22. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, *et al.* Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999;162:5584-91.
23. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001;120:512-24.
24. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001;97:3171-6.
25. Lechner F, Wong D, Dunbar P, Chapman R, Chung R, Dohrenwend P, Robbins G, *et al.* Analysis of successful immune responses in person infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-512.

26. Urbani S, *et al.* Virus-Specific CD8(+) Lymphocytes Share the Same Effector-Memory Phenotype but Exhibit Functional Differences in Acute Hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76:12423-34.
27. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, *et al.* Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001;75:5550-8.
28. Large M, Kittlesen D, Hahn Y. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999;162:931-8.
29. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000;106:1239-49.
30. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, *et al.* The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001;15:883-95.
31. Wang H, Eckels DD. Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J Immunol* 1999;162.
32. Frasca L, Del Porto P, Tuosto L, Marinari B, Scotta C, Carbonari M, Nicosia A, *et al.* Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J Immunol* 1999;163:650-8.
33. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, Bonino F, *et al.* Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3468-72.
34. Tsai S-L, Chen Y-M, Chen M-H, Huang C-Y, Sheen I-S, Yeh C-T, Huang J-H, *et al.* Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998;115:954-66.
35. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi M, *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;98:706-14.
36. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga E, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, *et al.* Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-7.
37. Boni C, Bertoletti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, *et al.* Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-75.
38. Boni C, Penna A, Ogg G, Bertoletti A, Pilli M, Cavalli A, Urbani S, *et al.* Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspective for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-71.

MANIFESTAZIONI AUTOIMMUNI

Francesco B. Bianchi

Medicina Interna, Università degli Studi di Bologna, Bologna

Evidenze sperimentali prodotte dal gruppo di Abrignani indicano che il doppio contatto della proteina E2 (ricombinante) di HCV e di un anticorpo monoclonale anti CD81 col complesso B linfocitario di costimolazione (CD81/CD 19/CD21) induce un'espansione clonale di cellule B naïve (CD27-). Queste osservazioni suggeriscono, da un lato una via di attivazione B che è indipendente dal B cell receptor; dall'altro, che il legame particella HCV-CD81 *in vivo* è determinante per l'attivazione policlonale B presente in molti casi di infezione da HCV (Hepatitis C Virus) e, quindi, può rappresentare un importante cofattore per lo sviluppo di disordini autoimmuni che vanno dalla semplice emergenza di fenomeni di autoreattività (autoanticorpi) alla comparsa di manifestazioni anche clinicamente rilevanti.

Autoanticorpi sierici

Si riscontrano nel 30% dei casi di infezione da HCV e si associano al sesso femminile e a più elevata attività biochimica di malattia (1). Si tratta di reattività antinucleari (ANA), anti muscolo liscio (SMA) e anti microsomi di fegato e rene (anti-LKM1), qualitativamente indistinguibili dalle stesse che marcano l'epatite autoimmune di tipo 1 e 2, ma presenti a titolo significativamente inferiore.

L'autoanticorpo più noto è l'anti-LKM1, che reagisce con l'isoforma 2D6 del citocromo P450 (CYP2D6) sia quando autoimmune "primario", sia quando associato all'infezione da HCV (2). Nostre osservazioni hanno dimostrato che la proteina target è espressa sulla membrana di epatociti vitali isolati ed è pertanto accessibile agli effettori immuni (3). Il numero di epatociti positivi per antigeni dell'HCV (studiati con tecnica immunomorfologica) (4) è significativamente più basso nei soggetti con infezione da HCV, positivi per anti-LKM1, rispetto ai negativi per l'anticorpo e il dato è indipendente dal genotipo virale infettante; nelle stesse biopsie il numero di linfociti lobulari CD8 positivi è significativamente più elevato. Queste osservazioni suggeriscono la possibilità che nei 2 sottogruppi di pazienti HCV positivi, rispettivamente anti-LKM1 positivi e negativi, siano operativi meccanismi patogenetici in parte diversi. L'emergenza di autoreattività anti-CYP2D6 è stata interpretata sulla base di un meccanismo di molecular mimicry in base alla dimostrazione dell'omologia di brevi sequenze aminoacidiche tra CYP2D6 (aa. 258-271) da un lato e proteine E1 (aa. 316-321) e NS5 dell'HCV (aa. 2771-2779) dall'altro. Nostre osservazioni in collaborazione col gruppo di Alberti hanno inoltre dimostrato, nei soggetti anti-LKM1 positivi, la presenza di sostituzioni nella regione 5' UTR di HCV di genotipo 2 (5).

Il dilemma della decisione terapeutica dei casi di epatite HCV-correlata con manifestazioni autoreattive (steroidi ± azatioprina o interferone ± ribavirina) può considerarsi superato: orienta alla decisione "steroids first" il raggiungimento del punteggio indicativo di epatite autoimmune "probabile" o "definita" calcolando lo score cumulativo proposto dall'International Autoimmune Hepatitis Group nel 1999 (6). La positività anti-LKM1 deve indurre l'attuazione di uno stretto monitoraggio dei pazienti trattati con interferon alla luce di osservazioni di flare epatitici importanti in corso di trattamento (7).

Crioglobulinemia e sindrome crioglobulinemica

Crioglobulinemia (Cg) (formazione di crioprecipitato ponendo il siero a 4°C) e sindrome crioglobulinemica (SCg) (astenia, porpora palpabile, artralgie ± glomerulonefrite più spesso membranoproliferativa ± neuropatia sensitivo-motoria) rappresentano il complesso quadro ritenuto in passato “essenziale”, oggi strettamente associato all’infezione da HCV. L’inserimento di tale patologia nell’ambito delle manifestazioni autoimmuni è motivato dal fatto che si caratterizza per la presenza di autoanticorpi, rispettivamente IgM policlonali (Cg di tipo III, più frequente) ovvero IgM monoclonali (nell’80% dei casi IgM κ, Cg di tipo II), in entrambi i casi dirette contro IgG policlonali a specificità anti-HCV. Cg sono presenti nella metà circa dei soggetti con infezione cronica da HCV, la SCg è assai più rara (5-10% dei casi).

Sul versante dell’analisi delle caratteristiche del paziente con SCg nostre ricerche, recentemente confermate, hanno dimostrato una significativa associazione con gli alleli HLA B8/DR3 (8); sul versante della caratterizzazione del virus infettante abbiamo dimostrato, in collaborazione col gruppo di Alberti, inserzioni e delezioni a livello di HVR 1 della proteina E2 di HCV di genotipo 1 nel 30% dei casi di soggetti con SCg (9).

È di frequente riscontro il fatto che i pazienti con SCg presentano un quadro epatico poco compromesso rispetto a quello dei pazienti con Cg senza sindrome clinica. Questa osservazione viene confermata da un nostro studio in corso di elaborazione da cui emerge che i soggetti con SCg hanno valori di ALT, γglobuline, IgG e prevalenza di cirrosi significativamente più bassi rispetto ai casi con Cg senza SCg.

Sindrome secca

L’infezione da HCV in pazienti con Sindrome Secca (SS) selezionati sulla base della positività dei marcatori immunologici classici (SS-A, SS-B) e senza crioglobulinemia è praticamente assente (10). La biopsia delle ghiandole labiali avrebbe tuttavia dimostrato la presenza di una sialadenite linfocitaria in soggetti con epatite cronica da HCV con un quadro istologico che ricorderebbe quanto osservato nella SS primaria (11). Nostre osservazioni confermano la presenza di foci di cellule mononucleate a livello delle ghiandole labiali di soggetti con epatite cronica da HCV; il quadro tuttavia appare quantitativamente e qualitativamente diverso da quanto osservato in corso di SS associata a cirrosi biliare primitiva. Autori giapponesi (12) hanno osservato la presenza di sialadenite che ricorda sul piano istologico la SS in topi transgenici per i geni dell’envelope dell’HCV. Sono state formulate le ipotesi che si tratti di una vasculite delle ghiandole salivari/lacrimali correlata alla presenza di crioglobulinemia o, alternativamente, una manifestazione clinica di un disordine linfoproliferativo HCV correlato (13).

Patologia tiroidea, HCV e terapia interferonica

È stato ripetutamente segnalato che la prevalenza dell’infezione da HCV nei pazienti affetti da patologia tiroidea autoimmune (tiroidite di Hashimoto, malattia di Graves) non si discosta da quella osservata nella popolazione generale della stessa area geografica. In uno studio spagnolo (14) la prevalenza di anticorpi anti-tiroide (anti-TPO, RIA) e di alterata funzione tiroidea

(ipotiroidismo più che ipertiroidismo) è risultata più elevata nei donatori di sangue HCV negativi che nei donatori risultati HCV positivi. L'infezione da HCV non sembra pertanto incidere sulla prevalenza delle alterazioni tiroidee, immunologiche e cliniche. Risulta invece chiaro dalla letteratura che il trattamento con interferone (IFN) induce alterazioni tiroidee nel 5-12% dei casi (anticorpi più spesso che alterazioni ormonali, a loro volta più frequenti delle manifestazioni cliniche). Il ruolo dell'IFN è confermato dal fatto che alterazioni tiroidee si osservano anche in soggetti con infezione da HBV e in soggetti con neoplasie ematologiche; l'ipotesi corrente è che l'IFN rivelerebbe una condizione di tiroidite autoimmune latente.

Bibliografia

1. Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Muratori P, Giostra F, Francesconi R, Muratori L, Lenzi M, Bianchi GP, Zauli D, Bianchi FB. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology* 1997;26:561-6.
2. Muratori L, Lenzi M, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D, Bianchi FB. Heterogeneity of liver/kidney microsomal antibody type 1 in autoimmune hepatitis and hepatitis C virus related liver disease. *Gut* 1995;37:406-12.
3. Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, Lenzi M, Landini MP, Albano E, Bianchi FB. Liver/Kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000; 46: 533-61.
4. Ballardini G, Groff P, Giostra F, Francesconi R, Miniero R, Ghetti S, Zauli D, Bianchi FB. Hepatocellular codistribution of c100, c33, c22 and NS5 HCV antigens detected by using immunopurified polyclonal spontaneous human antibodies. *Hepatology* 1995;21:730-4.
5. Gerotto M, Pontisso P, Giostra F, Francesconi R, Muratori L, Ballardini G, Lenzi M, Tisminetzky S, Bianchi FB, Baralle FB, Alberti A. Analysis of hepatitis C virus genome in patients with anti-LKM1-1 autoantibodies. *J Hepatol* 1994;21:273-6.
6. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Demet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL; Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, McSween RN, Maddrey WC, Mnns MP, McFarlane IG, Meyer zum, Buschenfelde KH, Zeniya M.. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-38.
7. Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, Giostra F, Cassani F, Ballardini G, Zauli D, Bianchi FB. Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994;21:199-203.
8. 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;91:2062-6.
9. Gerotto M, Dal Pero F, Loffreda S, Bianchi FB, Alberti A, Lenzi M. A 385 insertion in the hypervariable region of hepatitis C virus E2 envelope protein is found in some patients with mixed cryoglobulinemia type II. *Blood* 2001;98:2657-63.
10. King P, McMurray RW, Becherer PR. Sjögren's syndrome without mixed cryoglobulinemia is not associated with hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1047-50.
11. Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Tinchet JP, Pateron D, Mal F, Callard P, Beaugrand M. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992;339:321-3.
12. Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Matsuura Y, Miyamura T. Sialoadenitis histologically resembling Sjögren's syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:233-6.

13. Zignego AL and Bréchet C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol* 1999;31:369-76.
14. Boadas J, Rodriguez-Espinosa J, Enriquez J, Millares F, Martinez-Cerezo F, Gonzalez P, Madoz P, Vilardell F. Prevalence of thyroid autoantibodies is not increased in blood donors with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1995;22:611-5.

MODELLI ANIMALI PER LO STUDIO DELLA PATOGENESI DELLE EPATITI B E C

Luca Guidotti

Dipartimento di Tecnologie Biomediche, San Raffaele Istituto Scientifico, Milano

I virus dell'epatite B (Hepatitis B Virus, HBV) e dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) causano epatiti acute e croniche, cirrosi epatica e carcinomi epatocellulari. Entrambi i virus, come il virus HIV, sono trasmessi per via sessuale, parenterale e da madre a figlio alla nascita. Nel mondo, oltre 500 milioni di persone sono cronicamente infetti da HBV e HCV. HBV da solo è causa di morte per circa un milione di persone ogni anno. Poiché questi virus non sono dotati di una attività citopatica diretta sull'epatocita, si ritiene che la risposta immunitaria cellulare agli antigeni virali sia responsabile tanto del danno epatico, quanto della rimozione (*clearance*) virale che accompagnano e seguono l'infezione da HBV e HCV. Invero, pazienti affetti da epatite virale acuta che vanno incontro ad una favorevole eliminazione del virus, presentano una risposta immunitaria policlonale CTL-multispecifica verso svariati antigeni di origine virale. Al contrario, questa risposta è assente o molto più debole in pazienti che, incapaci di eliminare il virus, vanno incontro a cronicizzazione. Pertanto l'esito dell'infezione da HBV o da HCV (rimozione o persistenza del virus) è principalmente da attribuire all'intensità e alla qualità della risposta immunitaria cellulare.

Un approccio sperimentale a studi sulla patogenesi delle malattie epatiche indotte da HBV e HCV è risultato difficile sia perché gli adatti ospiti infettabili con i virus sono limitati all'uomo e allo scimpanzé, sia perché non esistono metodi per la propagazione *in vitro* dei virus. Ricerche sperimentali di questa natura richiedono lo sviluppo di un modello animale dotato di riproducibilità (animali *inbred*) di cui sia stato ben caratterizzato il sistema immunitario. Per tal ragione, in svariati anni di studi, abbiamo generato e caratterizzato topi transgenici che esprimono tutti i prodotti genici virali e che replicano HBV ad alti livelli nell'epatocita primario *in vivo*. Al contrario, non sono attualmente disponibili adeguati modelli murini capaci di replicare HCV, con il risultato di una assai ridotta conoscenza sulla patogenesi della malattia epatica indotta da questo virus.

HBV: patogenesi

Abbiamo generato due linee (1.3.32 e 1.3.46) di topi transgenici per HBV, i cui epatociti replicano il virus ad alti livelli, senza alcuna evidenza di effetti citopatici (1). Questi linee murine sono state prodotte mediante microiniezione di un costrutto terminalmente ridondante di DNA genomico del virus 1.3 HBV, contenente solo elementi regolatori virali, in assenza di promotori cellulari. Dei quattro HBV-RNA trascritti nel fegato di questi animali, i due più abbondanti prodotti di trascrizione del transgene sono il 3.5-kb e il 2.1-kb RNA, facilmente evidenziabili mediante analisi di Northern blotting (1). Il 3.5-kb RNA (RNA pregenomico) è retrotrascritto dalla polimerasi virale negli intermediari replicativi del DNA HBV che si evidenzia come uno *smear* (striscio) quando analizzato in Southern blotting (1). La replicazione di HBV avviene all'interno di particelle nucleocapsidiche virali, particolarmente abbondanti negli epatociti centrolobulari. Come conseguenza di una efficiente replicazione virale, ultrastrutturalmente completa e infettiva (2), le particelle virali, morfologicamente

indistinguibili dai virioni di derivazione umana, sono riscontrabili in elevata concentrazione (10^7 - 10^8 particelle virali per ml) nel siero del topo transgenico. Questo risultato conferma ulteriormente che il ciclo vitale dell'HBV può essere efficacemente completato nell'epatocita del topo transgenico (1).

In questo modello abbiamo valutato gli effetti antivirali e immunopatologici del riconoscimento antigenico mediante somministrazione di CTL virus-specifici. Inizialmente è stato usato un clone CTL H2^d-ristretto (denominato 6C2) che riconosce un epitopo CTL-dominante localizzato tra i residui 28 e 39 di HbsAg. In esperimenti successivi abbiamo studiato le funzioni effettrici citopatiche e antivirali una varietà di cloni CTL specifici per lo stesso epitopo o diretti verso epitopi indipendenti di proteine HBV dell'involucro, del nucleotide e della polimerasi.

Meccanismi antivirali

Sorprendentemente, nel nostro modello di topo transgenico il potenziale antivirale dei CTL si è dimostrato principalmente mediato da meccanismi non citolitici associati alla produzione intraepatica di citochine infiammatorie di tipo I da parte dei CTL (3-5). Queste citochine attivano due cammini ad azione antivirale, funzionalmente indipendenti: un cammino, attivo in tempi rapidi, che elimina dall'epatocita le particelle nucleocapsidiche HBV e il loro carico di genomi virali in replicazione (3,6) e un cammino meno precoce che, con meccanismo post-trascrizionale, riduce l'RNA virale (7). In studi recenti, abbiamo dimostrato che IFN- γ promuove la maggior parte degli effetti antivirali dei CTL (8) e la maggior parte dell'attività antivirale di IFN- γ è mediata dall'ossido nitrico (9).

Gli studi descritti consentono di anticipare che le risposte infiammatorie non-specifiche del fegato contro HBV possono facilitare la rimozione del virus se inducono una produzione locale di citochine antivirali (come IFN- γ e IFN- α/β) a cui HBV sia suscettibile. E, in effetti, questi stessi eventi anti-virali si evidenziano in topi transgenici HBV durante infezioni epatotropiche non correlate come le infezioni da virus della coriomeningite linfocitica (LCMV), da adenovirus e da citomegalovirus murino (MCMV) (8,10,11) o dopo somministrazione di interleuchina murina ricombinante (IL)-12, una citochina prodotta da cellule APC (antigen-presenting cells) che induce la secrezione di IFN- γ da parte di cellule T, cellule NK (*natural killer*) e NKT (12). In questo contesto, abbiamo anche dimostrato che una singola iniezione di α -galattosilceramide (α -GalCer), un antigene glicolipidico presentato a cellule T NK1.1⁺ V α 14⁺ da parte di non-classiche molecole MHC [simil-classe I CD1d], inibisce la replicazione di HBV per diretta attivazione di cellule NKT a produrre IFN- γ nel fegato (13,14). Inoltre, abbiamo evidenziato che in questi animali transgenici la replicazione di HBV è inibita dalla somministrazione sistemica di dosi molto elevate di IFN- γ o di IFN- α (8). Invero, la minima dose di IFN- α richiesta per l'inibizione della replicazione epatica di HBV nel nostro modello è compresa tra 1×10^5 e 5×10^5 unità/topo, quando il regime standard di trattamento con IFN- α di pazienti infettati cronicamente è di circa 3×10^6 unità al giorno per 10 giorni. Una dose di 3×10^6 nell'uomo corrisponde ad circa 1×10^3 unità/topo in topi di 25 g, dose che non avrebbe attività antivirale come singola dose nel nostro modello. Questi risultati suggeriscono che il trattamento dell'infezione HBV cronica dell'uomo prenda in considerazione nuovi approcci terapeutici in grado di indurre la produzione di citochine antivirali nel sito di infezione.

Di interesse è anche l'evidenza da noi ottenuta sull'importanza dei meccanismi antivirali non citopatici nell'induzione della rimozione virale durante l'epatite acuta da HBV in scimpanzé, un risultato che conferma la validità delle conclusioni dedotte dagli studi sul topo transgenico in un modello di infezione naturale (2). Inoltre, recenti esperimenti con scimpanzé deprivati di cellule

CD8⁺ e infettati acutamente con HBV hanno dimostrato che i linfociti T CD8⁺ sono i principali effettori cellulari responsabili sia della clearance virale, sia della patogenesi della malattia epatica acuta da infezione con HBV e hanno confermato che la rimozione virale è mediata da funzioni effettrici non citolitiche e citolitiche della risposta immunitaria cellulare T-CD8⁺ (15).

In conclusione, i meccanismi antivirali citochina-dipendenti non citopatici descritti sopra appaiono far parte di una strategia generale di sopravvivenza dell'ospite per il controllo delle infezioni virali, particolarmente utile nel caso di infezioni massive di organi vitali. Future ricerche intese a definire gli eventi molecolari intracellulari indotti dalle citochine che controllano l'infezione virale non solo aumenteranno le nostre conoscenze sulle interazioni virus-ospite responsabili degli effetti patogeni dell'infezione, ma potrebbero inoltre individuare e indicare nuovi approcci terapeutici per il trattamento e l'eradicazione di virus persistenti quali HBV, HCV e HIV.

Meccanismi immunopatologici

In modelli di trasferimento CTL, la malattia epatica ha inizio con il riconoscimento di antigeni da parte dei CTL e con l'attivazione di cammini di segnalazione che promuovono la morte dell'epatocita per apoptosi (16). In seguito al riconoscimento antigenico i CTL richiamano nel fegato una varietà di cellule infiammatorie dell'ospite, contribuendo alla formazione di foci necro-infiammatori, principalmente costituiti da cellule infiammatorie linfomononucleate (linfociti, cellule NK, macrofagi) e polimorfonucleate (neutrofili, eosinofili). Nei foci queste cellule sono più numerose rispetto agli epatociti apoptotici e ai CTL che hanno dato inizio alla loro formazione (17). Queste lesioni focali necro-infiammatorie sono disseminate nel parenchima epatico e risultano morfologicamente indistinguibili dalle classiche lesioni osservabili nell'epatite virale dell'uomo (16). Il richiamo di cellule infiammatorie non specifiche, portatrici di antigeni dell'ospite, nel fegato è un processo associato ad una produzione intraepatica di chemochine e, verosimilmente, contribuisce alla patogenesi della malattia epatica. In effetti, abbiamo recentemente dimostrato che il blocco delle chemochine CXCL9 e CXCL10 riduce il richiamo intraepatico di cellule linfomononucleate derivanti dall'ospite e attenua la severità della malattia epatica (18). In questi studi abbiamo fornito evidenza che CXCL9 e CXCL10 sono rapidamente e intensamente indotte nel fegato dopo trasferimento di CTL. I CTL trasferiti non producono chemochine ma, attraverso la secrezione di IFN- γ , attivano epatociti e cellule non parenchimali del fegato a produrle (18). Sulla base di questi risultati è possibile concludere che nell'organo bersaglio la produzione di CXCL9 e CXCL10 comporta un elevato richiamo di cellule infiammatorie dell'ospite nel fegato infetto e il processo gioca un importante ruolo nella patogenesi della malattia epatica.

In studi recenti abbiamo anche messo in evidenza come la malattia epatica indotta dal trasferimento CTL sia resa meno severa da una preliminare deplezione dei neutrofili circolanti (19), ad indicare che queste cellule contribuiscono al processo patogenetico (19). Da notare che la deplezione di neutrofili non interferisce con la migrazione intraepatica dei CTL, né ha effetto sulla loro attività antivirale, mentre inibisce intensamente il richiamo nel fegato di tutte le cellule infiammatorie non antigene-specifiche, incluse le cellule linfomononucleate. Questi effetti si manifestano nonostante gli elevati livelli di espressione intraepatica dei geni per le chemochine. Ciò suggerisce che funzioni neutrofilo-dipendenti diverse dal controllo di espressione delle chemochine siano necessarie per promuovere il processo di richiamo delle cellule infiammatorie (19). Queste funzioni potrebbero comprendere la produzione di proteinasi degradanti la matrice (MMP), enzimi che sono noti facilitare la migrazione dei leucociti attraverso la barriera endoteliale e la matrice extracellulare. In accordo, svariate classi di MMP sono intensamente e rapidamente indotte nel fegato dei topi dopo trasferimento CTL e future

ricerche cercheranno di definirne il ruolo patogenetico nel nostro sistema sperimentale. In conclusione, il concetto che un ridotto richiamo di cellule infiammatorie derivanti dall'ospite nel fegato infetto possa essere associato ad una conservazione dell'azione anti-virale CTL-dipendente con contemporanea riduzione del danno cellulare potrebbe risultare di utile indicazione per definire potenziali approcci terapeutici al trattamento dell'epatite da HBV in pazienti cronicamente infetti.

HCV: patogenesi

Il virus dell'epatite C (HCV) è trasmesso per via transcutanea e mucosa. Il fegato è il principale organo interessato dall'infezione HCV e l'epatocita è il principale bersaglio cellulare del virus, sebbene anche varie popolazioni cellulari linfoidi, come cellule B e cellule dendritiche, possano essere infettate (20,21) sia pure a livelli meno elevati. Oltre 170 milioni di persone sono attualmente infette da HCV (22). L'infezione acuta da HCV è usualmente asintomatica, ciò che rende molto difficile una diagnosi durante gli stadi precoci dell'infezione. Una singolare, e sfavorevole, caratteristica dell'infezione a sua tendenza alla cronicizzazione: almeno il 70% delle infezioni acute evolve verso la persistenza. Inoltre, l'infezione cronica è frequentemente associata con importanti e severe malattie epatiche come l'epatite cronica attiva, la cirrosi e il carcinoma epatocellulare (22).

Verosimilmente anche l'andamento dell'infezione da HCV dipende dalle risposte immunitarie cellulari, ma la dinamica di tali risposte e il loro ruolo nel determinare la rimozione o la persistenza virale sono poco note. Generalmente, tuttavia, si ritiene che HCV sia un virus non-citopatico e che eventi immunologici associati all'infezione giochino un importante ruolo nella patogenesi della malattia da HCV. Anche in questo caso i meccanismi attraverso cui HCV causa un'epatite acuta o cronica, sono ancora poco chiari. Ciononostante, è stato dimostrato che l'inizio della rimozione virale e della malattia epatica coincidono con la comparsa della risposta cellulare T CD8⁺ e con l'ingresso di cellule T CD8⁺ nel fegato. Inoltre una primitiva incapacità di indurre una risposta cellulare T o un esaurimento funzionale di una risposta cellulare T inizialmente vigorosa sono associate a persistenza virale (23,24). Da notare che la distruzione delle cellule infette da parte delle cellule T CD8⁺ non è probabilmente la sola via di eliminazione del virus in quanto la rimozione virale può avvenire in assenza di malattia epatica allorché siano presenti cellule T CD8⁺ visus specifiche che producano citochine anti-virali come IFN- γ . Da ultimo, il fatto che il virus può persistere in presenza di una risposta cellulare T CD4⁺ e CD8⁺ multispecifica per progressiva evasione mutazionale da tale risposta sottolinea ulteriormente l'importanza della risposta immunitaria nella rimozione virale e nella patogenesi della malattia durante l'infezione da HCV.

Le basi virologiche e immunologiche della sopravvivenza di HCV in presenza di una risposta immunitaria CTL CD8⁺ sono attualmente mal definite. Recenti risultati ottenuti in esperimenti con scimpanzé infettati con HCV hanno tuttavia chiarito alcuni importanti aspetti dell'interazione virus-ospite durante l'infezione acuta da HCV (23): (a) l'infezione precede la risposta immunitaria di varie settimane; (b) HCV è un potente induttore di interferone tipo 1, ma è relativamente resistente alla sua attività antivirale; (c) la risposta cellulare T CD4⁺ e CD8⁺ intraepatica al virus e la produzione di IFN- γ mRNA nel fegato correlano con l'andamento dell'infezione; (d) la rimozione virale e il "controllo" del virus si manifestano in risposta a titoli viremici relativamente alti che inducono una precoce, vigorosa e multispecifica risposta cellulare T intraepatica con produzione di IFN- γ ; (e) una infezione incontrollata e persistente si manifesta in condizioni di viremia a basso titolo e in assenza di una risposta cellulare T

intraepatica o per insufficiente produzione di IFN- γ . Infine, i risultati di questi esperimenti suggeriscono che, sebbene l'infezione possa essere in vario grado controllata dalla distruzione delle cellule infette, un suo completo controllo potrebbe richiedere anche l'intervento di funzioni effettrici non citolitiche come la produzione di citochine ad attività antivirale.

Conclusioni

In conclusione, la rimozione virale durante l'infezione da HCV è associata con l'induzione di una vigorosa e multispecifica risposta T-cellulare a localizzazione intraepatica capace di una elevata produzione di IFN- γ . Al contrario, la risposta T-cellulare risulta notevolmente attenuata nei soggetti in cui l'infezione evolve verso la cronicizzazione e, in molti di questi pazienti, un'evasione mutazionale del virus alla risposta immunitaria si manifesta precocemente durante l'infezione acuta. Inoltre, la risposta cellulare T CD8⁺ che può essere riscontrata in soggetti cronicamente infetti è spesso deteriorata sia per la sua inefficiente o ridotta localizzazione intraepatica, sia per una insufficiente produzione di IFN- γ . Futuri studi saranno chiaramente necessari per alla definizione dei meccanismi tramite i quali HCV può evadere o sopprimere la risposta immunitaria e stabilire l'infezione cronica.

Ringraziamenti

Queste ricerche sono state eseguite presso The Scripps Research Institute e finanziate dal grant AI40696 del National Institutes of Health, USA.

Bibliografia

1. Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV. High level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1995;69:6158-69.
2. Guidotti LG, Rochford R, Chung L, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-9.
3. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996 4:25-36.
4. Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 2000;273:221-7.
5. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.
6. Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of IFN- α/β eliminates viral RNA-containing capsids in HBV transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-73.
7. Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, Chisari FV. Post-transcriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:12398-402.
8. McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Relative sensitivity of hepatitis B virus and other hepatotropic viruses to the antiviral effects of cytokines. *J Virol* 2000;74:2255-64.
9. Guidotti LG, McClary H, Moorhead Loudis J, Chisari FV. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Exp Med* 2000;191:1247-52.

10. Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, Matzke B, Gresser I, Oldstone MBA, Chisari FV. Viral cross talk: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4589-94.
11. Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Inhibition of hepatitis B virus replication during adenovirus and cytomegalovirus infections in HBV transgenic mice. *J Virol* 1998;72:2630-7.
12. Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in HBV transgenic mice. *J Virol* 1997;71:3236-43.
13. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication In vivo *J Exp Med* 2000;192:921-30.
14. Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001;167:6701-5.
15. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghrayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:68-76.
16. Ando K, Guidotti LG, Wirth S, Ishikawa T, Missale G, Moriyama T, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang S, Chisari FV. Class I restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol* 1994;152:3245-53.
17. Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, Huang S, Chisari FV. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993;178:1541-54.
18. Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1755-66.
19. Sitia G, Isogawa M, Kakimi K, Wieland SF, Chisari FV, Guidotti LG. Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13717-22.
20. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999;162:5584-91.
21. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001;97:3171-6.
22. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17-35.
23. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15661-8.
24. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-406.

Tavola rotonda
Monitoraggio dell'infezione e della malattia

Moderatori: *P. Pontisso, M. Chiaramonte*

ISTOPATOLOGIA DELL'EPATITE C

Francesco Callea
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Negli ultimi 10 anni la classificazione dell'epatite cronica HCV-correlata è stata oggetto di un'attenta revisione, tanto che l'approccio istologico oggi usato è molto diverso da quello che distingueva, in base alla morfologia, un'epatite cronica persistente (CPH) e un'epatite cronica aggressiva (CAH), attribuendo loro un significato prognostico.

Fino a qualche tempo fa le diagnosi istologiche si rifacevano infatti a queste due entità che, tuttavia, possono coesistere in una stessa sezione istologica.

Attualmente le terminologie di CPH e CAH non vengono più usate, anche se in letteratura spesso vengono citate tra parentesi, sia per evitare una confusione di termini, che per mantenere vivi nella memoria degli addetti ai lavori quei vecchi punti di riferimento che non solo concettualmente, ma anche di fatto costituiscono dei capisaldi ai fini diagnostici.

La classificazione di un quadro istologico richiede tuttavia sempre un'accurata valutazione.

Un infiltrato infiammatorio abbastanza denso, contenuto in uno spazio portale per almeno $\frac{3}{4}$ della sua periferia e che lascia fuoriuscire in un punto, oltre la lamina limitante che viene erosa, elementi linfoidi, è suggestivo per esempio di epatite periportale, corrispondente a piecemeal necrosis nella vecchia terminologia.

Per contro, un infiltrato infiammatorio perfettamente contenuto rispetto alla lamina limitante, che non mostra propensione a fuoriuscire nel parenchima, sottende un'epatite portale. Entrambi questi quadri rientrano nello spettro di epatite attiva, in cui all'epatite portale, sebbene non presenti piecemeal necrosis, viene attribuita un'attività molto lieve e all'epatite periportale un'attività leggermente maggiore. Entrambi, allo stesso modo, non hanno un significato prognostico pre-costituito se sganciati da altri contesti, quale per esempio l'eziologia, che deve essere presa subito in considerazione quando si classifica un'epatite. Solo in seguito, infatti, ha senso fissare un grado di attività, cioè andare a valutare quei parametri che sono ritenuti significativi da un punto di vista patogenetico e che si riconducono sostanzialmente all'intensità dell'infiltrato infiammatorio presente nello spazio portale, al grado di erosione della lamina limitante, alla presenza di un'eventuale necrosi compresa tra due spazi portalari, detta "necrosi a ponte", come pure alla presenza di focolai di necrosi intralobulare, denominata *spotty necrosis*.

Attualmente, questi parametri necro-infiammatori sono stati integrati dal concetto di grading, che classifica appunto l'intensità dei processi necro-infiammatori.

La valutazione globale della fibrosi, nel disturbo architetturale e della cirrosi, nelle più recenti classificazioni riguardanti le epatiti, è stata invece scorporata da questi indici necro-infiammatori, facendo capo a dei punteggi separati che rientrano nel concetto di *staging*.

RUOLO DELL'ECOTOMOGRAFIA

Luigi Bolondi

Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia, Università di Bologna

L'epatocarcinoma (HCC) è attualmente riconosciuto come la più importante causa di morte nel paziente cirrotico. Dati epidemiologici recenti e le conoscenze acquisite sulla storia naturale dell'infezione da HCV, suggeriscono per i prossimi anni un progressivo incremento della frequenza di questa neoplasia, almeno negli Stati Uniti e nei Paesi dell'Europa occidentale. Per queste ragioni è assolutamente indispensabile stabilire definite strategie d'intervento per la diagnosi precoce della malattia, a uno stadio in cui i trattamenti curativi possono ancora essere effettuati.

L'ecografia è da sempre stata considerata un mezzo diagnostico affidabile per l'epatocarcinoma in cirrosi, anche se studi recenti, che utilizzano il fegato spiantato come gold standard, hanno rilevato una sensibilità diagnostica relativamente bassa, peraltro non molto dissimile da quella della TC spirale e della MR. Nei programmi di screening e di sorveglianza l'ecografia è comunque unanimemente accettata come metodica di 1 livello e viene seguita generalmente a intervalli semestrali insieme al dosaggio dell'Alfafetoproteina (AFP). Nonostante vi siano tutte le premesse per determinare l'efficacia dello screening ecografico dell'epatocarcinoma in cirrosi (presenza di popolazione a rischio, disponibilità di metodiche non invasive e ben accette dalla popolazione, trattamenti curativi), l'efficacia dello screening ecografico è tuttora dibattuta. Vi è però oggi unanime consenso sul fatto che uno studio randomizzato controllato, che confronti pazienti screenati e non screenati, non è praticamente realizzabile e non sarebbe neppure etico. Ciò nonostante in tutti i centri di epatologia i cirrotici vengono periodicamente esaminati con ecografia anche allo scopo di rilevare altre complicanze della malattia. Tale prassi si è ormai consolidata nella pratica clinica anche in assenza di trial controllati che ne dimostrassero definitivamente l'efficacia nel prolungare la sopravvivenza o nel migliorare la qualità di vita. Il problema su cui si sta lavorando attualmente non è pertanto quello di decidere se effettuare o no lo screening, ma piuttosto quello di risolvere i seguenti punti critici: possono i pazienti essere stratificati a seconda del rischio di sviluppare HCC? In caso affermativo, è possibile ipotizzare differenti strategie di screening a seconda del rischio? Quali sono le metodiche migliori per effettuare lo screening? Quali sono le metodiche migliori per confermare un risultato positivo delle metodiche di screening? Le risposte a questi quesiti sono ancora incerte, poiché i dati presenti in letteratura sono basati su studi retrospettivi caso/controllo o su studi di coorte, e solo raramente su studi prospettici, che comunque analizzano per confronto controlli contemporanei non randomizzati. Da questi sembra peraltro emergere il dato favorevole di un significativo incremento di pazienti trapiantati e con lunghe sopravvivenze tra i pazienti provenienti da programmi di screening (1).

Per quanto riguarda la metodica di 1° livello l'ecografia convenzionale è ancora considerata la tecnica di riferimento, anche se in studi recenti la TC spirale con mdc ha dimostrato una superiore sensibilità diagnostica. Per la conferma della diagnosi sta sempre più acquistando credibilità l'angioecografia perfusionale con mezzo di contrasto, che viene effettuata mediante una nuova generazione di apparecchiature ecografiche in grado di produrre immagini basate sulle frequenze in 2a armonica prodotte dalla somministrazione di mezzi di contrasto ecografici. Tale metodica consente, oggi, di valutare con notevole sensibilità la vascolarizzazione patologica degli epatocarcinomi confermando la natura neoplastica delle lesioni visualizzate

all'ecografia convenzionale e di meglio definire eventuali coinvolgimenti della vascolatura intraepatica da parte della neoplasia.

Bibliografia

1. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, Piscaglia F, Gramantieri L, Zanetti M, Serrn M. Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis. *Gut* 2001;48:251-9.

SECONDA SESSIONE

**Trasmissione, storia naturale
e terapia dell'infezione da HCV**

Moderatori: *E. Villa, A. Attili*

LA TERAPIA DELL'INFEZIONE DA HCV: CONSENSO, CONTROVERSIE E PROSPETTIVE

Alfredo Alberti

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

Premessa

Fino ad alcuni anni fa, la terapia dell'epatite cronica HCV-correlata era basata sull'impiego di interferone alfa somministrato tre volte alla settimana. L'efficacia del trattamento, misurata in termini di risposta biochimica (normalizzazione delle transaminasi) e virologica (negativizzazione dell'HCV-RNA sierico) mantenute anche dopo la sospensione della terapia, era ottenibile in circa il 10-20% dei pazienti. Vari studi condotti nella seconda metà degli anni 90 hanno dimostrato che la combinazione dell'IFN alfa con la Ribavirina, un analogo nucleosidico a somministrazione orale, permette di migliorare le percentuali di risposta al trattamento rispetto all'IFN in monoterapia ed è stata pertanto assunta come terapia standard dell'epatite C nel 1999. La percentuale di risposta con la terapia di combinazione variava tra il 29 ed il 40%, in relazione alla durata del trattamento ed alla presenza di fattori predittivi negativi di risposta alla terapia, come il genotipo 1b e un'elevata viremia. Successivamente sono emersi dati sempre più evidenti su alcuni limiti dell'IFN alfa tradizionale, legati ad alcune caratteristiche di farmacocinetica. L'interferone alfa presenta, infatti, una breve emivita (4-6 ore) e, nonostante venga somministrato tre volte alla settimana, già il giorno dopo la somministrazione non è più dosabile in circolo. Nello stesso periodo temporale, il virus può riprendersi in termini di attività replicativa ed anche raddoppiare la sua concentrazione.

Appariva chiaro quindi come fosse necessario tentare di ottenere una molecola di interferone con una maggiore emivita rispetto alla molecola classica. Per tale motivo sono stati recentemente sintetizzati gli interferoni peghilati, caratterizzati dalla modificazione chimica mediante legame covalente con il glicole polietilenico (PEG). La coniugazione di farmaci con il PEG, detta chimicamente peghilazione, è una metodica nota per rallentare l'assorbimento del farmaco e quindi prolungarne l'emivita. Ciò ha permesso di ottenere molecole di interferone caratterizzate da una lunga emivita e adatti ad una somministrazione monosettimanale. Recentemente i risultati di ampi trial clinici internazionali che hanno valutato l'impiego dei nuovi tipi di interferone alfa peghilati a lunga emivita, hanno dimostrato una maggiore efficacia degli interferoni peghilati nel trattamento dell'epatite cronica e della cirrosi compensata da HCV, sia in monoterapia che in combinazione con Ribavirina. Attualmente esistono due formulazioni del PEG-IFN, il PEG-INTRON (interferone peghilato alfa 2b) ed il PEGASYS (interferone peghilato alfa 2a), entrambi registrati per l'impiego terapeutico nell'epatite cronica da HCV.

Indicazioni al trattamento antivirale nei pazienti con epatite cronica da virus dell'epatite C

Nei pazienti con epatite cronica da HCV ed ipertransaminasemia, in assenza di un quadro clinico, laboratoristico o strumentale indicativo di cirrosi conclamata, la biopsia epatica costituisce elemento di grande rilevanza per la valutazione della indicazione alla terapia. Essa

permette, infatti, di definire il grado di attività necroinfiammatoria, ma anche e soprattutto lo stadio della fibrosi.

In linea generale, considerando il reperto istologico e l'evoluitività a breve-medio termine, le epatiti croniche da HCV senza cirrosi possono essere classificate in:

– *Forme a minimo rischio di progressione*

Caratterizzate da fibrosi assente o minima, solo portale; le attuali indicazioni che emergono dalle conclusioni delle due più recenti "Consensus Conference" Internazionali sono di non trattare ma seguire il paziente nel tempo con eventuale ripetizione della biopsia epatica dopo 4-5 anni ed inizio della terapia in presenza di segni istologici di progressione; eventualmente trattare i soggetti più giovani (<45 anni) in assenza di controindicazioni, con precedenza per i casi con genotipo favorevole (HCV-2, 3) o con bassa viremia. Vi è stata di recente discussione e qualche controversia nella opportunità di sottoporre a biopsia epatica questi pazienti che se fortemente motivati alla terapia, potrebbero essere trattati senza necessità di un esame istologico pre-terapia.

– *Forme a rischio intermedio*

Con fibrosi portale o anche periportale, con pochi setti; trattamento nei pazienti <55 anni, in assenza di controindicazioni.

– *Forme ad elevato rischio di progressione*

In cirrosi con fibrosi periportale e numerosi setti. trattamento nei pazienti <65-70 anni, indipendentemente dai livelli di transaminasi, in assenza di controindicazioni assolute alla terapia.

È fondamentale quindi valutare stadio ed attività istologica di malattia, l'età del paziente e le eventuali controindicazioni al trattamento.

Vi è oggi consenso unanime sull'opportunità di trattare i pazienti con cirrosi ben compensata mentre è ancora controverso se estendere il trattamento anche a soggetti con segni, più o meno evidenti, di ipertensione portale e di ridotta funzionalità epatica. Controverso è anche l'uso di terapia interferonica soppressiva a lungo termine per prevenire a progressione di malattia e lo sviluppo di epatocarcinoma sui pazienti che non dimostrano una completa risposta istologica alla terapia di combinazione. Sono in corso poi studi internazionali su ampie casistiche per chiarire questi punti di grande rilevanza clinica ma anche farmaco-economica.

I portatori di HCV con ALT normali

I pazienti con transaminasi persistentemente normali sono portatori cronici di HCV (HCV-RNA positivi) che possono presentare lesioni istologiche, in genere alquanto lievi, alla biopsia epatica, che non è peraltro necessaria nella maggior parte dei casi. In questi soggetti attualmente non vi è chiara e definitiva indicazione al trattamento pazienti in quanto:

La malattia epatica non progredisce o progredisce poco con ALT normali.

In alcuni casi in precedenza stabili può essere osservata una riattivazione bioumorale dopo terapia con interferone.

Vi sono ancora pochi dati controllati sull'efficacia e sicurezza della terapia di combinazione con IFN e Ribavirina in questo sottogruppo particolare.

Anche il gruppo di portatori di HCV con ALT normali è stato di recente oggetto di discussione e controversie per quanto concerne l'opportunità di eseguire una biopsia epatica e/o di iniziare un trattamento antivirale. Nelle raccomandazioni della Consensus Conference NIH 2002 la terapia è proposta anche per questi soggetti, in presenza di lesioni istologiche significative e di "forte" motivazione del paziente.

Sono in corso vari studi randomizzati e controllati volti a valutare l'efficacia della terapia di combinazione con PEG-IFN e ribavirina nei portatori cronici di HCV con transaminasi

persistentemente normali. In attesa dei risultati di questi studi, la raccomandazione AISF oggi è di non trattare questi casi al di fuori di studi controllati. Nei pazienti non trattati è opportuno continuare il monitoraggio clinico e delle transaminasi per cogliere eventuali riattivazioni della malattia, che possono manifestarsi con o senza sintomi anche dopo molti anni di completa remissione bioumorale.

Prospettive

Sono in corso vari studi di ritrattamento di pazienti non responsivi con schemi più aggressivi di PEG-IFN e Ribavirina. Sono anche in valutazione alcuni analoghi della Ribavirina, potenzialmente efficaci ma con minor effetto emolitico. Inizieranno presto anche sperimentazioni cliniche con vaccini HCV terapeutici. Grande interesse, infine, hanno suscitato alcuni dati preliminari nell'impiego di inibitori delle proteasi di HCV che in studi pilota hanno dimostrato effetti antivirali rapidi e potenti.

EPATOCARCINOMA: EZIOLOGIA, STORIA NATURALE E TRATTAMENTO

Massimo Lavarone, Massimo Colombo
Medicina Interna, Università degli Studi, Milano

Introduzione

Nel 1994 l'Agencia Internazionale di Ricerca sul Cancro (IARC) definì l'HCV (Hepatitis C Virus) cancerogeno epatico nell'uomo. Più recentemente, si sono accumulate evidenze che il carcinoma epatico (CE) è la principale causa di morte in pazienti con cirrosi epatica compensata da HCV. Poiché il CE causato da HCV è fortemente influenzato da fattori ambientali, dietetici e di stile di vita, l'incidenza e la distribuzione geografica del tumore variano in accordo con la distribuzione del virus nei diversi gruppi etnici, sociali e tra i sessi. La principale causa di CE nei Paesi sviluppati è l'epatite cronica C mentre il virus dell'epatite B prevale nei casi di CE in Asia e Africa. L'incidenza di CE è in aumento nella maggior parte dei Paesi sviluppati, dove si è accumulato nei decenni passati un elevato numero d'individui con infezione cronica C. Poiché il virus si è diffuso in epoche differenti, l'incidenza di CE in alcuni Paesi (USA) tende ad aumentare nei prossimi decenni mentre in altri (Giappone) ha raggiunto un fase di plateau (Tabella 1).

Tabella 1. Incidenza di HCV e carcinoma epatico (CE) in USA e Giappone: orologio molecolare

Mutazioni in NS5B	USA (HCV 1a)	Giappone (HCV-1b)
Tempo di divergenza dal progenitore comune più recente	1910 (1984-1932)	< 1982
Periodo medio di diffusione	1954-1978 ancora in crescita	1930s-1940s inizio riduzione nel 1995
Previsione di nuovi casi di CE nelle prossime decadi	in aumento	in riduzione

Meccanismi di sviluppo del carcinoma epatico

L'HCV può causare CE con meccanismi diretti e indiretti. L'infiammazione cronica del fegato determinata dall'azione dei linfociti contro gli epatociti infetti, determina accumulo epatico di reattivi intermedi di ossigeno che creano un ambiente mitogeno/mutageno. Di conseguenza, nelle cellule proliferanti i meccanismi di riparazione del DNA sono sopraffatti, permettendo alle cellule con mutazioni e riarrangiamenti cromosomici di sfuggire alla morte programmata (apoptosi) e/o l'eliminazione da parte del sistema immunitario. L'HCV può anche causare CE con meccanismi diretti, mediante geni virali che codificano per proteine strutturali e non-strutturali e dei loro prodotti, che influenzano la regolazione del ciclo cellulare. In particolare, gli stessi meccanismi che permettono al virus di sopravvivere nell'ambiente ostile del fegato malato, possono indurre le fasi precoci della trasformazione cellulare e favorire allo

stesso modo le fasi tardive dell'espansione clonale della cellula neoplastica e della progressione tumorale. Studi di ibridazione genomica comparativa hanno definito vie di sviluppo neoplastico distinte per tumori indotti da HBV e HCV. L'instabilità cromosomica comunemente riscontrata nei primi è dovuta a perdita di eterozigosi e alla riduzione delle funzioni di soppressione tumorale. Al contrario, i tumori HCV-correlati mostrano stabilità cromosomica e frequenti mutazioni del gene che codifica per la beta-catenina.

Dati sperimentali suggeriscono che la proteina core dell'HCV svolge un ruolo essenziale nella trasformazione epatocellulare, inibendo l'apoptosi cellulare mediante interazione con i recettori cellulari di TNF, FAS, NF κ B, pE3 e c-myc. La proteina core dell'HCV potrebbe quindi avere un ruolo nella necrosi epatocitaria immunomediata favorendo la persistenza dell'HCV e abrogando l'apoptosi cellulare, importante meccanismo difensivo degli epatociti contro l'infezione virale e il tumore.

La progressione da nodulo cirrotico a CE è un processo sequenziale caratterizzato da progressivo aumento della proliferazione cellulare senza un parallelo incremento di apoptosi. Purtroppo studi di interazione tra HCV, apoptosi epatocitaria e tumore epatico sono complicati dalla mancanza di sistemi affidabili di coltura cellulare e animali di piccola taglia che permettano infezione e replicazione dell'HCV.

Rischio di CE in pazienti infetti

La severità dell'epatite è il fattore cruciale che determina il rischio di CE in pazienti con epatite cronica C. Il rischio annuale di CE è basso (0,4%) in pazienti non selezionati con infezione cronica e transaminasi persistentemente elevate rispetto a pazienti con diagnosi istologica di epatite cronica e quelli con cirrosi compensata (da 1,7% a 3,4%).

Pazienti con cirrosi compensata si stratificano in 8 categorie di rischio di CE, combinando sesso, età e livelli di alfa-fetoproteina sierica (AFP) basali. Il gruppo a rischio minore sono donne di età inferiore a 53 anni con livelli normali di AFP, che hanno tassi di CE di 1,5% per anno. Uomini di età superiore a 53 anni e livelli di AFP elevati, rappresentano il gruppo a maggior rischio (10,6% per anno). Combinando età, HCV, attività protrombinica e conteggio piastrinico è possibile stratificare i pazienti cirrotici in due gruppi ad alto (30,1%) e a basso (2,3%) rischio di sviluppare CE in 4 anni di sorveglianza. Questo e altri studi di categorizzazione del rischio, come quelli basati sulla proliferazione cellulare, hanno fornito una maggiore conoscenza dei fattori predittivi di CE, utili per rifinire i programmi di sorveglianza. Il rischio di CE è particolarmente elevato nei pazienti che hanno acquisito l'infezione da HCV tardi nella vita, poiché questi pazienti progrediscono verso la cirrosi più spesso dei pazienti che hanno acquisito l'infezione al momento della nascita o nei primi anni di vita. Non è certo che questi i pazienti siano protetti da cirrosi e CE: non vi sono studi con follow-up superiore a 30 anni e il rischio di sviluppare cirrosi non è lineare nel tempo in tutti i pazienti con epatite cronica C. Il rischio di CE nei pazienti con HCV è aumentato significativamente anche nella coinfezione HCV/HBV. Una meta-analisi di 32 studi caso-controllo ha dimostrato un aumento di 135 volte del rischio di CE in pazienti con coinfezione HCV/HBV rispetto ad un aumento di 20-24 volte nei pazienti con una sola infezione. Alcuni studi suggeriscono che il rischio di tumore potrebbe aumentare anche in pazienti con coinfezione HBV occulta, cioè pazienti HBsAg negativi con HBV DNA presente nel siero o nel tessuto epatico: questi dati necessitano però di ulteriori conferme. L'effetto combinato dell'infezione cronica HBV/HCV sul rischio di sviluppare CE è però contraddetto da uno studio prospettico di 12.008 uomini a Taiwan, che dimostra un effetto indipendente dei due virus.

Il rischio di CE è sicuramente aumentato dal consumo di elevate quantità di alcol: esiste infatti un effetto dose nel sinergismo tra alcol e HCV nell'induzione di CE. In Italia, il rischio relativo di sviluppare CE è 63 volte quello di pazienti astemi nei pazienti HCV-positivi che assumevano 41-80 grammi (g) di etanolo al giorno, e di 126 in quelli che assumevano più di 80 g. Inoltre, l'abuso alcolico peggiora la prognosi del CE nei pazienti HCV-positivi in quanto gli alcolisti sviluppano generalmente CE scarsamente differenziati, con invasione extra-capsulare, trombosi portale e metastasi intra-epatiche più frequentemente di pazienti astemi.

Potrebbe esserci un certo grado di sinergismo tra HCV e fumo di sigaretta, legato al metabolismo epatico dei cancerogeni contenuti nel tabacco.

Studi del rischio di CE nei sopravvissuti di Nagasaki e Hiroshima hanno dimostrato che l'esposizione a radiazioni ionizzanti aumenta in modo significativo l'incidenza e la mortalità per CE. Uno studio caso-controllo nella coorte dei sopravvissuti giapponesi ai bombardamenti atomici del 1945 ha dimostrato un importante effetto sinergico tra irradiazione medio-alta e HCV nell'eziologia del CE, particolarmente pronunciato nei pazienti senza cirrosi epatica. Al contrario, lo studio non ha evidenziato un eguale effetto sinergico delle radiazioni nei pazienti HBV-positivi.

Storia naturale del CE

Le dimensioni del tumore alla prima diagnosi non predicono la sopravvivenza del paziente. Il 40% dei tumori più piccoli di 2 cm causa invasione microscopica dei vasi e la mediana del tempo di raddoppiamento del volume del tumore piccolo varia da 28 mesi ad un mese. Dal 20% al 40% dei pazienti sottoposti a sorveglianza presenta un tumore multinodulare. Il tumore multinodulare è più frequente nei pazienti con fattori eziologici multipli che nei pazienti con un solo fattore eziologico: un certo numero di tumori multinodulari hanno origine multifocale altri sono primitivi metastatici. La diagnosi differenziale è possibile con lo studio dell'espressione genica e confrontando indagini radiologiche e istopatologiche su fegato resecato o espantato. La distinzione tra queste due condizioni ha importanti conseguenze cliniche poiché influenza la scelta terapeutica e la prognosi. Tumori primitivi multipli sono meno aggressivi dei tumori primitivamente metastatici, e i primi recidivano meno frequentemente dopo resezione dei secondi. La prognosi risulta dalla combinazione di dimensioni del tumore, funzione epatica residua e performance status del paziente. La sopravvivenza a 3 anni è circa del 50% nei pazienti con tumore inoperabile senza invasione vascolare o metastasi a distanza, senza sintomi costituzionali e con un performance status alto. Studi retrospettivi suggeriscono che i tumori HCV-correlati infiltrano i vasi e ricorrono dopo resezione meno frequentemente rispetto ai tumori HBV-correlati. I primi sono spesso multinodulari rispetto ai secondi.

Sorveglianza

L'obiettivo della sorveglianza è l'identificazione del CE in stadio precoce, quando il paziente può essere efficacemente trattato con terapie radicali (Tabella 2).

L'ecografia addominale ogni 6 mesi è l'approccio ideale, anche se ha diversi limiti: è operatore-dipendente e comporta difficoltà interpretative in alcuni pazienti. L'ecografia addominale identifica tumori piccoli nell'80% dei pazienti con cirrosi epatica. Strategie di richiamo in presenza di un nodulo all'ecografia, variano a seconda delle dimensioni della lesione.

Tabella 2. Programmi di sorveglianza per CE in pazienti con cirrosi compensata

Caratteristica	Oka <i>et al.</i> 1990	Cottone <i>et al.</i> 1994	Colombo <i>et al.</i> 1991
Periodicità ecografia (mesi)	3	6	12
Pazienti (n.)	141	157	447
Lunghezza dello studio (mesi)	72	96	33
Pazienti con CE (n.)	40	30	56
Incidenza annuale di CE	6,5%	4,4%	3,2%
Tumori ≤ 5 cm	82%	83%	54%
Tumori con AFP ≥ 20 ng	25%	60%	40%
Candidabili a terapie radicali	30%	33%	29%

In presenza di un tumore inferiore ad 1 cm la diagnosi di certezza è difficilmente ottenibile sia mediante ago-biopsia che con tecniche contrastografiche. La diagnosi, è ottenibile con la ripetizione dell'ecografia ogni tre mesi. Noduli di 1-2 cm che non possono essere identificati mediante TC o RM, vengono esaminati con biopsia epatica eco-guidata, la quale però è caratterizzata dal 40% di falsi negativi. Per noduli superiori a 2 cm, la diagnosi si ottiene con tecniche contrastografiche e la biopsia è indicata solo in assenza di ipervascolarizzazione arteriosa e quando occorre la diagnosi di certezza in pazienti candidabili a terapie radicali. Nonostante l'aumentato numero di diagnosi precoci e candidabilità a terapie radicali, non è ancora chiaro se la sorveglianza modifica la sopravvivenza dei pazienti con CE. Non esistono studi randomizzati-controllati in proposito e oggi un simile studio appare non etico. Dati indiretti suggeriscono un beneficio di sopravvivenza nei pazienti con CE in sorveglianza. Durante 56 mesi di sorveglianza in 313 pazienti con cirrosi compensata (64% HCV-positivi), 61 svilupparono CE e 42 furono trattati mediante resezione, trapianto epatico o terapie interstiziali eradicanti. Il tasso cumulativo di sopravvivenza dei 61 pazienti è risultato maggiore rispetto a 104 pazienti consecutivi in cui il CE è stato identificato incidentalmente (30 vs 15 mesi, $p=0,02$). A Taiwan, è stata offerta per 7 anni la sorveglianza con ecografia ogni 3 mesi a 4.834 soggetti con marcatori di rischio per CE. Rispetto a 458 soggetti che non aderirono alla sorveglianza, la mortalità per CE si ridusse del 24% nei soggetti sorvegliati. L'analisi retrospettiva di 417 pazienti con cirrosi compensata sorvegliati per 17 anni a Milano dimostrò riduzione significativa della mortalità nei pazienti con CE nell'ultimo quinquennio rispetto ai 2 quinquenni precedenti (10% vs 37% vs 45%). La mortalità generale si ridusse in parallelo con la riduzione della mortalità nei pazienti trattati (5% vs 28% vs 34%). Questo è dovuto all'identificazione di tumori più piccoli (2,2 cm vs 3,0 cm vs 3,7 cm) e al progressivo aumento di pazienti sottoposti a trattamento radicale (43% vs 38% vs 28%).

Trattamento

Presenza o assenza di cirrosi, numero e dimensioni del tumore e grado di compenso epatico influenzano la scelta terapeutica. Non vi sono di fatto studi controllati che abbiano confrontato l'efficacia dei trattamenti disponibili e la sostanziale eterogeneità di sopravvivenza dei gruppi di controllo non permette di ottenere valutazioni affidabili dei trattamenti confrontando studi diversi. In generale, la rivalutazione dei risultati ottenuti con i diversi trattamenti alla luce dell'"intenzione a trattare" ha dato risultati poco incoraggianti.

Pazienti con tumore precoce

Il trapianto di fegato (OLT) è la migliore opzione terapeutica per pazienti con CE singolo inferiore ai 5 cm o pazienti con meno di 3 tumori ciascuno inferiore ai 3 cm (“criteri di Milano”). La limitazione del trapianto a tumori inferiori a 5 cm in pazienti con cirrosi epatica trova il suo razionale nel più frequente riscontro invasione vascolare nei tumori di dimensioni maggiori. La sopravvivenza a 5 anni nei pazienti che soddisfano i “criteri di Milano” è del 75%. Uno degli ostacoli maggiori nell’analisi dei risultati ottenuti con l’OLT è il tempo di attesa tra candidatura e intervento, estremamente variabile nei vari centri trapianto. È stato infatti calcolato che se il tempo di attesa supera i 6-10 mesi, l’aumento di sopravvivenza garantito dall’OLT è annullato dai rischi a cui il paziente incorre nell’attesa di trapianto. La selezione appropriata dei candidati alla resezione potrebbe dare risultati migliori rispetto all’OLT. In uno studio condotto a Barcellona, la sopravvivenza a 5 anni, tenendo conto dell’intenzione a trattare, è stata del 51% nei pazienti resecati e del 69% nei pazienti sottoposti a OLT. Dopo selezione dei pazienti in base ai fattori predittivi positivi, come valori normali di bilirubina o modesta ipertensione portale per la resezione e l’uscita dalla lista d’attesa per il trapianto, la sopravvivenza a 5 anni era del 74% nei migliori candidati alla resezione e del 54% nei peggiori candidati al trapianto. Quindi, nei Paesi con poche donazioni, pazienti cirrotici con bassa ipertensione portale e valori normali di bilirubina dovrebbero essere prima considerati per la resezione, mentre quelli con fattori predittivi negativi dovrebbero essere candidati al trapianto oppure alle terapie interstiziali se sussistono controindicazioni al trapianto. Per ridurre il numero di pazienti che perdono la candidabilità al trapianto durante l’attesa, la chemio-embolizzazione del tumore è stata utilizzata per ridurre le dimensioni del tumore prima del trapianto, con risultati incoraggianti come terapia a ponte tra candidatura e intervento.

Nei centri con accesso limitato al trapianto, resezioni epatiche limitate come la segmentomia e la subsegmentomia sono le scelte terapeutiche ideali per pazienti con singolo tumore piccolo con un basso rischio di recidiva del tumore (50% a 2 anni) e in pazienti con funzione epatica conservata a basso rischio di scompenso dopo resezione. La sopravvivenza a 5 anni dei pazienti di classe Child-Pugh A con un singolo tumore piccolo inferiore ai 5 cm è del 70% nei candidati migliori, con bassa ipertensione portale. Poiché i pazienti operati con gradiente pressione portocava superiore a 10 mmHg sono esposti a scompenso epatico irreversibile, la resezione epatica è controindicata nei pazienti con cirrosi scompensata o ipertensione portale.

Pazienti con tumore inoperabile

Il trattamento interstiziale eco-guidato con iniezione di etanolo assoluto (PEI) o la termoablazione del tumore con radiofrequenza (RITA), determinano necrosi del tumore senza danneggiare significativamente il tessuto epatico cirrotico circostante. La sopravvivenza a 5 anni di pazienti con cirrosi ben compensata e tumore inferiore ai 5 cm è del 47% rispetto al 29% di pazienti con cirrosi avanzata, ed è associata ad un basso rischio di complicanze severe (1,7%) e mortalità (0,1%). Il tumore ricorre virtualmente in tutti i pazienti trattati, più spesso in quelli con livelli elevati di AFP e in quelli con tumore non capsulato.

La prevenzione della recidiva è stata tentata con acido retinoico nei soggetti HCV-positivi trattati efficacemente con resezione epatica o alcolizzazione. L’acido aciclico ha prevenuto la recidiva di CE del 28% rispetto al placebo nell’arco di 3 anni, ma questa osservazione non è stata confermata da altri. La terapia con interferone ha ridotto la ricorrenza di CE in pazienti con cirrosi HCV-correlata e bassa viremia, trattati efficacemente con PEI: i pazienti trattati avevano

una sopravvivenza del 53% a 7 anni, rispetto al 23% di 25 pazienti senza trattamento. L'impatto clinico di questo approccio richiede ulteriori studi, in quanto i pazienti randomizzati per il trattamento erano solo una piccola parte (32%) rispetto a tutti i pazienti HCV positivi con CE sottoposto ad alcolizzazione.

La radiofrequenza è superiore alla PEI in termini di necrosi tumorale completa (90% vs 80%) e numero di trattamenti necessari (1,2 vs 4,8), ma causa maggiori complicanze (9,5% vs 0), compresa la disseminazione neoplastica iatrogena nei pazienti con CE sottocapsulare e poco differenziato.

La chemio-embolizzazione arteriosa trans-catetere (TACE) del CE determina necrosi ischemica del tumore e permette l'introduzione nell'arteria epatica di agenti anti-tumorali, con elevate concentrazioni locali dei farmaci e minori effetti collaterali sistemici. Uno studio controllato in pazienti spagnoli con CE inoperabili ha dimostrato un significativo aumento della sopravvivenza a 2 anni nei trattati con TACE segmentale rispetto ai controlli non trattati.

Prevenzione

La prevenzione è l'unico approccio realistico per ridurre la mortalità da CE. Non esiste ancora un vaccino per prevenire la trasmissione di HCV. La trasmissione di HCV è stata ridotta con lo screening dei donatori di sangue e la diffusione di siringhe e aghi mono-uso, che ha ridotto il *pool* di individui con cirrosi epatica HCV-correlata e il rischio conseguente di CE. Il trattamento dell'epatite cronica C riduce l'incidenza di CE soprattutto nei pazienti con risposta virologica sostenuta. In una meta-analisi in pazienti con cirrosi HCV-correlata, Cammà *et al.* hanno dimostrato riduzione di rischio CE del -19,1% nei trattati con risposta sostenuta (IC 95% =13,2-25,2%). L'analisi retrospettiva di 2.889 pazienti giapponesi trattati con interferone ha dimostrato una riduzione significativa nella mortalità per eventi epatici. Il tasso standardizzato di mortalità era 4,7 rispetto a 13,5 per i non trattati e si riduceva da 6,5 nei pazienti senza risposta sostenuta a 0,8 nei pazienti con risposta sostenuta. Questi risultati vanno confermati in modo prospettico poiché i precedenti studi con interferone escludevano i pazienti con malattia epatica più avanzata che sono i pazienti più a rischio di CE. Sono in corso studi randomizzati controllati per verificare se la somministrazione prolungata di interferone a basse dosi riduce il rischio di CE in pazienti senza risposta alla terapia combinata con interferone e ribavirina. Lo studio Halt-C in Nord America deve arruolare 1350 pazienti con fibrosi F3 che riceveranno un'iniezione settimanale di interferone 2a peghilato (90mcg) per 3,5 anni. Lo studio Epic-3 in Nord America ed Europa dovrebbe arruolare 2.200 pazienti con fibrosi F2-F4 che riceveranno una dose settimanale di interferone 2b peghilato bw (0,5 mcg/kg) per 3-5 anni. Infine, uno studio a Milano prevede l'arruolamento di 160 pazienti senza risposta con cirrosi compensata e marker istologici di elevata proliferazione epatocellulare, che riceveranno 0.5 mcg/kg di interferone 2b peghilato per 3 anni.

Conclusioni

Nei Paesi industrializzati, lo scenario del carcinoma epatico HCV-correlato rimane negativo, poiché l'incidenza del tumore è ancora in aumento. Il trapianto epatico offre una prospettiva di sopravvivenza a lungo termine buona in pazienti ben selezionati, ma può essere offerto solo ad una minoranza di pazienti. Altri trattamenti radicali, come resezione e i trattamenti ablativi interstiziali, sono efficaci ma non prevengono la ricorrenza del CE. È dunque fondamentale

migliorare la prevenzione primaria e secondaria del tumore. Un vaccino contro l'HCV sarebbe il rimedio ideale, per quanto la popolazione target andrebbe definita in relazione alla epidemiologia loco-regionale dell'infezione. L'avvento di terapie anti-virali efficaci potrebbe ridurre la porzione di pazienti che sviluppano cirrosi, causando una riduzione dei CE. La prevenzione e il trattamento di altri fattori di co-morbidità, quali alcool e HBV, potrebbero attenuare il rischio di progressione da epatite cronica a tumore. Nel prossimo futuro, una migliore definizione dei pazienti cirrotici a rischio di CE mediante diagnosi molecolare precoce, potrebbe aiutare a definire sottogruppi di pazienti da sottoporre prioritariamente a sorveglianza e prevenzione.

Bibliografia

1. Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di Carlo V, Dioguardi N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 1991;325:675-80.
2. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennai L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *New England Journal of Medicine* 1996;334:693-9.
3. Brechot C. Molecular bases of hepatitis B- and hepatitis C-related chronic liver diseases. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz (Ed.). *The liver: biology and pathology*. Forth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
4. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J, EASL Panel of Experts on HCC. Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference, Barcelona September 15-17, 2000. *Journal of Hepatology* 2001;35:421-30.
5. Yoshida H, Arakawa Y, Sata M, Nishiguchi S, Yano M, Fujiyama S, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Interferon therapy prolonged life expectancy among chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2002;123:483-91.

LIVER UNIT NETWORKS ASSOCIATION

Ferruccio Bonino
Ospedale Maggiore di Milano, Policlinico, IRCCS

Premessa

Le patologie del fegato costituiscono una delle più rilevanti cause di spesa sanitaria, in termini di costi sostenuti per la diagnosi e cura. Lo spettro di malattia è molto ampio e complesso sia dal punto di vista eziopatogenetico che per le manifestazioni cliniche e le esigenze assistenziali. Ad un estremo dello spettro esistono pazienti che presentano solo apparentemente un minor impegno assistenziale perché affetti da alcune tipologie di malattia quali l'epatite cronica (asintomatica, ma evolutiva) o la steatosi epatica che sono correntemente gestite in regime ambulatoriale o di *out-patient*. In realtà la spesa sanitaria per la diagnosi e/o cura di queste patologie risulta rilevante sia per i costi del percorso diagnostico e del programma di cura (si pensi al costo dei farmaci antivirali) che per l'elevata prevalenza di tali patologie nella popolazione. All'altro estremo dello spettro di malattia esistono le situazioni di emergenza urgenza clinica quali lo scompenso ascitico, l'emorragia digestiva e l'encefalopatia che comportano uno sforzo organizzativo e conseguentemente economico molto elevato per raggiungere il difficile equilibrio tra l'offerta di una rete di servizi sul territorio appropriata e la necessità di concentrare per motivi economici e di qualità sanitaria il maggior numero di servizi di alta tecnologia specialistica. Esistono inoltre numerose altre patologie che richiedono un approccio multidisciplinare e coinvolgono più specialisti come il nutrizionista, il chirurgo, il radiologo, ecc. ma vedono come fulcro della gestione clinica del paziente il gastroenterologo-epatologo che esercita un ruolo centrale di coordinamento e costante supervisione.

Una realtà assistenziale così complessa, dove competenza clinica e tecnico scientifica si devono costantemente integrare e non contrapporre, richiede, per evitare un incremento incontrollato della non appropriatezza assistenziale, una rete dei servizi mirata al bisogno di cura del paziente e non alla semplice erogazione di prestazioni diagnostiche o prescrizioni terapeutiche. Per ottenere un'ottimizzazione della gestione assistenziale con una riduzione dei costi è indispensabile mirare ad un governo clinico centrato su una collaborazione diretta, condivisa, responsabile e trasparente tra medico di famiglia e medici specialisti. Ciò è possibile implementando una rete territoriale che garantisca una fattiva interazione fra medici di medicina generale, gli specialisti di I, II, III livello e i centri di riferimento. Con queste finalità è nata Alleanza per il Fegato, l'Associazione Nazionale delle Reti Epatologiche o *Liver Unit Networks Association* (LUNA). Proposta e coordinata dall'Ospedale Maggiore di Milano ne sono soci fondatori 6 Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (Policlinico Ospedale Maggiore di Milano, Fondazione San Raffaele del Monte Tabor di Milano, Policlinico San Matteo di Pavia, Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo, Istituto Nazionale delle Malattie Infettive Spallanzani di Roma e Istituto di Gastroenterologia De Bellis di Castellana Grotte, Bari). La Rete intende promuovere di intesa con le Regioni le Unità territoriali del Fegato (*Liver Unit*), come entità funzionali complesse che strutturano e organizzano, attraverso la rete, in riferimento a precisi percorsi diagnostico-terapeutici e nell'ambito di un progetto di *disease management* esplicitato e condiviso, i centri epatologici di secondo livello (IRCCS, Ospedali), i centri epatologici di primo livello (ASL) e attraverso le ASL i medici di medicina generale che operano in un medesimo ambito territoriale, (es. una Regione). Potranno aderire all'associazione

altre istituzioni che sono promotrici a livello territoriale dei principi e finalità della rete nazionale. Seguendo la stessa filosofia Alleanza contro il Cancro (Rete nazionale dei Centri di Eccellenza e Riferimento per l'Oncologia) e Alleanza per il Fegato sono promotrici di un Registro Nazionale dei Tumori del Fegato che propone per la prima volta in modo sistematico un'attiva e fruttuosa collaborazione sia assistenziale che di ricerca tra oncologi e epatologi.

Finalità della Rete

La Rete intende essere, al tempo stesso, una Rete di Soggetti, una Rete di Servizi, una Infrastruttura Tecnologica e fondamentalmente un Modello Organizzativo basato sulla condivisione delle conoscenze e degli obiettivi e capace di produrre e sostenere processi di rapida innovazione su tutto il Territorio.

Gli obiettivi specifici sono:

- Indire sull'intero territorio nazionale un censimento delle attività di ricerca e assistenziali nelle diverse sotto-discipline dell'epatologia intese come specializzazioni la cui competenza e attività sono valutabili da indicatori oggettivi di quantità e qualità. Organizzare nella seconda fase un sistema periodico di aggiornamento del dato.
- Promuovere la collaborazione e il coordinamento delle attività favorendo una gestione ottimale delle risorse, ampliando quanto più possibile lo spettro di ricerca attraverso la riduzione di sovrapposizioni e doppioni
- Fornire un'infrastruttura stabile per la creazione e gestione di database clinici di ampie dimensioni con struttura unificata e condivisa tra più centri nel rispetto delle più stringenti norme di sicurezza e riservatezza.
- Favorire la creazione di gruppi di competenza, il dialogo e l'immediata condivisione dei risultati.
- Dare visibilità alla ricerche e al potenziale scientifico dei centri aderenti e fungere da catalizzatore per l'afflusso di nuove risorse pubbliche e private
- Offrire il continuo aggiornamento di linee guida comuni da trasferire a tutto il sistema sanitario nazionale.
- Valutare, confrontare e sperimentare soluzioni e tecnologie a supporto del *disease management*.
- Elaborare modelli organizzativi condivisi e rappresentare il *bench mark* di riferimento per la costituzione delle Unità territoriali del Fegato.
- Mettere a disposizione dei centri aderenti servizi di rete, *know-how* tecnologico e supporto applicativo per la gestione delle Unità stesse.

Gli obiettivi generali di riferimento sono:

- riduzione delle liste d'attesa;
- devoluzione o decentramento delle decisioni;
- coinvolgimento del medico di medicina generale nella ricerca clinica;
- partecipazione e trasparenza;
- efficienza amministrativa;
- gestione decentrata dei rischi con partecipazione delle industrie (sorveglianza farmacologica, farmacogenomica, ecc.).

Aree di intervento per la ricerca

Le principali aree di intervento riguardano:

- *Ricerca Clinica, Epidemiologica e Traslazionale*
Creazione di database clinici che aumentino la numerosità e potenza degli studi clinici. Trasferimento alla pratica medica dei risultati più innovativi della ricerca di base per la prevenzione, diagnosi e cura delle malattie croniche e delle neoplasie del fegato.
- *Ricerca Organizzativa.*
- *Ricerca di Base*
Studi di genomica, epigenomica e proteomica della cellula epatica e dei suoi percorsi di differenziazione e sdifferenziazione che si incrociano a livello dell'epatocita normale da un lato il percorso di maturazione della cellula staminale e dall'altro quello inverso della trasformazione in cellula neoplastica.

Per quanto riguarda il coordinamento della ricerca verrà attivata una cabina di regia composta da esponenti scientificamente qualificati che assumerà una funzione trainante rispetto alle *Liver Unit* favorendone la collaborazione e il coordinamento, articolando i contenuti della rete, validando obiettivi e metodi, individuando possibili fonti di finanziamenti e valorizzando i risultati.

Unità territoriale del Fegato (*Liver Unit*)

Per Unità territoriali del Fegato (*Liver Unit*) si intendono entità funzionali complesse che strutturano e organizzano (attraverso la rete, in riferimento a precisi percorsi diagnostico-terapeutici e nell'ambito di un progetto di *disease management* esplicitato e condiviso) i centri epatologici di secondo livello (IRRCS, Ospedali), i centri epatologici di primo livello (ASL) e attraverso le ASL i medici di medicina generale che operano in un medesimo ambito territoriale, (es. una Regione). La *Liver Unit*, così intesa, è lo strumento per integrare e sfruttare al meglio le esperienze e le competenze disperse degli specialisti rendendole disponibili per un governo scientifico dei progetti di ricerca traslazionale e di gestione pratica dei casi clinici. Il modello di management di riferimento è quello basato su livelli progressivamente crescenti di integrazione dei servizi e flussi informativi tra centri epatologici di II e I livello e medici di base così come nel mondo dell'industria avviene ormai da tempo tra centri di produzione, centri di distribuzione e *dealer*. Lo scopo finale è far sì che, sull'intero territorio nazionale, ogni medico di base conosca, utilizzi e collabori effettivamente con i riferimenti specialistici di primo livello della sua area geografica e ogni specialista di primo livello conosca, utilizzi e collabori con i centri specialistici di secondo livello che fanno da fulcro per la rete epatologica.

Rapporti della Rete con gli specialisti del territorio e ASL

Nella strutturazione operativa delle *Liver Unit* territoriali verrà effettuata una attenta e precisa ricognizione di tutte le risorse umane e tecnologiche territoriali presenti e effettivamente

operanti. Tale ricognizione sarà basata su una prioritaria definizione di uno standard minimo riguardante:

- personale addetto dedicato, coordinato da un *tutor* con curriculum e training disciplinare specifici;
- dotazioni tecnologiche e strumentali, anche mediante *service* o convenzioni esterne ;
- casistica specifica certificata .

Il Centro Territoriale formula la prima diagnosi e imposta il successivo percorso diagnostico-terapeutico in sinergia, mediante la rete, con i Centri di Riferimento di 2° Livello.

Ulteriori compiti del Centro Territoriale saranno:

- Organizzazione e implementazione della domiciliazione delle prestazioni, ove opportuna, in sinergia e collaborazione con gli altri Specialisti Territoriali e i medici di Medicina Generale;
- Elaborazione di Linee Guida Territoriali adatte e condivise;
- Interazione continua, mediante la rete, per la gestione del follow-up delle malattie croniche del fegato, con i Centri di Riferimento di 2° livello;
- Supporto essenziale per il Centro Trapianti del Fegato Regionale od Interregionale, soprattutto nella co-gestione delle liste d'attesa e nella gestione del paziente post-trapianto;
- Collaborazione continua con le Istituzioni locali (Comuni, Province, Regioni, ecc.), Scolastiche e di Volontariato per la realizzazione di progetti di screening, educazionali nella popolazione;
- Ruolo nella Formazione Medica Continua a livello residenziale;
- Contributo per la realizzazione del sistema informatico idoneo per il contatto continuo fra i partecipanti ai diversi livelli della rete, per il monitoraggio costante di tutte le informazioni immesse in rete e come supporto formativo per tutti i partecipanti al progetto.

La Rete come strumento di *fund raising*

La Rete si propone come struttura permanente, in grado di attivare, a regime, fonti di finanziamento autonome.

Ogni progetto avrà un piano definito, un'adeguata copertura finanziaria e sarà dotato di strumenti di verifica dei risultati. Saranno ricercati finanziamenti dal dall'industria, ma l'industria e le nuove tecnologie dovranno sempre avere una posizione subordinata al progetto di *clinical governance* che è mirato al bisogno di cura del paziente. L'approccio manageriale all'attività di ricerca, un'efficace pianificazione temporale e finanziaria dei progetti e la creazione di strumenti per una puntuale rilevazione dell'avanzamento (*tracking*) contribuiranno ad accrescere l'efficienza e la visibilità degli IRCCS portandoli progressivamente, nel rapporto con l'impresa, dal ruolo di sperimentatori a quello di promotori protagonisti della ricerca, aumentando così le possibilità di autofinanziamento e di cofinanziamento. Verranno ideate incentivazioni non economiche per la partecipazione ai progetti di ricerca e di educazione permanente. Mediante alleanze regionali, nazionali e internazionali saranno create occasioni di scambio e confronto di progetti di ricerca, modelli di integrazione di percorsi diagnostico-terapeutici tra ospedale e territorio e soluzioni di casi della pratica assistenziale

Filosofia del governo della Rete

L'obiettivo è strutturare la rete in modo che qualità ed eccellenza emergano dal suo funzionamento. Il problema della qualità è formulato come problema del governo della rete, come forma di partecipazione degli specialisti, altri medici e cittadini tale da favorire l'emergere della qualità, senza presumere che la soluzione sia semplicemente disponibile con meccanismi di indottrinamento dall'alto o di partecipazione dal basso. Una rete di qualità non può che partire dalla *leadership* eccellente, di chi è più esperto e concretamente allenato nella disciplina. Una *leadership eccellente* esclude di sostituire l'autorità che deriva dall'esperienza tecnologica, di ricerca (*impact factor*) e assistenziale (disponibilità di casistiche, valutazione oggettiva del sapere pratico) con il potere di chi prevale sfruttando posizioni apicali, ma in pratica contribuisce in modo marginale alla ricerca e alla risoluzione di casi concreti della pratica medica.

I concetti fondamentali che governano la rete sono la partecipazione, responsabilità e trasparenza. A ciascun partecipante è riconosciuto il livello di autorità e di *leadership* che emerge dal suo contributo concreto ai contenuti della rete. L'*ethos* che domina la rete è di tipo collaborativo: si stimolerà il contributo di tutti all'emergere di una rete di altissima qualità cercando di stimolare il desiderio di conoscere e confrontarsi con l'esperienza di altri, per migliorare e rivedere la propria. Gli stessi concetti debbono essere trasferiti anche a livello di singole *Liver Unit*.

Modello organizzativo

Prevediamo un modello gestionale centrato su tre tipologie di governo e di leadership integrate ai diversi livelli:

- *Governo clinico*
Ampiamente articolato, nel rispetto dei principi generali sopra enunciati al livello delle diverse *Liver Unit*.
- *Governo scientifico*
Caratterizzato da un forte coordinamento a *livello* nazionale attraverso la Cabina di Regia
- *Management tecnico-organizzativo*
Riteniamo centrale la presenza, a livello consortile, di un management con forti competenze tecnologiche, ma in grado di rapportarsi efficacemente con i responsabili del governo scientifico e clinico.

Tavola rotonda
La sicurezza virale di sangue ed emoderivati

Moderatori: *M. Rapicetta, G. Aprili*

NAT IN ROUTINE IN ITALIA: DUE ANNI DI ESPERIENZA

Claudio Velati

Dipartimento di Medicina Trasfusionale e di Ematologia della Provincia di Sondrio

Introduzione

La raccomandazione del *Committee for Proprietary Medicinal Products* (CPMP) europeo (1) del 1998 che introduceva come obbligatorio lo screening del plasma destinato al frazionamento industriale per HCV RNA con metodiche NAT ha determinato in gran parte dei Paesi industrializzati provvedimenti normativi o raccomandazioni, spesso sollecitate dall'opinione pubblica e dalle associazioni dei pazienti, che hanno portato ad esaminare con le stesse metodiche anche tutto il sangue e gli emocomponenti destinati alla trasfusione.

In Italia tale obbligo è diventato operante dal luglio 2002, ma già prima di tale data sono stati commissionati dalle autorità nazionali e regionali alcuni progetti di fattibilità (in Lombardia in 4 Dipartimenti di Medicina Trasfusionale e di Ematologia, a Roma e Torino su richiesta dell'Istituto Superiore di Sanità) per due motivi sostanziali che rendevano problematica l'introduzione di tale metodologia nei servizi trasfusionali italiani: in primo luogo, la metodica non è totalmente automatizzata e richiede una elevata e specifica capacità professionale; in secondo luogo, il numero delle strutture trasfusionali presso le quali viene effettuata in Italia la validazione biologica delle unità di sangue ed emocomponenti donate è particolarmente elevata. Dalle rilevazioni effettuate attraverso il Registro Nazionale Sangue e Plasma dall'Istituto Superiore di Sanità, in riferimento all'anno 2001, il numero di servizi trasfusionali in Italia risulta essere di 318 (2). L'elevato numero di strutture, che effettuano un numero limitato di determinazioni, comporta rilevanti problemi di standardizzazione e di costi della introduzione dei test NAT.

Proprio a causa della difficoltà nel rendere in tempi brevi operativo lo screening del sangue con i test NAT e contemporaneamente alla effettuazione di progetti di fattibilità, è stata utilizzata a partire dall'anno 2001, la ricerca dell'HCVcoreAg nello screening delle unità donate, un test EIA di semplice esecuzione che risulta ridurre la finestra di silenzio immunologico per l'infezione da HCV in misura comparabile, anche se non identica, a quella dei test NAT (3).

La focalizzazione delle autorità sanitarie sullo screening per il virus dell'epatite C è dovuto al fatto che il NAT test è capace di ridurre il periodo finestra in questo tipo di infezione di circa l'80% (da 70 a 12 giorni), mentre per gli altri virus a maggiore incidenza il vantaggio è minore (4).

L'esigenza di garantire una trasfusione di sangue ed emocomponenti più sicura possibile ha, però, indotto numerosi Paesi ad introdurre nello screening del sangue anche altri test basati su tecnologia NAT, in particolare per HIV e per HBV. In Italia alcune Regioni hanno deciso in modo autonomo di affiancare alla ricerca di HCV RNA anche quella di HIV RNA, in altre regioni tale decisione è stata assunta dai singoli Servizi Trasfusionali in modo non omogeneo.

In nessun caso l'introduzione dei nuovi test ha portato ad abbandonare quelli sierologici fino ad oggi eseguiti a causa del diverso significato biologico dei test.

Nei Paesi ove era stato possibile effettuare valutazioni del rischio trasfusionale residuo utilizzando modelli matematici basati sul tasso di incidenza e sulla lunghezza del periodo

finestra è ora possibile valutare l'effettivo vantaggio portato dalle nuove metodiche e, utilizzando i nuovi dati di incidenza e la riduzione del periodo finestra, rivalutare il rischio trasfusionale residuo e confrontarlo con quello precedentemente calcolato.

Dopo 2 anni di esperienza è possibile trarre le prime considerazioni in merito alle modifiche organizzative indotte nel sistema trasfusionale italiano dalla introduzione dei test NAT test, al numero di nuovi casi di infezione rivelati dalla nuova tecnologia, alla distribuzione a livello nazionale dello screening per HIV RNA, che non è obbligatorio in Italia, e ad una rivalutazione del rischio residuo rispetto a quanto calcolato sulla base dei test sierologici.

Materiali e metodi

I dati sugli aspetti organizzativi sono stati ottenuti in parte dalle elaborazioni del Settore di Metodologie Trasfusionali del Laboratorio di Biochimica Clinica dell'Istituto Superiore di Sanità e in parte da indagini condotte direttamente dalla Società Italiana di Medicina Trasfusionale e di Immunoematologia (SIMTI).

Lo studio sui dati di incidenza e sul rischio residuo è stato, invece, promosso dal "Gruppo Italiano per lo Studio delle Malattie Trasmissibili" costituito, all'interno del settore Ricerca e Sviluppo della SIMTI, con l'Istituto di Virologia dell'Università degli studi di Milano. Tale gruppo di lavoro ha predisposto un questionario che è stato inviato a tutte le strutture trasfusionali italiane. È stato inoltre richiesto alle ditte Roche Diagnostics, Chiron Corporation e Ortho Clinical Diagnostics di utilizzare la loro rete commerciale per raccogliere i questionari compilati presso le strutture trasfusionali e riconsegnarli al gruppo di lavoro che li ha successivamente elaborati.

La raccolta di dati è stata promossa a partire dall'inizio dell'anno 2001 e in riferimento a metodiche NAT e non NAT (ricerca dell'HCVcoreAg con metodo EIA) poiché già da quell'anno in numerose Regioni italiane erano state introdotte in via sperimentale, anche prima dell'obbligo di legge.

In taluni Servizi trasfusionali alla ricerca di HCV RNA è stata aggiunta anche la ricerca di HIV RNA in parte perché veniva utilizzata la metodica Chiron, che fornisce contemporaneamente i due risultati, in parte per specifica scelta del Servizio trasfusionale.

La raccolta dei dati è stata effettuata in due fasi: nella prima sono stati raccolte le informazioni sui test effettuati tra il 1 gennaio e 31 dicembre 2001 per il solo HCV, la seconda raccolta di dati è stata effettuata per il periodo 1 gennaio 31 dicembre 2002 sia per HCV sia per HIV.

Il questionario era costituito da una prima parte nella quale erano richiesti i dati analitici complessivi (n. test effettuati su *first time donors* e su *repeat donors*, n test inizialmente reattivi, n test confermati positivi ed esito dei test EIA) e da una seconda parte nella quale erano richiesti dati anamnestici e i fattori di rischio inerenti i soggetti risultati positivi alla sola ricerca di HCV RNA, HCVcore Ag o HIV RNA.

Complessivamente 219 strutture trasfusionali hanno fornito le informazioni richieste e sono stati elaborati i dati relativi allo screening per componenti del virus C di 2.756.739 unità raccolte nel periodo compreso tra 1/1/01 e 31/12/02: di queste 859.177 unità sono state testate in 30 centri trasfusionali con metodica Chiron TMA HIV/1-HCV, di cui 707.561 su singolo donatore in 25 centri e 151.616 su *pool* di 8 campioni in altri 5 centri.

1.047.482 unità sono state testate in 80 centri trasfusionali con metodica Cobas Ampliscreen HCV Roche, su *mini-pool* da 10 a 24 campioni, e 850.080 unità sono state testate in 109 centri trasfusionali con Ortho HCV CoreAg.

Per l'anno 2002 sono stati inoltre raccolti ed elaborati i dati dello screening degli emocomponenti per HIV RNA: sono state testate 888.506 unità in 40 centri trasfusionali: 700.562

unità sono state testate in 29 centri trasfusionali con metodica Chiron TMA HIV/1-HCV e 187.944 unità sono state testate in 11 centri con metodica Cobas Ampliscreen HIV Roche.

La metodica per la ricerca di HCVcoreAg è un classico test EIA semiautomatico, la metodica per la ricerca di HCV RNA della ditta Chiron è un test NAT basato sul metodo *Transcription Mediated Amplification* (TMA) e la metodica Roche è basata sul metodo della *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Tutte le unità sono inoltre state analizzate, come di consueto, anche per i marcatori sierologici HCVAb, HIV1-2 Ab con metodiche immunoenzimatiche di terza generazione.

I campioni reattivi sono stati ritestati in duplicato e quelli confermati positivi con la metodica Chiron sono stati ulteriormente esaminati con il test di discriminazione, mentre per i *pool* confermati positivi con la metodica Roche l'identificazione del campione positivo è stata effettuata dai singoli centri attraverso protocolli propri (*pool* secondari o matrice).

I campioni ripetutamente reattivi anche per HCV Ab sono stati sottoposti al test supplementare e quelli ripetutamente positivi per HIV 1-2 sono stati confermati in Western Blot.

Risultati

La Tabella 1 confronta, per ogni Regione, il numero di strutture trasfusionali censite dal Registro Nazionale Sangue e Plasma nell'anno 2001 con il numero di strutture autorizzate ad eseguire i test NAT.

Tabella 1. Strutture trasfusionali censite per il Registro Nazionale Sangue e Plasma nel 2001 (dati ISS) e quelle autorizzate ad eseguire i test NAT per la validazione delle unità di emocomponenti (dati HJ Hassan, comunicazione personale)

Regione	Strutture censite (2001)	Strutture autorizzate ad eseguire i test NAT
Piemonte	20	14
Valla d'Aosta	1	1
Lombardia	36	15
Provincia autonoma Bolzano	2	2
Provincia autonoma Trento	2	1
Veneto	19	17
Friuli-Venezia Giulia	7	3
Liguria	12	6
Emilia Romagna	13	6
Toscana	40	4
Umbria	4	2
Marche	12	1
Lazio	23	2
Abruzzo	10	6
Molise	3	1
Campania	21	3
Puglia	28	11
Basilicata	4	1
Calabria	12	5
Sicilia	32	4
Sardegna	13	2
Totale	314	107

Lo studio condotto dal “Gruppo Italiano per lo Studio delle Malattie Trasmissibili” ha consentito di raccogliere, per l’anno 2001, i risultati sulla ricerca di HCV RNA di 1.219.033 unità di sangue o emocomponenti da 167 Strutture Trasfusionali (ST), mentre per il secondo anno sono stati raccolti dati su 1.537.706 unità da 94 ST.

Nei due anni di osservazione sono stati raccolti complessivamente dati inerenti la ricerca di HCV RNA su 2.756.739 unità di emocomponenti esaminate in 219 ST in Italia.

La Tabella 2 riporta in dettaglio il numero delle unità testate e delle ST partecipanti allo studio.

Tabella 2. ST che hanno fornito dati allo studio nazionale condotto dal “Gruppo Italiano per lo studio delle malattie trasmissibili”, numero di unità testate per ognuna delle metodiche utilizzate per la ricerca di componenti di HCV

Casa	2001 (1/1-31/12)			2002 (1/1-31/12)		Totale		
	ST	Unità testate		ST	Unità testate	ST	Unità testate	
		HCV RNA	HCVcore Ag		HCV RNA		HCV RNA	HCVcoreAg
Chiron	15	158.615		29	700.562	30	859.177	
Roche	43	210.338		65	837.144	80	1.047.482	
Ortho	109		850.080			109		850.080
Totale	167	368.953	850.080	94	1.537.706	219	1.906.659	850.080

Le informazioni inerenti la ricerca di HCVcoreAg sono state raccolte solo per l’anno 2001, mentre quelle sulla ricerca di HIV RNA sono state raccolte solo per il 2002.

La Tabella 3 riporta i dati inerenti la ricerca di HIV RNA.

Tabella 3. ST che hanno partecipato allo studio nazionale, numero di unità testate per ognuna delle metodiche utilizzate per la ricerca di componenti di HIV

	Chiron TMA	Roche PCR	Totale
Centri che hanno fornito i dati	29	11	40
Unità testate per HIV RNA	700.562	187.944	888.506

Nelle Tabelle 4 e 5 sono riportati, rispettivamente, i risultati generali dello studio e la valutazione del vantaggio dovuto all’introduzione dei nuovi test, nonché una rivalutazione del rischio residuo trasfusionale per HCV e HIV.

Tabella 4. Risultati dello studio nazionale in dettaglio

	Chiron	Roche	ORTHO HCV core Ag	Totale
Test				
inizialmente reattivi	1829	296	5447	7572
ripetutamente reattivi	240 (13,1%)	68 (22,9%)	610 (11,1%)	918
confermati positivi	240	68	6	314
HCV NAT+/EIA Ab+	212	59		271
HCV NAT+/EIA Ab-	2	4		6
HCV coreAg +/EIA Ab+			6	6
HCV coreAg +/EIA Ab-			0	0
HIV NAT+/EIA Ab+	25	5		30
HIV NAT+/EIA Ab-	1			1

Tabella 5. Confronto tra la riduzione stimata e osservata del rischio residuo di trasmissione di infezioni da HCV e HIV dopo l'introduzione dei test NAT

Virus	Rischio residuo basato sui test EIA (IC 95%)*	Casi attesi/10 ⁶ con test EIA (IC 95%)*	Stima casi identificati con l'introduzione dei test NAT/10 ⁶ (IC 95%)*	Casi osservati dopo l'introduzione dei test NAT/10 ⁶ (IC 95%)	Rischio residuo dopo EIA e NAT testing/10 ⁶ (IC 95%)
HCV	1:154.000 (122.000-217.000)	6,5 (4,6-8,2)	5,4 (3,8-6,9)	3,1 (0,6-5,7)	1,1 (0,8-1,4)
HIV	1:417.000 (345.000-588.000)	2,4 (1,7-2,9)	1,2 (0,9-1,4)	1,1 (0,9-2,0)	1,2 (0,9-1,4)

*I dati epidemiologici cui si riferiscono i test sierologici sono tratti dal "Rapporto annuale sulle infezioni trasmissibili con la trasfusione in Regione Lombardia per gli anni 1996-2002".

Discussione

L'introduzione dei test NAT nello screening del sangue ha comportato, in Italia, qualche difficoltà organizzativa e ha accelerato le necessità di riordino delle attività di validazione biologica del sangue: il risultato di ridurre i siti ove i test vengono effettuati può essere considerato un effetto indiretto, ma positivo della necessità di introdurre tecnologia avanzata nei servizi trasfusionali.

Il tempo impiegato perché tutti i servizi trasfusionali autorizzati fossero a regime è stato di circa 18 mesi, ma attualmente il NAT *testing* è operativo a livello nazionale e in numerose regioni allo screening per l'HCV RNA è stato aggiunto anche lo screening per HIV RNA ed è in discussione la possibilità di introdurre quello per HBV DNA.

L'introduzione della tecnologia di amplificazione genica nello screening delle unità di sangue e di emocomponenti è ormai divenuta una routine nei Paesi a sviluppo tecnologico avanzato⁵ nonostante le perplessità suscitate da alcuni autori in merito alla valutazione del rapporto costi/benefici e alle oggettive difficoltà organizzative che questa scelta ha comportato per le strutture trasfusionali (6).

Tali difficoltà si sono rivelate più evidenti nei Paesi con modello organizzativo del servizio trasfusionale più decentrato, a causa delle maggiori difficoltà di standardizzazione e ai costi maggiori dovuti ad una minore possibilità di economie di scala.

Inoltre i dati che emergono dallo studio condotto da SIMTI documentano, nei 2 anni di osservazione, una riduzione del numero di centri operativi con un aumento del numero di unità testate per centro: nel primo anno, infatti, quando era ancora utilizzato il test EIA per HCVcoreAg di più facile utilizzo, 167 strutture hanno fornito dati su 1.219.033 unità, pari a una media di 7.299 unità/centro. Nel secondo anno, solo per metodiche NAT, 94 strutture hanno fornito dati per 1.537.706 unità, pari ad una media per centro di 16.358 unità.

Si tratta di un progresso di poco conto se paragonato a quanto avviene in altri Paesi europei o negli USA, ma è da considerare rilevante nella realtà italiana dove nessun altro provvedimento era riuscito ad ottenere tanto.

Lo studio condotto nei 2 anni ha consentito di osservare che la prima fase (anno 2001) la tecnologia NAT è stata introdotta in modo limitato e con carattere di sperimentazione nei servizi trasfusionali italiani: 355.066 test nell'anno su un totale di 1.205.086 test eseguiti, mentre la

restante parte delle determinazioni è stata effettuata utilizzando la tecnica alternativa di ricerca dell'HCVcoreAg, che riproponeva la ben conosciuta tecnologia EIA.

Nell'anno successivo la tecnologia NAT ha progressivamente sostituito la metodologia EIA e dal secondo semestre 2002 è stata introdotta per tutte le unità donate, secondo quanto prescritto dalla normativa. Se si considera che in un semestre vengono donate in Italia circa 1.2-1.3 milioni di unità di sangue ed emocomponenti, i dati raccolti per l'anno 2002 confermano una ampia copertura del campione a livello nazionale. Anche il numero dei servizi trasfusionali che hanno risposto per lo stesso periodo (94) corrisponde alla quasi totalità dei servizi trasfusionali autorizzati a eseguire il test.

In riferimento ai due anni di osservazione, 859.177/1.906.659 unità di emocomponenti (pari al 45%) sono state esaminate utilizzando la metodica Chiron TMA, in gran parte su singolo campione, mentre 1.047.482/1.906.659 (pari al 55%) sono state indagate con la metodica Roche assemblando i campioni in *mini-pool* da 10-24.

Nel corso dei 2 anni di osservazione e su un totale di 1.906.659 unità esaminate per HCV RNA, 6 donazioni sono risultate positive per il solo NAT test, pari a 3.1 casi per milione e 1 donatore su 888.506 esaminati per HIV RNA è risultato positivo al solo test NAT, pari a 1.1 casi per milione.

In una precedente analisi effettuata su una popolazione di donatori della Lombardia⁷, aggiornata con i dati epidemiologici fino al 2002, era stato applicato il modello matematico tasso di incidenza/intervallo finestra (IR/WP) proposto da Schreiber et al(8) ed era stato calcolato il rischio residuo di contrarre una infezione da virus C e da HIV sulla base dei test sierologici impiegati nello screening, il numero atteso di donatori che sarebbero potuti risultare positivi allo screening con i test NAT e il rischio residuo atteso trasfusionale dopo l'introduzione dei test NAT.

I risultati dell'indagine condotta nei due anni passati ci consente di verificare che, per il virus dell'epatite C, il numero di casi attesi positivi per il solo test NAT, 5.4/10(6) (I.C. 3.8-6.9), non è significativamente diverso dai valori osservati nello studio, 3.1/10(6), anche se i dati attesi sono stati calcolati sulla base di dati epidemiologici di una popolazione più limitata di donatori italiani.

Per quanto riguarda il virus HIV i nuovi casi attesi dopo l'introduzione dei test NAT erano 1.2 per milione di donazioni, mentre l'indagine nazionale ne ha evidenziati 1.1/10 (6).

È noto che l'incidenza di epatite B e C è maggiore nei Paesi del sud Europa rispetto a quelli del Nord e a quelli anglofoni (9, 10). In realtà, sulla base dei dati raccolti nei primi due anni di osservazione e considerando che il numero di donazioni annue in Italia è di circa 2.5 milioni, è possibile affermare che le donazioni riscontrate positive per il solo test NAT, rispetto a quelli EIA, siano complessivamente (HCV e HIV) circa 10 per anno. Se si assume che ogni donazione possa dare origine a 1.5 unità trasfuse (6) e che l'infettività delle unità trasfuse sia del 100%, si può affermare che l'introduzione dei test NAT in Italia ha impedito la trasmissione di HCV o di HIV a circa 15 riceventi in un anno.

Non è stata effettuata una valutazione più approfondita del rapporto costi/benefici, ma indubbiamente il dato appare rilevante.

Il confronto tra i dati epidemiologici precedentemente rilevati, quelli ottenuti attraverso i modelli matematici e quelli ottenuti nella realtà depone per una affidabilità del sistema di rilevazione dei dati e della loro elaborazione.

Il rischio residuo in Italia per HCV e per HIV, dopo l'introduzione dei test NAT, è ulteriormente diminuito e si conferma su valori molto ridotti e comparabile a quello di altri Paesi del Sud Europa ove i tassi di incidenza siano simili a quelli italiani (11).

Resta da verificare nel tempo se queste prime rilevazioni si confermeranno, in particolare per le regioni meridionali, e se si potrà assistere, come per altri Paesi, ad una diminuzione ulteriore

del rischio dovuta non più alla riduzione della finestra sierologica indotta dai nuovi test, ma anche alla diminuzione della incidenza di tali infezioni nella popolazione dei donatori.

Ringraziamenti

Il lavoro è presentato a nome del “Gruppo Italiano per lo Studio delle Malattie Trasmissibili” della SIMTI che è stabilmente costituito da Alessandro Zanetti e Luisa Romanò (Istituto di Virologia della Università degli Studi di Milano) e da Lorella Baruffi e Laura Fomiatti (DMTE di Sondrio). Per la raccolta di questi dati hanno partecipato G. Aprili (Verona), C. Bettini (Vicenza), M.G. Di Persia (Gallipoli), R. Gentile (Palermo), G. Peano (Cuneo), M. Piani (Ancona), G. Sciorelli (Monza).

Si ringraziano anche per la partecipazione attenta e solerte alla raccolta dei dati M. Bellotti (Roche Diagnostics) e D. Benucci (Chiron corporation).

Bibliografia

1. Committee for Proprietary Medicinal Products. *The introduction of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of Hepatitis C virus RNA in plasma pools*. London, 1998. (CPMP/BWP/390/97). Disponibile da: URL: <http://www.eudra.org>
2. Catalano L, Abbonizio F, Hassan HJ. *Registro nazionale e regionale del sangue e del plasma*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 03/15). Disponibile da: <http://www.iss.it>
3. Couroucé AM, Le Marrec N, Bouchardeau F *et al.* Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. *Transfusion* 2000;40:1198-202.
4. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S. Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors for Transfusion-Transmitted Infectious Disease. Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000;40:143-59.
5. Glynn SA, Kleinmann SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the Incidence Rate/Window Period model. *Transfusion* 2002;42:966-972.
6. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL and AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HCV, HIV and HBV in whole-blood donations. *Transfusion* 2003;43:721-9.
7. Velati C, Romanò L, Baruffi L *et al.* Residual risk of transfusion-transmitted HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy. *Transfusion* 2002;42:989-93.
8. Kleinman SH, Busch MP, Korelitz JJ, Schreiber GB, for the Retrovirus Epidemiology Donor Study. The incidence/window period model and its use to assess the risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfusion Med Rev* 1997;11:155-72.
9. Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, *et al.* Epidemiology of hepatitis C virus infection in Italy: the slowly unraveling mystery. *Microb Infect* 2000;2:1757-63.
10. Beutels M, Van Damme P, Aelvoet W, *et al.* Prevalence of hepatitis A, B and C in the Flemish population. *Eur J Epidemiol* 1997;13(3):275-280.
11. Eiras A, Sauleda S, Planelles D *et al.* HCV screening in blood donations using RT-PCR in mini-pool: the experience in Spain after routine use for 2 years. *Transfusion* 2003;43:713-20.

EPATITE POSTRASFUSIONALE DA HCV: BIOLOGIA E CLINICA

Daniele Prati (a, b)

(a) Dipartimento di Medicina Trasfusionale e di Ematologia, Ospedale "Alessandro Manzoni", Lecco

(b) Laboratorio di Epatologia e Virologia, Centro Trasfusionale e di Immunologia dei Trapianti, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano

Per più di 40 anni, la trasmissione di epatite virale da donatore a ricevente ha rappresentato una complicanza assai grave e frequente della trasfusione di sangue ed emoderivati. L'epidemia di epatite post-trasfusionale è ormai conclusa, almeno nei Paesi industrializzati e ricchi di risorse economiche. Oggi, l'attenzione di clinici e ricercatori si concentra soprattutto sull'individuazione di misure per la riduzione del rischio residuo, sulla possibile emergenza di nuovi patogeni in grado di indurre epatite con la trasfusione, e sul follow-up e la terapia dei pazienti che hanno acquisito l'infezione più di 10 anni fa.

Nei Paesi sviluppati, la trasmissione trasfusionale del virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) e del virus dell'epatite B (Hepatitis B Virus, HBV) può ancora verificarsi anche se molto raramente – a causa di limitazioni che sono inerenti alle tecniche in uso per lo screening virologico dei donatori di sangue. Il rischio attuale è quantificabile nell'ordine di pochi casi per milione di unità trasfuse, e viene in gran parte imputato alla trasfusione di unità di sangue raccolte da donatori durante la "fase finestra" che precede la sierconversione. Tuttavia, la recente introduzione di test biomolecolari (Nucleic Acid Testing, NAT) per lo screening dei donatori di sangue ha ulteriormente ridotto questo rischio. Altre potenziali cause di contagio sono rappresentate dall'emergenza di varianti virali e da errori di laboratorio (1).

In realtà, gli specialisti in vari campi della medicina si trovano oggi a fronteggiare gli effetti a lungo termine della passata epidemia di epatite post-trasfusionale, più che a contrastare l'insorgenza di nuovi casi di infezione. Le raccomandazioni attuali prevedono che i soggetti che abbiano ricevuto trasfusioni prima dell'introduzione dello screening anti-HCV di seconda generazione per i donatori si sottopongano a test anti-HCV (2), e numeri sempre crescenti di soggetti richiedono consulenza e trattamento antivirale. Un recente studio condotto in un centro epatologico di terzo livello ha dimostrato che più di un quinto di questi pazienti presenta cirrosi epatica all'esame istologico(3). In popolazioni particolari – per esempio i talassemici trasfusione dipendenti e gli emofiliaci – il grado di epatopatia può essere aggravato da co-fattori di malattia, come l'accumulo di ferro e l'immunodeficienza (4-7).

Alcuni dati sulla storia naturale dell'epatite C post trasfusionale osservati in diversi studi sono riportati nella Tabella 1.

Gli studi di coorte condotti in soggetti adulti hanno mostrato in modo abbastanza concorde che, dopo una media di 15 anni dall'evento trasfusionale, il 75% circa dei pazienti sono HCV RNA positivi, e la frequenza di cirrosi è intorno al 15-20%. Tuttavia, i numeri possono essere molto diversi in particolari serie di pazienti. Kenny-Walsh *et al.* (12) hanno descritto la storia naturale della malattia in un gruppo di donne irlandesi che avevano ricevuto alcuni lotti di immunoglobuline anti-D contaminati da HCV. A distanza di 17 anni dall'infezione, la frequenza di guarigione spontanea è stata inaspettatamente elevata (45%), e sono stati osservati pochissimi casi di cirrosi (2%). Questo decorso clinico favorevole può essere imputabile a molti fattori, tra cui la giovane età delle pazienti al momento dell'infezione, il sesso femminile, e la presenza di bassi titoli o di ceppi attenuati del virus nei lotti di immunoglobuline (14, 15). Va

inoltre rilevato che il 15% delle donne sottoposte a biopsia presentava fibrosi porto-portale o porto-centrale. Data la giovane età delle pazienti, è opportuno prolungare il periodo di osservazione prima di trarre conclusioni definitive. I dati recenti di Vogt *et al.* (13), che hanno descritto un decorso clinico relativamente benigno in soggetti infettati in età pediatrica, suggeriscono considerazioni analoghe.

Tabella 1. Studi di coorte sulla storia naturale dell'infezione da HCV post trasfusionale

Voce bibliografica	Pazienti (n.)	Età media (anni)	Durata di infezione (anni)	Guarigione spontanea* (%)	Frequenza di cirrosi (%)
Di Bisceglie [8]	39	62	10	N.D.	20.5
Tremolada [9]	135	54	8	N.D.	15.6
Koretz [10]	55	65	14	N.D.	19.5
Seeff [11]	103	N.D.	20	26	15
Kenny-Walsh [12]	704	45	17	45	2.0†
Vogt [13]	67	18	17	45	4.5

N.D. = dato non disponibile

(*) I dati sono basati sulla negatività di HCV RNA

(†) Il dato indica la frequenza di cirrosi in 363 pazienti HCV RNA negative

Per quanto riguarda la mortalità, la maggior parte dei dati derivano dall'ampio studio di coorte condotto nell'ambito del National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group (16, 17). Dopo 18-23 anni di osservazione di 568 casi di epatite post trasfusionale e 984 controlli, non sono state osservate differenze di mortalità globale. Tuttavia, la frequenza di decessi imputabili ad epatopatia è stata maggiore nei casi che avevano manifestato epatite (4%) rispetto ai controlli (1.7%).

Bibliografia

1. Prati D. Transmission of viral hepatitis by blood and blood derivatives: current risks, past heritage. *Dig Liver Dis* 2002; 34:812-7.
2. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28 February 1999. *J Hepatol* 1999;30:956-61.
3. Minola E, Prati D, Suter E, Maggiolo F, Caprioli F, Sonzogni A, *et al.* Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C. *Blood* 2002;99:4588-459.
4. Mannucci PM and Tuddenham MD. The Hemophilias – From royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001; 344:1773-9.
5. Prati D. Benefits and complications of regular blood transfusion in patients with beta-thalassemia major. *Vox Sang* 2000;79:129-37.
6. Colombo M, Mannucci PM, Brettler DB, *et al.* Hepatocellular carcinoma in hemophilia. *Am J Hematol* 1991;37:243-6.
7. Prati D, Maggioni M, Cerino, Della Torre E, Zanella A, Coggi G, *et al.* Histological evaluation of liver disease in patients with transfusion-dependent β thalassemia: a multicenter study [abstract]. *Digest Liver Dis* 2002;34:157.
8. Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ. Long-term clinical and histopathological follow up of chronic post-transfusion hepatitis C. *Hepatology* 1991;14:969-74.

9. Tremolada F, Casarin C, Alberti A, Drago C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G. Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. *J Hepatol* 1992;16:273-81.
10. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med* 1993;119:110-5.
11. Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, Wright EC, Bales ZB, and the NHLBI Study Group. Long-term morbidity of transfusion-associated hepatitis (TAH) C [abstract]. *Hepatology* 1998; 28:407A.
12. Kenny-Walsh E, for the Irish Hepatology Research Group. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999;340:1228-33.
13. Vogt M, Lang T, Frösner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, *et al.* Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999; 341:866-70.
14. Pagliaro L, Peri V, Linea C, Cammà C, Giunta M, Magrin S. Natural history of chronic hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31:28-44.
15. Cooksley WGE. Natural history of hepatitis C. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:1-3.
16. Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ, Alter HJ, Iber FL, *et al.* Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *N Engl J Med* 1992;327:1906-11.
17. Wright EC, Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, Buskell-Bales Z, Cain C and the NHLBI Study Group. Updated long-term mortality of transfusion-associated hepatitis (TAH), non-A, non-B and C [abstract]. *Hepatology* 1998;28:272A.

ALLESTIMENTO DELLE PREPARAZIONI DI RIFERIMENTO NAZIONALI

Giulio Pisani

Reparto Prodotti Immunologici, Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità - Roma.

Al fine di aumentare la sicurezza degli emoderivati nei confronti della trasmissione del virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV), nel 1997 l'Organismo Europeo per la valutazione dei farmaci (Committee for Proprietary Medicinal Products) invitò le ditte produttrici e gli organi di controllo a rilasciare sul mercato a partire dal 1° luglio 1999 solo emoderivati prodotti da *pool* di plasma risultati negativi per HCV-RNA ad un saggio di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) opportunamente convalidato e in grado di rilevare almeno 100 UI/ml (1). La Farmacopea Europea e il Ministero della Salute resero obbligatorio tale saggio a partire dalla stessa data (2, 3). Attualmente tale saggio viene eseguito anche a livello trasfusionale in molti Paesi tra cui l'Italia (4).

Per la ricerca degli acidi nucleici virali si possono utilizzare sia metodiche NAT sviluppate "in-house" sia kit commerciali o una combinazione di entrambi. I metodi in-house hanno un costo contenuto e indubbiamente una maggiore flessibilità di impiego rispetto ai kit commerciali ma richiedono un laborioso processo di standardizzazione. Tuttavia anche nel caso dei kit commerciali, l'attendibilità di un risultato non è solo legata alla corretta esecuzione e valutazione della singola reazione di amplificazione ma anche alla conoscenza dei principi di base della tecnica e di tutti i parametri che possano influenzarne il risultato. È quindi opportuno, a prescindere che si tratti di un metodo in-house o commerciale, convalidare le procedure utilizzando standard o preparazioni di riferimento, in modo da verificarne sensibilità, specificità e robustezza. A tal riguardo, una commissione di esperti europei ha formulato una linea guida per la convalida delle metodiche NAT (5).

Per raggiungere questi obiettivi è necessario disporre di preparazioni standard il cui contenuto in acido nucleico virale sia espresso mediante un'unità di misura riconosciuta a livello internazionale.

Nel 1995 nacque, sotto l'egida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il gruppo di lavoro SoGAT (Standardisation of Genomic Amplification Technologies). Il principale obiettivo di questo gruppo al quale aderirono laboratori ufficiali di controllo, ditte produttrici di emoderivati, centri universitari e produttori di kit diagnostici, oltre allo scambio di informazioni tecnico/scientifiche è stato quello di organizzare studi collaborativi volti sia alla standardizzazione delle metodiche NAT che allo sviluppo di standard internazionali.

Il primo risultato concreto dell'attività del gruppo di lavoro SoGAT è stata la definizione nel 1997 del primo standard internazionale per HCV a cui hanno fatto seguito quelli per HIV, HBV, parvovirus B19 e HAV (6-9) (Tabella 1).

Tabella 1. Standard Internazionali per metodiche NAT

Standard	Lotto	Unità di misura
WHO HCV-RNA	96/790	50.000 UI/fiala
WHO HBV-DNA	97/746	500.000 UI/fiala
WHO HIV-RNA	97/656	100.000 UI/fiala
WHO B19-DNA	99/800	500.000 UI/fiala
WHO HAV-RNA	00/560	50.000 UI/fiala

La caratteristica di queste preparazioni è l'espressione del contenuto virale in Unità Internazionali (UI). Sulla base dell'assunto che una "unità di PCR rilevabile" è la quantità minima di acido nucleico virale necessaria per ottenere un risultato positivo fu possibile attribuire, attraverso studi collaborativi internazionali, il contenuto in UI alle varie preparazioni standard sviluppate dall'ente inglese National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Gli standard internazionali per la NAT non rispondono tuttavia alla rigorosa definizione dettata dalla International Organization for Standardisation (ISO), ossia di *primary international biological reference material*. Infatti un materiale di riferimento deve avere una concentrazione espressa in unità di misura, come ad esempio milligrammi o moli, che il Sistema Internazionale di misura ha adottato per quelle sostanze le cui procedure analitiche sono universalmente definite (elettroliti, glucosio, colesterolo, ecc.). Questi criteri ovviamente non possono essere applicati a quegli analiti poco definiti ed eterogenei, per i quali i test oggi disponibili si basano essenzialmente sulla determinazione di funzioni biologiche, su procedure per il rilevamento del complesso antigene-anticorpo o su tecniche di amplificazione genica. Nel caso delle tecniche NAT, uno standard che soddisferebbe i requisiti della ISO potrebbe essere ad esempio un acido nucleico di sintesi la cui concentrazione verrebbe espressa ad esempio in moli/l o mg/ml.

Al momento gli standard sviluppati dal NIBSC sono gli unici riconosciuti a livello internazionale e che hanno consentito il raggiungimento di un elevato livello di standardizzazione dei metodi NAT e l'armonizzazione dei risultati.

Poiché le preparazioni standard per la NAT vengono prodotte dal NIBSC in numero ridotto (2000-3000 fiale), da cui la definizione *gold standard*, la loro distribuzione è limitata. Di conseguenza, i laboratori che eseguono la NAT dovrebbero sviluppare delle proprie preparazioni di riferimento utilizzando come calibratori tali "gold standard". L'approccio metodologico da seguire prevede in genere: la selezione e la caratterizzazione virologico-molecolare di una donazione positiva per il virus d'interesse; la determinazione approssimativa della carica virale; la diluizione in un opportuno volume di plasma seguita da infialamento; la titolazione contro lo standard internazionale.

Già in passato la disponibilità dello standard internazionale per HCV-RNA ha reso possibile la calibrazione di diverse preparazioni di riferimento. Ad esempio nel 1998, attraverso uno studio collaborativo internazionale al quale parteciparono 19 laboratori, sono state calibrate in UI le preparazioni HCV-RNA sviluppate dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), dal NIBSC, dal Paul-Ehrlich Institut (PEI), dal Central Laboratory of the Blood Transfusion Centre (CLB) e dal Food and Drug Administration (FDA) (Tabella 2) (10).

Tabella 2. Preparazioni di riferimento HCV-RNA calibrate in UI/ml

Preparazione	Paese	UI/ml	Gen.eq./ml
Standard Internazionale	-----	100.000	100.000
PEI ref. 5	Germania	25.704	80.000 - 300.000
NIBSC 96/586	Inghilterra	741	1.800 - 4.300
CLB Pelispy	Olanda	1.000	3.800
ISS 0498	Italia	1.700	8.800
CBER panel #1	USA	269	1.000

La preparazione dell'ISS, denominata lotto *ISS 0498*, è stata largamente utilizzata dalle industrie di frazionamento per l'esecuzione di studi di convalida della NAT e dallo stesso RPI-ISS per realizzare studi di valutazione esterna di qualità (11-13). La recente estensione

dell'obbligo di eseguire la NAT anche al sangue e agli emocomponenti destinati alle trasfusioni ha fatto aumentare in maniera esponenziale la richiesta della preparazione *ISS 0498* da parte dei Centri Trasfusionali. Si è reso quindi necessario allestire una nuova preparazione di riferimento nazionale per HCV-RNA.

Sviluppo e calibrazione della nuova preparazione HCV RNA ISS 0102

La preparazione HCV-RNA *ISS 0102* è stata allestita diluendo opportunamente con plasma negativo un campione di plasma positivo per HCV-RNA di genotipo 1. Sono state preparate 1000 fiale (1,25 ml/fiala), che sono state immediatamente congelate a -80°C . Per la titolazione della preparazione *ISS 0102* è stato usato il 1° Standard Internazionale per HCV-RNA, WHO 96/790, una preparazione liofila di genotipo 1 contenente 5×10^4 UI/fiala (6).

Con gli stessi approcci metodologici precedentemente adottati per la calibrazione di altre preparazioni di riferimento è stato organizzato uno studio collaborativo nazionale per la titolazione in UI/ml della preparazione HCV RNA al quale hanno aderito 22 centri trasfusionali e 2 industrie di frazionamento.

A ciascun partecipante è stato inviato un set di 4 pannelli con diluizioni semi-logaritmiche dello standard WHO e della preparazione *ISS-0102* per essere sottoposti a NAT per HCV-RNA. Ai partecipanti è stato chiesto di saggiare i pannelli con la metodica NAT qualitativa da loro correntemente utilizzata.

L'elaborazione statistica dei risultati ricevuti è stata eseguita mediante analisi dei Probit, applicando il metodo della massima verosimiglianza dei saggi di diluizione limite e utilizzando un pacchetto statistico, SAS System, versione 8.01 (Cary, NC).

Per ogni laboratorio è stato calcolato l'*end-point* al 63% relativo ad ognuna delle due serie di diluizioni, contenenti lo Standard e la preparazione candidata. Dopo opportuna compensazione per il volume di plasma equivalente amplificato specifico della metodica utilizzata, è stato calcolato per ognuna delle due preparazioni il numero delle "copie" rilevabili/ml espresso come logaritmo. Poiché tale numero non corrisponde necessariamente al numero reale di copie presenti nel campione, il termine "copie" è stato sostituito con "unità PCR rilevabili".

La potenza relativa della preparazione *ISS 0102* è stata calcolata sottraendo al logaritmo delle unità PCR rilevabili/ml della preparazione candidata il logaritmo delle unità PCR rilevabili/ml dello Standard Internazionale. Dopo correzione della potenza relativa contro lo Standard Internazionale è stato ottenuto per ciascun laboratorio il titolo della preparazione candidata espresso come \log_{10} UI/ml.

La media dei singoli titoli ottenuti dai laboratori partecipanti allo studio ha rappresentato il titolo della preparazione *HCV-RNA ISS 0102* che è risultato essere di 4500 UI/ml.

Uno studio analogo è stato condotto recentemente anche per una preparazione di HIV RNA lotto 0103, il cui titolo è risultato essere di 6500 UI/ml.

La stabilità di queste preparazioni viene monitorata dallo stesso ISS ogni 12 mesi. Le preparazioni sono a disposizione dei laboratori che ne faranno richiesta. I relativi moduli possono essere scaricati dal sito web: www.rpi.iss.it.

Bibliografia

1. Committee for Proprietary Medicinal Products. *The introduction of nucleic acid amplification technology for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma pools.* (CPMP/390/97).

2. Human plasma for fractionation (2000:0853). In: Farmacopea Europea III edizione; 2000.
3. Introduzione della ricerca di acido nucleico del virus dell'epatite C mediante la tecnica di amplificazione genica nei pool di plasma umano utilizzati per la produzione di emoderivati. Ministero della Sanità, DM 29 marzo 1999. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 87. p. 57-58.
4. Adeguamento dei livelli di sicurezza trasfusionale in presenza di metodiche atte alle indagini sui costituenti virali per HCV. Min. Salute, circ. 17 30.10.2000. *Gazzetta Ufficiale* n. 258.
5. Guidelines for Validation of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the detection of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in plasma pools (PA/PH/OMCL 98, DEF).
6. Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sanguinis* 1999;76:149-58.
7. Holmes H, Davis C, Heath A, Hewlett I, Lelie N. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *J Virol Methods* 2001;141-50.
8. Saldanha J, Lelie N, Heath A and the WHO Collaborative Study Group. Establishment of the first International Standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assay for HBV DNA. *Vox Sanguinis* 2001;80:63-71.
9. Saldanha J, Lelie N, Yu MW, Heath A. Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sanguinis* 2002;82(1):24-31.
10. Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and the Collaborative Study Group. Calibration of HCV working reagents for NAT assay against the HCV International Standard. *Vox Sanguinis* 2000;78:217-24.
11. Gentili G, Pisani G, Bisso G, Cristiano K, Wirz M, Mele C and the EQA participants: Hepatitis C virus testing of plasma pools by nucleic acid amplification technology: external quality assessment. *Vox Sanguinis* 2001;81:143-7.
12. Pisani G, Cristiano K, Wirz M, Bisso GM, Gentili G and EQA Participants. Further evidence on the high proficiency of laboratories involved in plasma pool testing for HCV RNA by nucleic acid amplification technology. *Vox Sanguinis* (in corso di stampa).
13. Gentili G, Pisani G, Saldanha J, Cristiano K, Wirz M, Bisso GM, Mele C and the EQA participants. High proficiency in detecting the six major HCV genotypes of laboratories involved in testing plasma by nucleic acid amplification technology. *Vox Sanguinis* (in corso di stampa).

VALIDAZIONE VIRALE NELLA PRODUZIONE DI EMODERIVATI

Anna Rita Ciccaglione, Maria Rapicetta
Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La sicurezza virale dei farmaci derivati da plasma umano ha come obiettivo finale quello di garantire l'assenza di trasmissione di infezioni virali in seguito alla somministrazione di tali farmaci. L'importanza di tale problematica è diventata evidente a partire dalla fine degli anni '80, a seguito della dimostrazione della trasmissione di virus HIV e di virus dell'epatite di tipo A (Hepatitis A Virus, HAV), B (Hepatitis B Virus, HBV) e C (Hepatitis C Virus, HCV) dopo somministrazione di prodotti derivati dal sangue. Per questi virus e anche per altri virus quali: Citomegalovirus, Virus di Epstein Barr e Parvovirus umano B19, il rischio di infezione post-trasfusionale è stato chiaramente definito. Esiste inoltre il rischio potenziale per tutti quei virus nuovi o emergenti che presentino fasi di viremia durante il loro ciclo patogenetico.

Le attività di controllo della sicurezza virale dei farmaci emoderivati sono svolte dall'Istituto Superiore di Sanità. L'approccio generale che viene seguito per la riduzione del rischio di trasmissione si basa su tre differenti livelli:

1. *Materiale originario*

Il primo livello è rappresentato dal controllo del materiale originario cioè il plasma di partenza. Questo avviene attraverso la valutazione dei criteri utilizzati per la selezione del plasma e per l'esclusione dei donatori. E inoltre attraverso la valutazione delle indagini virologiche svolte sulle donazioni di sangue e sui *plasma pool*. Viene in particolare valutata l'idoneità dei marcatori virali esaminati e l'idoneità anche dei saggi impiegati, le cui caratteristiche devono essere conformi con quanto richiesto dalle regolamentazioni vigenti.

2. *Processo di produzione*

Il secondo livello di controllo viene effettuato sul processo di produzione. A tale proposito è importante sottolineare che la sicurezza virale degli emoderivati dipende in larga parte dalla capacità del processo produttivo di eliminare un ampio spettro di virus che possono essere presenti nonostante il controllo del materiale di partenza. La valutazione della capacità del processo produttivo di eliminare virus è quindi fondamentale per la sicurezza dei farmaci che derivano da sangue.

3. *Prove sperimentali*

Infine, il terzo livello di controllo si basa sulla ricerca di virus negli intermedi di produzione o nel prodotto finale. Nella maggior parte dei casi un'ottimizzazione dei primi due livelli di controllo è tuttavia sufficiente per il raggiungimento di un rischio residuo estremamente basso.

I criteri per una valutazione corretta della capacità del processo produttivo di eliminare virus sono definiti nelle linee guida europee CPMP/268/95 "Virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses" che definisce i criteri per il disegno sperimentale, la scelta dei virus e l'interpretazione dei risultati e

CPMP/269/95 “Plasma-derived medicinal products” che si riferisce in maniera specifica ai farmaci emoderivati.

La programmazione degli studi di validazione virale da parte delle ditte produttrici prevede l’identificazione iniziale di specifiche fasi del processo di produzione potenzialmente capaci di eliminare virus (Figura 1).

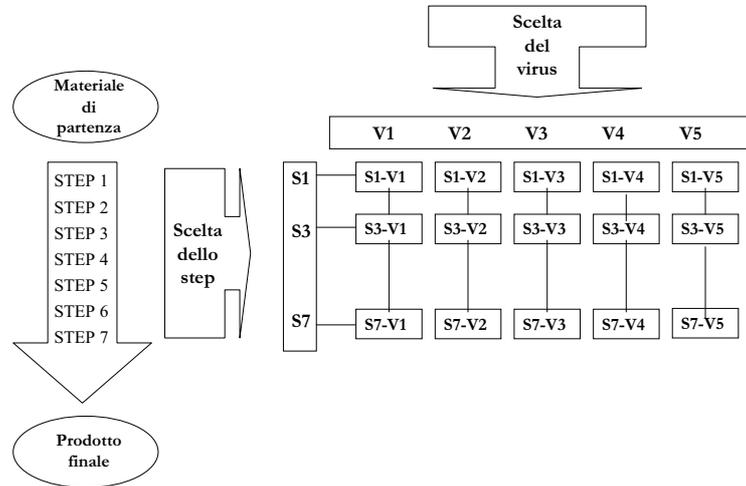


Figura 1. Scelta delle fasi del processo produttivo

Tali fasi vengono riprodotte in laboratorio in piccola scala e una quantità definita di un virus modello viene aggiunta deliberatamente all’inizio del processo e valutata alla fine. La riduzione del titolo virale ottenuta rappresenta una misura dell’efficacia di inattivazione/rimozione di quella fase nei confronti del virus saggiato (Figura 2).

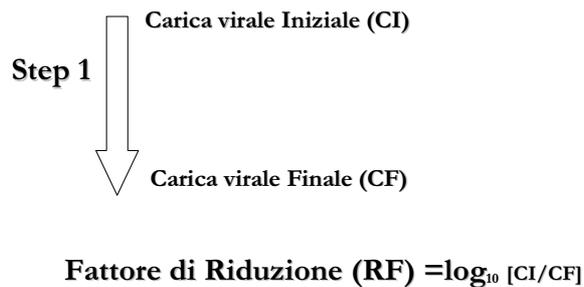


Figura 2. Modello di laboratorio (scaling down)

Gli studi sperimentali devono contenere elementi che chiariscano il meccanismo di riduzione dell’infettività virale (inattivazione o rimozione) e che dimostrino la robustezza dei valori di riduzione, attraverso una valutazione degli effetti prodotti da variazioni in alcuni parametri

sperimentali critici. I limiti entro cui tali parametri possono variare senza influenzare l'efficacia del processo devono essere esattamente definiti e controllati durante la produzione.

La capacità del processo produttivo di determinare una riduzione della carica virale si basa sulla presenza di due tipi di fasi. Le fasi che determinano il frazionamento delle particelle virali e sono quindi responsabili della rimozione del virus e quelle che sono vere e proprie fasi di inattivazione dell'infettività virale.

La rimozione virale dovuta a fasi di frazionamento, quali precipitazione alcolica e cromatografia, è più difficile da caratterizzare in quanto queste fasi mostrano una notevole variabilità e sono influenzate da numerosi parametri. Inoltre, tali procedure sono difficili da riprodurre in laboratorio cosa indispensabile per il lavoro di validazione virale. Un metodo relativamente nuovo di rimozione virale si basa sull'uso di membrane per nanofiltrazione. Se il prodotto è filtrabile attraverso pori di dimensione ridotta (15-75 µm) il metodo ha un'elevata capacità di ritenzione di un largo spettro di virus di differente dimensione. Tuttavia è importante sottolineare che questa procedura non garantisce l'assenza di virus nel filtrato e deve quindi essere considerata un metodo complementare da associare ad altre procedure efficaci per l'inattivazione/rimozione virale. Tra i parametri importanti per la nanofiltrazione ci sono quelli che si riferiscono alle proprietà di membrana (dimensioni del poro, integrità del filtro), i parametri operativi (pressione, velocità del flusso) e quelli relativi alle preparazioni virali usate. Infatti, è importante dimostrare l'assenza di aggregazione virali in quest'ultime.

Tra i metodi di inattivazione virale riveste particolare importanza il trattamento con solvente/detergente (S/D). L'inserimento di questa fase nel processo produttivo conferisce infatti un elevato grado di sicurezza nei confronti di virus provvisti di *envelope* con documentata trasmissione (HIV, HCV, HBV) o nuovi pur risultando inefficace per virus sprovvisti di *envelope*. Il trattamento con S/D deve essere valutato in esperimenti di cinetica di inattivazione per escludere la perdita di efficacia del trattamento nel tempo o l'emergenza di frazioni virali residue resistenti. Parametri critici di questa fase sono il tipo e la concentrazione di detergente, la temperatura e la composizione in proteine e lipidi.

Il trattamento al calore rappresenta un altro importante metodo di inattivazione virale. In generale è altamente efficace nei confronti di virus con *envelope* ma può avere un'efficacia limitata nei confronti di virus senza *envelope* quali il Parvovirus B19. Parametri critici da valutare sono l'effetto degli stabilizzatori, usati per proteggere il prodotto in fase liquida, sul virus, le lievi variazioni di temperatura e la concentrazione dei componenti nel prodotto liofilizzato.

Il parere sulla validità degli studi virali richiede un'attenta interpretazione dei risultati sperimentali. Uno dei principali elementi che viene preso in considerazione è il Fattore di Riduzione (RF) del titolo virale per ognuno dei virus esaminati. L'RF deve raggiungere valori prefissati e differenti per virus con *envelope* e senza *envelope*, e risultare dalla valutazione di almeno due fasi del processo produttivo efficaci nell'eliminazione del virus. Altri fattori importanti sono l'idoneità dei virus esaminati e la validità del sistema sperimentale impiegato che deve riprodurre il più fedelmente possibile le condizioni di produzione.

Attualmente i criteri di scelta dei virus da esaminare prevedono l'inserimento nei protocolli sperimentali di virus noti che potrebbero contaminare il prodotto (HIV, HBV, HCV, HAV, B19). Nei casi in cui non esista un sistema di produzione/titolazione del virus (HCV, HBV, B19) questo deve essere sostituito da un opportuno virus modello. Devono comunque essere presenti virus che coprano l'intero range di caratteristiche chimico-fisiche e per cui siano disponibili saggi di infettività sensibili ed efficienti allo scopo di ridurre il rischio di trasmissione di virus non noti. Devono essere pertanto inclusi sia virus a RNA che virus a DNA, provvisti e sprovvisti di *envelope* (Figura 3).

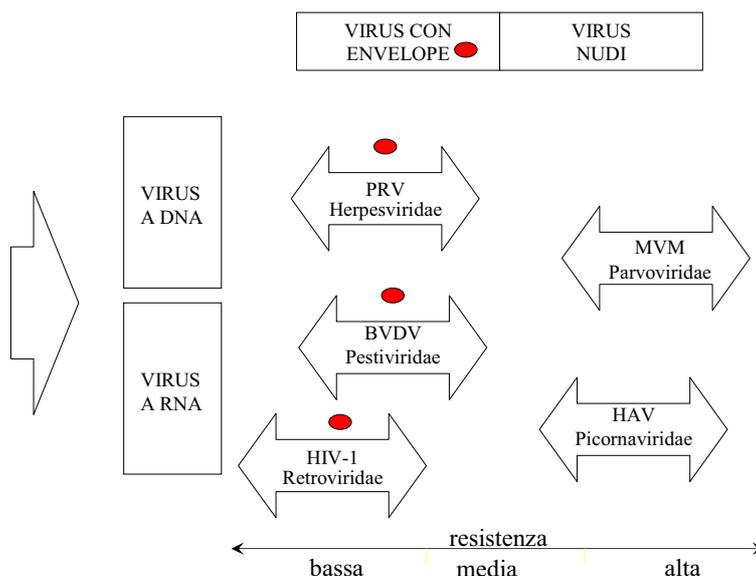


Figura 3. Virus modello

Per la validazione di un processo devono essere utilizzati almeno quattro modelli virali. Nella Tabella 1 sono riportati alcuni virus modello usualmente utilizzati e per cui sono disponibili saggi standardizzati.

Tabella 1. Esempi di virus applicati negli studi di validazione virale

Virus	Famiglia	Genere	Ospite naturale	Genoma	Involucro	Dimensioni	Forma	Resistenza ad agenti fisico/chimici
Virus della stomatite Vescicolare	Rhabdo	Vesiculovirus	Equino Bovino	RNA	SI	70x175 nm	Proiettile	Bassa
Virus Parainfluenzale	Paramyxo	Paramyxovirus	Vari	RNA	SI	100-200 nm	Pleomorfica-sferica	Bassa
Virus dell'immunodeficienza	Retro	Lentivirus	Uomo	RNA	SI	80-100 nm	Sferica	Bassa
Virus della Leucemia Murine	Retro	Oncovirus tipo C	Topo	RNA	SI	80-110 nm	Sferica	Bassa
Virus Sindbis	Toga	Alphavirus	Uomo (?)	RNA	SI	60-70 nm	Sferica	Bassa
Virus della diarrea bovina	Flavi	Pestivirus	Bovino	RNA	SI	50-70 nm	Pleomorfica-sferica	Bassa
Virus della Pseudorabbia	Herpes		Suino	DNA	SI	120-200 nm	Sferica	Media
Poliovirus, Sabin tipo 1	Picorna	Enterovirus	Uomo	RNA	NO	25-30 nm	Icosaedrica	Media
Virus (EMC) Dell'Encefalomiocardite	Picorna	Cardiovirus	Topo	RNA	NO	25-30 nm	Icosaedrica	Media
Reovirus tipo 3	Reo	Orthoreovirus	Vari	RNA	NO	60-80 nm	Sferica	Media
Virus dell'epatite A	Picorna	Hepatovirus	Uomo	RNA	NO	25-30 nm	Icosaedrica	Alta
SV40	Papova	Polyomavirus	Scimmia	DNA	NO	40-50 nm	Icosaedrica	Alta
Parvovirus (canino,porcino)	Parvo	Parvovirus	Canino Porcino	DNA	NO	18-24 nm	Icosaedrica	Alta

L'attività di valutazione degli studi virali relativi ai farmaci emoderivati viene effettuata presso il Laboratorio di Virologia dell'ISS ed è regolamentata dal decreto legislativo del 13/5/1996 "Disposizioni in materia di aggiornamento dei metodi di produzione e di valutazione di specialità medicinali costituite da emoderivati". Dal 1996 ad oggi sono state effettuate 244 valutazioni di dossier tecnici relativi alla sicurezza virale (Tabella 2). La maggior parte dei dossier esaminati si riferisce ad Immunoglobuline (51%) seguite da Fattori della coagulazione (17%) e Albumina (15%). Il massimo numero di valutazioni è stato espresso negli anni 1997 (109) e nel 1998 (44) in seguito all'uscita del decreto del 13/5/1996. Il numero di valutazioni si è quindi stabilizzato su una media di 17 pareri l'anno. Il numero di prodotti esaminati risulta inferiore rispetto alle valutazioni espresse, ciò indica che per la maggior parte dei farmaci è stata necessaria la valutazione di documentazione aggiuntiva e/o aggiornata.

Tabella 2. Controllo dei prodotti emoderivati (n. di valutazione dal 1996 al 2003, DL.vo 13/5/1996)

Anno	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Totale
Immunoglobuline	3	72	26	8	7	11	8	5	140
Albumina	-	16	5	4	3	5	4	-	37
FVIII	-	6	3	-	-	1	2	2	14
FIX	2	2	2	1	-	1	2	4	14
ATIII	1	1	3	3	3	2	-	-	13
PPS	-	4	4	1	1	1	-	-	11
Altro	-	8	1	-	-	-	3	3	15
TOTALE	6	109	44	17	14	21	19	14	244

Le prospettive future nel campo delle validazioni virali riguardano la messa a punto di nuovi metodi di inattivazione/rimozione virale (blu di metilene, fotosensibilizzazione) o il miglioramento delle procedure di nanofiltrazione, promettenti per quei virus come il B19 con elevata resistenza chimico-fisica. Inoltre, esiste la necessità di chiarire alcuni temi relativi alla scelta dei virus che sono attualmente in discussione.

In particolare, nel caso dell'HCV è ancora da stabilire se il modello virale ideale sia un virus appartenente alla stessa famiglia di Flavivirus e con proprietà chimico-fisiche simili quali il Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). Oppure se sia più opportuno l'uso di un modello virale con maggiore resistenza chimico-fisica per ognuna delle fasi d'inattivazione/rimozione virale esaminate. È stato, infatti, dimostrato che il Semliki Forest Virus (SFV), altro modello proposto per l'HCV, appartenente alla famiglia dei Togavirus, presenta una maggiore resistenza al calore e al trattamento con S/D. Mentre il BVDV può presentare maggiori difficoltà di rimozione durante il frazionamento alcolico. L'uso del modello più resistente per ognuna delle fasi specifiche potrebbe infatti garantire un maggiore grado di sicurezza.

Un altro aspetto tuttora in esame riguarda la possibilità di riduzione del rischio di trasmissione del parvovirus B19. Il B19 è un virus a DNA senza *envelope* che può provocare patologie di grave entità in particolari classi di soggetti (immunocompromessi, donne in gravidanza). Livelli di contaminazione da DNA di B19 sono presenti nei *plasma pool* e negli

emoderivati. Alcune caratteristiche del virus lo rendono particolarmente difficile da eliminare. Il B19 è infatti di piccole dimensioni e ciò rende complessa la filtrazione. Presenta un'alta resistenza nei confronti di molti procedimenti di inattivazione virale, quali il calore. Inoltre, non è attualmente disponibile un saggio di infettività *in vitro*. Le strategie future per una riduzione del rischio saranno quelle di sviluppare metodi efficaci per la rimozione/inattivazione del B19 e di ridurre la carica virale nei *pool* di produzione attraverso l'introduzione di saggi sensibili di amplificazione del DNA (NAT).

L'emergenza di virus nuovi, come di recente avvenuto per il virus SARS, richiede un costante livello di attenzione sulle possibilità di rischio di trasmissione virale legate all'impiego di farmaci emoderivati. L'impiego di nuove tecnologie per lo screening virale e per l'eliminazione dei virus, associato ad una caratterizzazione rigorosa dei modelli virali da impiegare nelle validazioni virali, rappresentano strategie vincenti per mantenere un livello di sicurezza elevato.

Tavola rotonda
Trasmissione e storia naturale dell'infezione da HCV

Moderatori: *A. Zanetti, E. Sagnelli*

DIFFUSIONE DELL'INFEZIONE DA HCV OGGI

Alfonso Mele, Andrea Mariano

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

Prevalenza

Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel mondo vi sono 170-200 milioni di soggetti con infezione da HCV (1). In Italia la prevalenza di anti-HCV positività aumenta progressivamente con l'età e procedendo dal Nord verso il Sud (Figura 1). Dai dati raccolti in diversi studi di popolazione condotti durante gli anni '90, tale prevalenza risulta di circa il 3% in adulti con meno di 50 anni mentre sale al 16% (8-36% a seconda delle Regioni) in soggetti di età superiore (2-8). Una percentuale variabile, a seconda degli studi, dal 54 all'85% circa dei soggetti anti-HCV positivi presenta un'effettiva replica virale (HCV-RNA positivi). La distribuzione dei genotipi di HCV presenta delle differenze a seconda della tipologia di soggetti considerati: nella popolazione generale il principale genotipo è l'1b seguito dal 2a-2c mentre nei tossicodipendenti i genotipi prevalenti sono l'1a e il 3a (2, 3, 7-12).

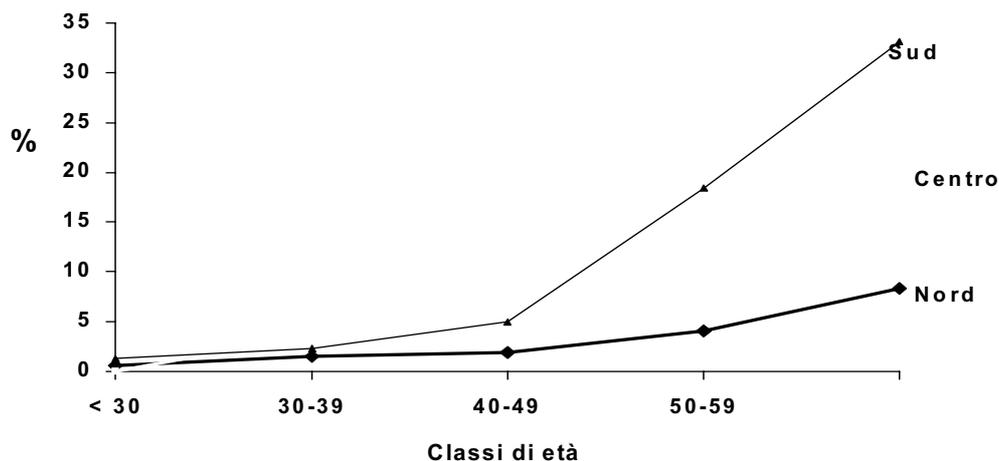


Figura 1. Prevalenza specifica per età di anti-HCV nella popolazione generale italiana (anni '90)

La distribuzione per età della positività per anti-HCV suggerisce un probabile effetto coorte per cui oggi osserviamo in gran parte gli esiti di un'epidemia che nel nostro Paese è stata particolarmente intensa tra gli anni '50 e l'inizio degli anni '80. Il basso livello igienico-sanitario e, in particolare, l'utilizzo di dispositivi medici non monouso e di procedure di sterilizzazione non ottimali hanno giocato un ruolo importante in questa diffusione del virus. Infatti gli studi caso-controllo effettuati in materia hanno individuato l'esposizione in passato a interventi chirurgici e a siringhe di vetro come forti fattori di rischio per epatite cronica C (13, 14).

Incidenza

Negli ultimi 15-20 anni l'incidenza dell'infezione da HCV è andata progressivamente riducendosi (Tabella 1). I dati del Sistema Epidemiologico Integrato delle Epatiti Virali Acute (SEIEVA) indicano, infatti, come i casi di epatite acuta sintomatica non-A non-B (circa il 75% di essi risulta anti-HCV positivo ai test di 3^a generazione al momento dell'esordio clinico) siano passati da 5 a 0,5 per 100000 abitanti tra il 1985 e il 2002. La riduzione è stata particolarmente evidente per la fascia di età 15-24 anni; l'andamento non presenta differenze significative riguardo al sesso e alla distribuzione geografica. Tale riduzione è attribuibile a diversi fattori: introduzione dello screening obbligatorio per anti-HCV in tutti i donatori di sangue dal 1992; impiego di dispositivi medici monouso; generale adozione di pratiche più sicure nelle procedure a rischio di contaminazione ematica (con un contributo determinante portato in tal senso dalla campagna anti-AIDS).

Tabella 1. Tassi di incidenza (per 100000 abitanti) dell'epatite acuta non-A non-B per anno e per classi di età (SEIEVA 1985-2002)

Anno	Fascia d'età			Totale
	0-14	15-24	25 e +	
1985	2	16	4	5
1986	1	10	4	4
1987	0,05	8	3	3
1988	1	9	2	3
1989	0	8	2	3
1990	0	6	2	2
1991	1	5	2	2
1992	0	4	2	2
1993	0	3	1	2
1994	0	3	2	2
1995	0	2	2	1
1996	0	2	1	1
1997	0	1	1	1
1998	0	1	1	1
1999	0,02	1	1	1
2000	0,01	0,07	0,07	0,06
2001	0,04	1	1	1
2002	0,01	0,6	0,6	0,05

Dato che l'infezione acuta da HCV è asintomatica in circa il 90% dei casi, i dati forniti dal SEIEVA, fondamentali per definire il trend di incidenza, rappresentano evidentemente una sottostima del reale numero di nuovi casi che si hanno annualmente in Italia.

Studi di popolazione, effettuati a cavallo fra gli anni '80 e '90 su coorti di soggetti adulti per i quali erano disponibili due sieri raccolti a diversi anni di distanza, hanno fornito stime di incidenza di infezione da HCV variabili da 14 per 100000 anni-persona al Centro (15), a 34 al Sud (11), a 50 al Nord (12). Nei donatori periodici (una sottopopolazione di soggetti notoriamente a basso rischio) sono state osservate 2,4 nuove infezioni per 100000 anni-persona (16).

Fattori di rischio

La frequenza di esposizione a possibili fattori di rischio nei 6 mesi precedenti l'esordio dei casi di epatite acuta C è riportata in Tabella 2. Si noti come la percentuale dei casi che riportano emotrasfusioni, dopo una decisa riduzione in atto già prima dell'introduzione dello screening obbligatorio per anti-HCV sui donatori, presenti una nuova lieve tendenza all'incremento in atto dal 1998.

Tabella 2. Frequenza dei fattori di rischio non mutuamente esclusivi riportati dai casi di epatite C acuta* nei 6 mesi precedenti l'esordio clinico (SEIEVA 1985-2002)

Anno	Emo- trasfusione	Uso droghe e.v.	Intervento chirurgico	Cure odontoiatriche	Altre esposizioni parenterali**	>1 partner sessuale ultimo anno
1986	20	14	24	20	15	31
1987	14	18	16	19	17	25
1988	15	20	19	19	14	21
1989	14	19	19	21	19	29
1990	10	23	16	20	17	18
1991	6	26	14	25	21	20
1992	3	25	13	24	22	33
1993	2	27	15	26	23	30
1994	3	25	16	30	27	35
1995	2,5	31	18	23	31	33
1996	1,5	33	15	28	26	32
1997	2	33	19	22	27	23
1998	6	33	21	27	33	21
1999	2	37	21	22	30	23
2000	5	42	16	22	30	34
2001	6	27	27	22	24	22
2002	8	29	29	25	29	25

*I dati precedenti al 1995 si riferiscono ai casi di epatite non-A non-B.

**Buchi all'orecchio o altro tipo di *piercing*, tatuaggi, manicure, pedicure, rasatura dal barbiere, agopuntura.

Attualmente, comunque, i fattori di rischio più frequentemente riportati sono: uso di droghe endovena, interventi chirurgici, altre esposizioni parenterali (buchi all'orecchio o altro tipo di *piercing*, tatuaggi, manicure, pedicure, rasatura dal barbiere, agopuntura), aver avuto più di un partner sessuale nell'ultimo anno, cure odontoiatriche.

Ma quali di questi fattori di rischio riferiti risultano associati in maniera significativa ai casi di epatite acuta C?

Utilizzando i casi di epatite A come controlli, l'analisi multivariata degli ultimi 6 anni di monitoraggio evidenzia come la tossicodipendenza per via endovenosa, avere un convivente o partner sessuale HCV positivo, gli interventi chirurgici, le emotrasfusioni e l'esposizione a trattamenti estetici presentino un'associazione statisticamente significativa con l'epatite acuta da HCV (Tabella 3). La maggiore o minore frequenza di esposizione a questi fattori di rischio nella popolazione rende, poi, conto di quale effettivo impatto essi abbiano sulla circolazione del virus (rischio attribuibile).

In Italia è stato stimato che il rischio di non rilevare una sacca infetta tramite lo screening sierologico sui donatori è di 4,35 per milione di donazioni (IC 95%: 0,30-22,39); si calcola che l'utilizzo del test di amplificazione dell'acido nucleico (NAT) possa ridurre tale rischio di oltre l'80% (16).

Tabella 3. Fattori di rischio associati con i casi epatite C. Odds Ratios ottenuti dal confronto con i casi di epatite A (SEIEVA 1997-2002)

Fattore di rischio	OR aggiustato*	IC 95%
Uso di droghe e.v.	60,84	41,91-88,31
Convivente HCV +	10,56	6,52-17,08
Intervento chirurgico	4,92	3,47-6,97
Emotrasfusione	4,32	1,47-12,67
Altre esposizioni parenterali**	1,58	1,20-2,06
Cure odontoiatriche	1,25	0,94-1,66
>1 partner sessuale nell'ultimo anno***	1,26	0,91-1,74

* Aggiustato per età, sesso, livello di istruzione, area geografica e le variabili elencate.

**Tatuaggi, buchi all'orecchio o altro tipo di piercing, manicure, pedicure, rasatura dal barbiere, agopuntura.

*** Solo per soggetti di età >14 anni

Relativamente al rischio di trasmissione di HCV per via sessuale, i dati di una recente revisione della letteratura (17) ribadiscono come l'incidenza di infezione nel partner sieronegativo sia molto bassa in coppie eterosessuali monogame stabili (da 0 a 0,6 per 100 anni-persona a seconda degli studi); la difficoltà di tali studi, comunque, rimane quella di escludere eventuali fonti di contagio comuni ai due partner o la trasmissione attraverso vie diverse da quella sessuale (es. condivisione di strumenti di toilette). Il rischio di infezione è tendenzialmente più alto in soggetti a rischio di malattie sessualmente trasmesse (da 0,4 a 1,8 per 100 anni-persona); si presume che la presenza di infezioni delle vie genitali, l'infezione da HIV, le pratiche sessuali a maggior traumatismo (es. rapporti anali) possano favorire la trasmissione di HCV.

Infine, riguardo all'infezione da HCV nel bambino, visto l'attuale basso rischio degli emoderivati e il generale miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie, è presumibile che la principale fonte di infezione diventi la trasmissione verticale da madre infetta. La probabilità di trasmissione verticale è, comunque, molto bassa in confronto ad altri virus come HIV e HBV (dal 3% al 7% dei casi a seconda degli studi) (18), ma può aumentare di 3-4 volte in caso di co-infezione da HIV. Attualmente non vi è evidenza che il taglio cesareo programmato riduca il rischio di trasmissione perinatale di HCV; al momento non abbiamo ancora validati strumenti di profilassi.

Conclusioni

L'incidenza dell'infezione da HCV appare in riduzione negli ultimi 15-20 anni. Tuttavia attualmente si verificano ancora alcune migliaia di casi ogni anno. I principali fattori di rischio individuati, oltre l'uso di stupefacenti per via endovenosa, sono quelli legati a pratiche mediche invasive, a trattamenti estetici e alla convivenza con un soggetto HCV positivo. È, quindi, in questi ambiti che vanno orientati e rafforzati i programmi di prevenzione. In particolare, misure di profilassi fattibili risultano essere la diffusione più ampia possibile del monouso nell'ambito dei dispositivi a rischio di contaminazione parenterale e l'implementazione e controllo di metodi efficaci di sterilizzazione degli strumenti medico-chirurgici ed estetici.

Bibliografia

1. Hepatitis C – global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec* 1999;74:425-7.
2. 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 Italian town. *J Hepatol* 2000;33:116-20.

3. Guadagnino V, 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;26:1006-11.
4. Di Stefano R, Stroffolini T, Ferraro D, *et al.* Endemic hepatitis C virus infection in a Sicilian town: further evidence for iatrogenic transmission. *J Med Virol* 2002;67:339-44.
5. 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. *Ital J Gastroenterol* 1995;27:235-38.
6. Campello C, Poli A, Dal Molin G, *et al.* Seroprevalence, viremia and genotype distribution of hepatitis C virus: a community-based population study in northern Italy. *Infection* 2002;30:7-12.
7. Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, *et al.* Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: a report from the Dionysos study. *Gut* 1999;44:874-80.
8. 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;7:130-7.
9. Stroffolini T, Fiume A, Fatale G, *et al.* Hepatitis C virus genotypes among intravenous drug users in Italy. *Hepatol Research* 1997;9:20-7.
10. Silini E, Bono F, Cividini A, *et al.* Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995;22:691-5.
11. Osella RA, Misciagna G, Leone A, *et al.* Epidemiology of hepatitis C virus infection in an area of southern Italy. *J Hepatol* 1997;27:30-5.
12. Mazzeo C, Azzaroli F, Giovanelli S, *et al.* Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut* 2003;52:1030-4.
13. Chiamonte 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;24:129-34.
14. 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;4:207-10.
15. Kondili LA, Chionne P, Costantino A, *et al.* Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population. *Gut* 2002;50:693-6.
16. Tosti ME, *et al.* An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy. *Br J Haematol* 2002;117:215-9.
17. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S 99-105.
18. Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:S106-13.

THE NATURAL HISTORY OF CHRONIC HEPATITIS C

Antonio Craxi
Gastroenterologia, Università di Palermo, Palermo

Background

The precise natural history of hepatitis C remains unknown due to the lack of prospective data, the inability to determine initial onset of disease, and the variable influences of multiple cofactors that lead to disease progression. What has been determined, however, is that a subset of hepatitis C patients will progress to cirrhosis and its complications.

Chronicity is the hallmark of hepatitis C infection. Approximately 15% to 30% of patients exposed to HCV recover spontaneously, whereas the remaining 70% to 85% develop chronic infection.(1)Most patients with chronic hepatitis C infection appear to have mild-to-moderate histologic disease.(2-6) Cirrhosis may develop in as many as 15% to 20% of infected patients at 20 years after exposure (Figure 1) (1).

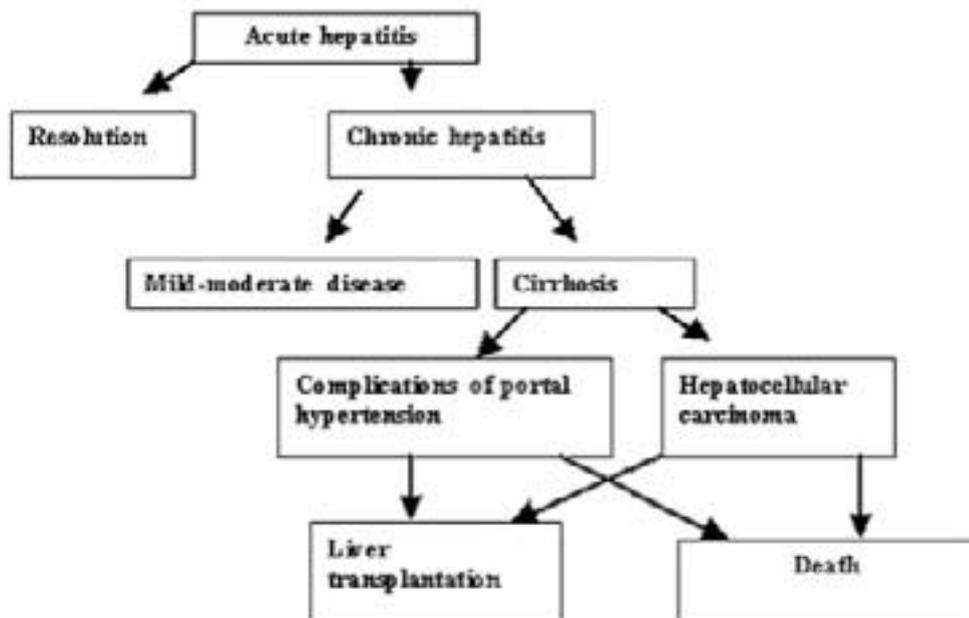


Figure 1. Natural history of hepatitis C

Although fulminant disease is rare in hepatitis C, its occurrence has been reported (7). End-stage liver disease due to chronic hepatitis C infection is the leading indication for liver transplantation in the United States. Data from death certificates in 1999 found that approximately 4000 deaths were attributed to this disease (1). This number most likely grossly

underestimates the deaths that occur each year in the United States secondary to hepatitis C and its complications.

Several studies have attempted to determine the rate of histologic disease progression in transfusion-acquired disease (8-10). Tong and colleagues (8) found a mean interval of 20.6 years from time of infection to development of cirrhosis and a mean interval of 28.3 years from time of diagnosis to development of hepatocellular carcinoma (HCC). Despite the high prevalence of disease, blacks may have a slower progression of fibrosis than nonblacks (11).

The infusion of hepatitis C-contaminated anti-D immunoglobulin in 1977 and 1978 in Ireland has allowed the prospective evaluation of 376 women, 17 years after exposure (12). Most of the hepatitis C-infected women had evidence of moderate hepatic inflammation on liver biopsy, whereas 51% had fibrosis, and only 2% had cirrhosis. The results of a similar German study of 152 women infected with hepatitis C-contaminated Rh₀ immunoglobulin showed no evidence of cirrhosis 15 years after exposure (13).

In a study published in the *Annals of Internal Medicine* in 2000, Seeff and associates (13) evaluated the 45-year follow-up of hepatitis C infection in healthy, young adults. In this study, stored serum samples from 8568 US Air Force recruits in Wyoming dating from 1948-1955 were evaluated for hepatitis C. Ten patients were found to be positive for HCV. This study concluded that hepatitis C results in low liver-related morbidity and mortality, but these conclusions are suspect based on the small sample size.

Factors that affect disease progression

Several factors appear to influence the rate of progression of hepatitis C to cirrhosis (15). These factors include alcohol use, age at time of exposure, sex, and coinfection with either hepatitis B or HIV (Table 1) (16).

Table 1. Factors that affect the rate of progression of hepatitis C

Adverse	No Effect
Alcohol use	Serum alanine aminotransferase level
Disease acquisition at age >40 years	Viral load
Male sex	Genotype
Hepatitis B virus coinfection	Mode of transmission
HIV coinfection	

Alcohol

Alcohol ingestion and chronic hepatitis C infection appear to be synergistic in accelerating the progression of liver disease (17, 18). An increased risk of cirrhosis and decompensated liver disease is associated with sustained alcohol consumption of greater than 60 g/d in men and 40 g/d in women (1, 17). Other effects of concomitant alcohol use in the setting of hepatitis C include increased aminotransferase levels, higher hepatitis C viral loads (17), and increased number of hepatitis C quasispecies (19). These elevations have been shown to be significantly reduced with a decrease in daily alcohol intake.(18) The mechanism by which alcohol leads to more rapid progression of disease is not known. Amplification of cytokine signals is believed to play a role by stimulating stellate cells and increasing fibrosis (20). Alcohol consumption also increases the risk of developing HCC.

Age and sex

Acquisition of hepatitis C after the age of 40 years is associated with a more rapid disease progression. The reasons for this effect are uncertain but may be related to an aging immune system. Male sex is also associated with more rapid disease progression (Table 2) (15).

Coinfection

Hepatitis C and HIV coinfection appears to lead to rapid progression of liver disease (16). Progression to cirrhosis or liver failure may occur within 10-15 years after infection with HCV, and this progression is approximately twice the rate as that that occurs with hepatitis C infection alone (16). Hepatitis C and related liver disease are significant causes of non-AIDS-associated death in patients infected with HIV (21).

Role of other factors

Many factors initially considered to be important predictors of disease progression appear in fact *not* to have such a predictive role. These factors include mode of transmission, serum aminotransferase levels, hepatitis C viral loads, and hepatitis C viral genotype. One report, however, concluded that transfusion-acquired disease was associated with more rapid disease progression than was disease acquisition due to other risk factors (22).

References

1. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(suppl 1):15S-20S.
2. Kage M, Shimamatu K, Nakashima E, Kojiro M, Inoue O, Yano M. Long-term evolution of fibrosis from chronic hepatitis to cirrhosis in patients with hepatitis C: morphometric analysis of repeated biopsies. *Hepatology* 1997;25:1028-31.
3. 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;327:1899-905.
4. Takahashi M, Yamada G, Miyamoto R, *et al.* Natural history of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1993;88:240-3.
5. Seeff LB, Hollinger B, Alter HJ, Wright EC, Cain CM, Buskell ZS, Ishak KG, Iber FL, Toro D, Samanta A, Korezt RL, Perrillo RP, Goodmann ZD, Knodell RG, Gitrick G, Morgan TR, Schiff – ER, Lasky S, Stevens C, Vlancevic RZ, Weinshel E, Tanwandu T, Liu HJ, Barbosa L. Long term mortality and morbidity of transfusion associated non-A, non-B and type C hepatitis: a National Heart, Lung and Blood Institute collaborative study. *Hepatology* 2001;33:455-63.
6. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:1334-40.
7. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpoour JC, Sacher RA, Shih JW, Peneell RH. Hepatitis C virus associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1996;335:631-4.
8. Tong MJ, El-Farra N, Reikes AR, *et al.* Clinical outcomes after transfusion associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995;332:1463-6.
9. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Trumolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A,

- Galassim R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463-72.
10. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tasnaka E, *et al.* Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671-5.
 11. Wiley TE, Brown J, Chan J. Hepatitis C infection in African-Americans: its natural history and histological progression. *Am J Gastroenterol* 2002;97:520-2.
 12. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999;342:1228-34.
 13. Muller R. The natural history of hepatitis C: clinical experiences. *J Hepatol* 1996;24(2 suppl):52S-54S.
 14. Seeff LB, Miller RN, Rabkin CS, Buskell-Bales Z, Straley-Eason KD, Smoak BL, Johnson LD, Lee SR, Kaplan EL. 45-year follow-up of hepatitis C virus infection in healthy young adults. *Ann Intern Med* 2000;132:105-12.
 15. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C: the OBSVIRC, METAVIR, CLINVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825-32.
 16. Eyster ME, Diamondstone LS, Lien JM, Ehmann WC, Quan S, Goedert JJ. Natural history of hepatitis C virus in multitransfused hemophiliacs: effect of co-infection with human immunodeficiency virus. The multicenter hemophilia cohort study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;6:602-10.
 17. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Marhnot-Peignarx M, Degott C, Valla D, Erlinger S, Reuff B. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;27:1717-22.
 18. Cromie SL, Jenkins PJ, Bowden DS, Dudlex FJ. Chronic hepatitis C: effect of alcohol on hepatitis activity and viral titre. *J Hepatol* 1996;25:821-6.
 19. Sherman KE, Rouster SD, Mendenhall C, Thee D. Hepatitis cRNA quasispecies complexity in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1999;30:265-70.
 20. Czaya AJ, Carpenter HA, Santach PJ, Moore SB. Host and disease specific factors affecting steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998;29:198-206.
 21. Bruno R, Sacchi P, Puoti M, Soriano, Filice G. HCV chronic hepatitis in patients with HIV: clinical management issues. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1598-1606.
 22. Gordon S, Bayati, N, Silverman A. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology* 1998;28:562-7.

VARIABILITÀ VIRALE ED INFEZIONE DA HCV

Claudio Argentini, Stefano Dettori, Maria Rapicetta

Reparto delle Infezioni da Virus Epatici, Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*nam quod cumque suis mutatum finibus exit,
continuo hoc mors est illius quod fuit ante.*

Tito Lucrezio Caro, Libro I De Rerum Natura

Introduzione

Nel 1880 il medico cubano Carlos Juan proponeva che un artropode ematofago potesse avere un ruolo nella trasmissione della febbre gialla. Circa venti anni dopo, nel 1901, Walter Reed e James Carroll dimostrarono che un agente filtrabile presente nel siero di pazienti in fase acuta, un virus, era capace di provocare la febbre. Un lungo intervallo era seguito tra la prima ipotesi di chiarimento per quello che sembrava un mistero scientifico e la definitiva dimostrazione che legava l'agente infettante alle modalità di trasmissione e quindi, alla patologia. Circa cento anni dopo, in meno di sei mesi dalla prima identificazione di una nuova forma di polmonite atipica (SARS) veniva identificato il virus responsabile e venivano accertate modalità di trasmissione ed altri aspetti patogenetici. Le conoscenze di virologia molecolare e le conoscenze sulla variabilità (in questo caso sulla conservazione) del genoma virale relative alla famiglia dei Coronavirus sono state alla base della caratterizzazione dell'agente responsabile. D'altra parte, proprio la caratterizzazione del virus dell'Epatite di tipo C (HCV) nel 1990, fu il primo esempio della potenzialità dell'approccio della biologia molecolare per l'identificazione di un agente infettivo. Questo risultato fu raggiunto attraverso l'estrazione ed il clonaggio dell'RNA virale a partire dal siero di uno scimpanzè infettato sperimentalmente con una preparazione di Fattore VIII contaminato. La successiva espressione dei peptidi codificati dai cDNA e la relativa selezione con l'utilizzazione di sieri ottenuti da soggetti con infezione portò all'identificazione di tratti del genoma di HCV ed infine alla caratterizzazione dell'agente responsabile della maggior parte delle epatiti di tipo NANB.

Dagli esempi descritti risulta chiaro come lo studio della genomica e della variabilità virale abbia assunto notevole rilievo, contribuendo inoltre alla delucidazione di vari aspetti del ciclo naturale per ciò che riguarda l'HCV.

La variabilità e l'evoluzione dei virus

I processi che portano alla replicazione degli acidi nucleici genomici, archivi informativi di tutti gli organismi viventi, non sono esenti dall'introduzione di errori. Sistemi di "prova di lettura" consentono correzioni, aumentando notevolmente la fedeltà con cui le polimerasi (in questo caso le replicasi) producono copie del genoma originario. Questi sistemi di correzione non esistono, però, nella maggior parte dei virus. Le replicasi virali (in particolare quelle che riproducono genomi ad RNA) introducono variazioni nucleotidiche al tasso di una mutazione ogni 10^5 nucleotidi polimerizzati (negli organismi superiori, il tasso è di 10000 volte inferiore, ossia una mutazione ogni 10^9 nucleotidi polimerizzati). Queste mutazioni, sempre casuali, sono

alla base dei processi evolutivi. Sono in particolare le pressioni naturali (ad esempio le interazioni con il sistema immunitario dell'ospite con infezione) che, determinando la selezione di parte della progenie, favoriscono i ceppi virali meglio adattati. Le mutazioni vantaggiose (ed alcune delle mutazioni neutrali, in maniera del tutto casuale) sono perciò fissate e si perpetuano nella popolazione virale sopravvissuta.

I virus producono progenie numerose. Nel caso di HIV ed HBV fino a 10^{11} particelle virali per millilitro circolano nel sangue di un singolo individuo. Dall'analisi genetica *ex vivo*, in vari modelli virali, risulta che gran parte dei genomi sono condizionati letalmente e pertanto incapaci di completare la replicazione. Questo, in associazione alle pressioni selettive, determina un rapido *turn-over* giornaliero delle particelle virali circolanti in un singolo individuo. Infatti, se si considera tale tasso di mutazione per un virus come l'HCV, che possiede un genoma di circa 10000 nucleotidi, ogni nuovo genoma prodotto conterrà almeno una mutazione. Per meglio descrivere le complesse popolazioni virali derivate da questi processi, si applica principalmente la teoria della quasispecie complementata con nozioni derivanti dalla genetica di popolazione e da analisi di filogenesi molecolare.

La definizione di quasispecie prevede che non esista un singolo virus che "staticamente" infetta l'ospite, bensì un insieme di virus geneticamente correlati (discendenti da progenitori simili). Ogni sequenza possiede caratteristiche replicative proprie che possono essere riassunte nella *fitness*. La *fitness* misura quanto un organismo sia adatto all'ambiente in cui vive. L'esistenza della quasispecie è basata, come accennato, sull'infedeltà della replicasi, che introducendo mutazioni determina l'esistenza di innumerevoli varianti. Le dinamiche ottenute dai dati finora acquisiti *ex vivo* illustrano come una considerevole proporzione di particelle virali contiene genomi identici costituendo la "predominante". La predominante è il risultato diretto delle pressioni selettive applicate all'innumerevole progenie di genomi mutati. Le particelle che albergano il genoma meglio adattato all'ospite con infezione prenderanno il "predominio" del micro-ecosistema e si replicheranno più efficacemente. Il concetto di predominante sottintende che questa variante virale possiede le migliori caratteristiche per replicarsi in quel dato ospite. In questo caso le predominanti rappresentano le varianti con più alta *fitness* in quel ospite ed in quel dato momento. Il quadro che ne risulta è il seguente: la replicazione anche di un singolo genoma, determina la produzione di un'infinita progenie; un gruppo (od un genoma) risulterà favorito dalla competizione e diverrà predominante. La predominanza non verrà però mantenuta a lungo a causa dell'alta velocità di *turn-over*. Sono i cambiamenti che intervengono nell'ospite (ad esempio: a seguito di terapie, di nuove infezioni o a causa di altri fattori che inducano nuove condizioni patologiche) ad introdurre nuove pressioni ed a selezionare differenti varianti virali. Una delle predizioni basate sulla teoria della quasispecie che più trovano applicazione nello studio dei virus riguarda la valutazione del cosiddetto "error threshold". L'alta mutabilità, infatti, impone un prezzo pesante: in alcuni casi anche l'introduzione di una o poche variazioni può portare alla letalità. Se un elevato tasso di mutazione eccede l'*error threshold*, il genoma virale perde informazioni o strutture importanti per la funzionalità replicativa e trascrittiva del genoma. I virus ad RNA sopravvivono in presenza di elevata possibilità di *error threshold*. Questa caratteristica della replicazione di alcuni virus, ivi incluso l'HCV, ha rilevanza per lo sviluppo di strategie terapeutiche.

La teoria della quasispecie presenta, però alcune lacune non facilmente risolvibili. Per questo, recentemente, si tende ad analizzare i dati di variabilità virale alla luce di due fattori principali: le pressioni adattative e l'effettiva popolazione virale. Ad esempio, se la trasmissione del virus avviene attraverso un *bottle-neck* genomico (ossia un "collo di bottiglia" che permette l'entrata di poche particelle virali nel nuovo ospite) viene diminuita la possibilità che la popolazione virale si adatti velocemente alle pressioni selettive dell'ospite evitando l'*error threshold*.

L'analisi della filogenesi molecolare viene utilizzata per ricostruire la storia e le relazioni genetiche degli isolati virali. È costituita da due componenti principali: la topologia dell'albero filogenetico ed il modello di sostituzione nucleotidica applicato. La topologia dell'albero genealogico fornisce, con le lunghezze di braccio, una rappresentazione grafica intuitiva e facilmente comprensibile delle relazioni genetiche tra isolati.

In numerosi modelli virali è stato dimostrato che lo studio della variabilità virale può avere un impatto diretto nella diagnostica, prevenzione, profilassi e terapia delle malattie associate. A tal proposito numerosi dati sono stati ottenuti anche per quanto riguarda l'infezione da HCV. L'analisi dell'estrema variabilità che caratterizza questo agente virale può aiutare nella comprensione del complesso e ancora misterioso ciclo naturale.

La variabilità del virus dell'epatite C

Organizzazione genomica e classificazione degli isolati virali

L'HCV possiede un genoma costituito da una unica molecola di RNA di polarità positiva. Il virus è stato classificato tassonomicamente nell'ambito della famiglia dei Flaviviridae. Il genoma di 10 KB è suddiviso in una breve sequenza non tradotta ed in un lungo schema di lettura, tradotto in un polipeptide che ha all'amino-terminale le proteine strutturali Core, E1 ed E2, a cui fanno seguito le proteine non-strutturali NS2, NS3, NS4 ed NS5a ed NS5b.

La variabilità del genoma di HCV presenta differenti tassi per le varie regioni considerate. La regione 5' non codificante (5'NCR) e la regione Core sono le più conservate. Le regioni genomiche che codificano per le proteine E1 ed E2 presentano i gradi di variabilità più elevati. In particolare sono presenti due domini ipervariabili in E2. L'eterogeneità genetica tra vari isolati di HCV è stata classificata come variabilità inter-genotipica con valori di omologia, relativamente all'intero genoma, del 65,7% 68,9%; intra-genotipica del 79% 80% (caratterizzazione di sottotipi) e della popolazione virale del 91% e 99% (caratterizzazione di isolati). La classificazione degli isolati di HCV è possibile mediante la definizione della soluzione di continuità osservata nell'ambito dell'eterogeneità genetica inter-gruppo. L'applicazione dei metodi di analisi della filogenesi molecolare e delle caratteristiche di eterogeneità virale, ha permesso la classificazione in 6 genotipi principali. Ogni genotipo risulta suddiviso ulteriormente in numerosi sottotipi e nuovi sottotipi vengono continuamente identificati nei vari studi epidemiologici. A livello dei singoli individui le modificazioni tra isolati virali vengono caratterizzate in termini di quasispecie virale.

Distribuzione geografica di genotipi e sottotipi

I 6 genotipi sinora caratterizzati sono diversamente distribuiti a livello mondiale. I genotipi 1, 2 e 3 sono diffusi in maniera ubiquitaria, sebbene con prevalenze relative differenti. In Europa, come pure negli Stati Uniti, sono il sottotipo 1a ed 1b ad essere maggiormente presenti. In Giappone il sottotipo 1b è responsabile del 73% delle infezioni. Diversamente dagli altri paesi industrializzati, dove circolano prevalentemente accanto al sottotipo 1b i sottotipi 2a e 2b, in Italia è presente oltre al sottotipo 1b il sottotipo 2c. Il genotipo 3a è diffuso tra gli individui che fanno uso di droghe parenterali. Caratteristica è la distribuzione del genotipo 4, che è il genoma prevalente in Nord Africa e Medio Oriente (sottotipo 4a), ma presente anche in Italia, nella Francia meridionale ed in Spagna (sottotipo 4d). Infine, la diffusione del genotipo 5 è limitata al Sud Africa e quella del genotipo 6 al Sud Est Asiatico. Lo studio della peculiare

distribuzione degli isolati di HCV può contribuire alla ricostruzione dell'origine e della storia di diffusione e dell'infezione.

Metodi e regioni genomiche utilizzate come marcatori per gli studi di variabilità

Il metodo di elezione per la caratterizzazione di diversi genotipi e sottotipi è il sequenziamento molecolare di porzioni specifiche di genoma. Il sequenziamento della regione E1 e della porzione NS5a vengono ritenuti necessari per l'attribuzione definitiva di un dato isolato al sottotipo/genotipo di appartenenza. Accanto a queste regioni anche le regioni 5'NC e Core possono consentire la corretta classificazione dell'isolato relativamente al genotipo. La regione 5'NC viene utilizzata in alcuni metodi commerciali, quale l'InnoLipa, per la rapida classificazione di genotipi e sottotipi negli studi epidemiologici effettuati in Paesi Occidentali. Per tali tipi di studi sono inoltre disponibili metodi commerciali basati sul rilevamento con anticorpi specifici relativi alla regione genomica NS4.

Gli studi di cinetica di popolazione virale vengono essenzialmente effettuati analizzando la regione HVR1 di E2. Dai dati sperimentali questa regione risulta essere fortemente implicata nell'attività del sistema immunitario. Tale regione può essere amplificata e sequenziata direttamente o dopo clonaggio. Un metodo di analisi alternativo al sequenziamento consiste nella determinazione del *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), effettuata sul prodotto amplificato. Tale metodo è basato sul diverso comportamento, durante l'elettroforesi, delle molecole di cDNA amplificato in relazione alla diversa composizione nucleotidica.

Implicazioni nella diagnosi e nella storia naturale dell'infezione

La mancata differenziazione a livello geografico dei vari genotipi e sottotipi di HCV ed inoltre la considerevole variabilità a livello individuale hanno consentito l'identificazione e l'utilizzazione di marcatori molecolari genetici per studi epidemiologici e per la caratterizzazione di episodi epidemici e di trasmissione tra individui. La caratterizzazione molecolare degli isolati virali è stata risolutiva per la definizione delle epidemie associate all'introduzione di prodotti emoderivati (in Irlanda ed in Germania). In questi casi l'alta omogeneità degli isolati ha permesso di chiarire la modalità di infezione. Anche il sospetto di trasmissioni per via sessuale o neonatale è stato confermato tramite l'utilizzo di tecniche di epidemiologia molecolare. Dati recenti di caratterizzazione molecolare indicano che, in alcuni paesi industrializzati, l'infezione da genotipo 3a è associata al consumo di droghe parenterali.

Il ruolo del genotipo virale nella progressione dell'infezione acuta e nell'istaurarsi della cronicità è controverso. Le indicazioni generali conducono all'ipotesi che vari fattori virali, tra cui il genotipo infettante e la carica virale, contribuiscono all'andamento patologico dell'infezione in associazione a fattori derivati dall'ospite. Alcuni dati indicano che il genotipo 1b potrebbe essere associato ad un decorso della malattia più grave. Ad esempio, il genotipo 1b risulta maggiormente presente nei pazienti HCV positivi con cirrosi e/o epatocarcinoma. Nei pazienti sottoposti a trapianto di organi la presenza d'infezione da genotipo 1b risulta associata ad una maggiore evenienza di episodi di ricorrenza dell'infezione e di complicazioni post-trapianto.

La presenza di elevata eterogeneità della popolazione virale nel singolo paziente è associata ad un più elevato grado di severità della malattia. In generale la variabilità virale, particolarmente nella regione HVR1, che è maggiormente coinvolta dalla risposta immunitaria

e, comunque, l'evoluzione della specie virale nel singolo individuo, risultano associate alle modificazioni a livello immunitario.

Per quanto riguarda la risposta a terapie ed in particolare a trattamenti con interferon, esistono dati concreti sull'associazione tra infezione da particolari genotipi e probabilità di successo della terapia. Le osservazioni dimostrano che i genotipi 1b e 4 resistono con maggiore frequenza al trattamento con interferon e, secondo alcuni studi un'importante ruolo è derivato dalle caratteristiche delle sequenze nucleotidiche nella regione non strutturale NS5b, secondo altri nell'HRV1.

Al di là della discussione su tale aspetto, c'è da rilevare che ogni fenomeno di resistenza antivirale è stato finora sempre correlato con l'insorgenza di mutazioni genomiche in tutti i modelli virali studiati, ivi incluso l'HIV. Nel caso specifico, la variabilità della regione NS5a potrebbe essere legata all'azione della protein-chinasi e quindi al tipo di risposta cellulare mediata dall'interferon. Di più difficile analisi risulta, invece, il possibile ruolo legato alla variabilità nella regione HVR1. Esiste, comunque, la possibilità che l'eterogenità osservata nella regione sia semplicemente l'effetto indiretto sul genoma di HCV dell'aumentata pressione immunitaria.

Nell'utilizzazione dei prodotti antivirali, come la ribavirina, assume notevole rilievo l'analisi del fenomeno dell'*error threshold* (o *error catastrophe*). L'incorporazione della ribavirina nel genoma virale può indurre l'aumento del tasso di mutazione. È stato osservato, nel caso del poliovirus, che il tasso di mutazione passa da 1,5 mutazioni/genoma normalmente presente, a 6,9 nell'infezione da mutanti. L'aumento di variabilità è coincidente con l'abbassamento rilevante della *fitness* e della possibilità di sopravvivenza virale. Ciò può in parte spiegare il maggior successo che l'applicazione di terapie combinate ha nella cura delle infezioni croniche da HCV.

La variabilità virale ha inoltre importanti implicazioni per quel che riguarda l'efficienza dei saggi diagnostici. Progressivi aggiornamenti sono stati effettuati sulla base delle conoscenze a livello molecolare. Il rilevamento delle infezioni da particolari genotipi quali i genotipi 4 e 5 può comunque essere meno efficiente con l'utilizzazione di reagenti calibrati per i genotipi 1,2,3 che presentano una più ampia diffusione.

In conclusione la presenza di una molteplicità di subtipi e genotipi virali nell'infezione di HCV pone notevoli interrogativi sul possibile sviluppo di terapie specifiche e di vaccini profilattici e terapeutici. Gli studi di genomica molecolare sono risultati cruciali per la definizione di marcatori epidemiologici e devono essere tenuti in considerazione nell'utilizzo di saggi diagnostici. Le conoscenze derivate da modelli virali più studiati indicano l'importanza della valutazione dei fenomeni di variabilità virale nella comprensione delle interazioni virus-ospite e della patogenesi virale.

Tavola rotonda
Il trapianto di fegato

Moderatori: *G.B. Pinzello, M. Tisone*

IL TRAPIANTO DI FEGATO IN ITALIA

Sante Venettoni (a), Massimo Rossi (b), Lucia Rizzato (a), Francesco Gabbrielli (a),
Alessandro Nanni Costa (a)

(a) *Centro Nazionale Trapianti, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Divisione di Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo Dipartimento "Paride Stefanini", Università di Roma "La Sapienza", Roma*

Cenni storici

Il trapianto d'organi rappresenta una delle più importanti conquiste cliniche del secondo millennio sia per i positivi risvolti clinici nella cura di numerose malattie ad evoluzione sfavorevole e non altrettanto efficacemente trattabili, sia per le implicazioni organizzative che tutt'oggi presenta. La storia scientifica dei trapianti inizia nel 1902, quando Alexis Carrel, chirurgo francese trasferitosi a Chicago, riuscì per primo a trovare una tecnica capace di suturare tra loro i vasi sanguigni, passo fondamentale per poter pensare di trasferire un organo da un corpo all'altro: senza soluzioni di continuità tra segmenti vascolari è impensabile l'impianto di un organo.

Il primo trapianto vero e proprio venne effettuato a Boston, Stati Uniti, nel 1954 dal chirurgo Murray che eseguì un trapianto di rene da donatore vivente consanguineo e geneticamente identico al ricevente. Il primo trapianto di fegato coronato da successo venne invece effettuato da T.E. Starzl, il 23 luglio 1967 su un piccolo paziente di 1 anno e mezzo affetto da una neoplasia epatica (1). Da tale anno anche in Inghilterra, a Cambridge, Sir Roy Calne, cominciò ad eseguire trapianti di fegato (2), e così Pichlmayr dal 1972 ad Hannover e Bismuth a Parigi dal 1974. In Italia il primo trapianto di fegato venne eseguito qualche anno più tardi e precisamente nel 1982 a Roma da Cortesini.

Da allora fu avviata l'attività in molte altre città italiane, che contano oggi 19 centri autorizzati per una attività complessiva di oltre 800 trapianti all'anno. Mentre, nel mondo, risultano operativi circa 250 centri presso i quali sono stati eseguiti circa 120.000 trapianti.

L'affermazione definitiva del trapianto di fegato si è avuta, comunque, solo negli anni '80 con l'introduzione della ciclosporina nella pratica clinica; un fungo (*Tolypocladium inflatum*), scoperto casualmente nel 1969 da alcuni ricercatori della Sandoz, che si rileverà determinate nei trapianti d'organo per la sua capacità di inibire la reazione immunitaria. L'altro passaggio fondamentale è rappresentato dalla *Consensus Conference* di Washington nel 1983 dove viene riconosciuta definitivamente la validità clinica del trapianto di fegato come terapia.

Stato dell'arte

Il trapianto di fegato è una procedura chirurgica particolarmente impegnativa e complessa che consiste nella rimozione di un fegato irreversibilmente ammalato e la sua sostituzione con un organo sano. L'abbreviazione più comune è OLT (*Orthotopic Liver Transplantation*) e, ancora oggi, viene considerato l'atto estremo della chirurgia trapiantologica sia da un punto di vista tecnico, per l'elevata complessità della prestazione, sia da un punto di vista organizzativo, per la necessità di disporre di numerose competenze specialistiche data la natura multifattoriale delle patologie che con esso vengono trattate (3).

Oggi l'indicazione al trapianto di fegato è posta praticamente per tutte le forme di insufficienza epatica acuta o cronica a prescindere dalla causa etiopatogenetica. Le indicazioni più frequenti, in molti centri, sono le malattie colestatiche croniche (cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante, atresia delle vie biliari nei bambini), le cirrosi post-epatitiche (B, C, epatiti autoimmuni), la cirrosi alcolica, le malattie metaboliche, le cirrosi criptogenetiche, l'insufficienza epatica fulminante, il carcinoma epatocellulare. Gli errori congeniti del metabolismo e le cirrosi colestatiche rappresentano la categoria ideale dei pazienti nei quali si raggiungono i migliori risultati. L'introduzione delle differenti strategie di immunoprofilassi nelle cirrosi HBV positive ha sensibilmente modificato in positivo il trend dei risultati in questa categoria di pazienti, con sopravvivenze comparabili a quelle dei pazienti trapiantati per patologie non virali. L'indicazione più frequente al trapianto di fegato nell'adulto è attualmente rappresentata dalla cirrosi HCV positiva (4, 5).

Nonostante la reinfezione dopo trapianto sia praticamente universale la sopravvivenza almeno a breve e medio termine è sovrapponibile a quella del trapianto effettuato per altre indicazioni (60% a 7 anni). Sono tuttavia necessari studi con follow-up più lunghi (10-15 anni) per poter dimostrare in maniera più completa la storia naturale della reinfezione nel paziente trapiantato e come le terapie antivirali possono modificarla. Anche riguardo alle patologie neoplastiche del fegato il trapianto trova una precisa indicazione. I risultati delle esperienze più recenti hanno chiaramente dimostrato che in particolari categorie di pazienti affetti da neoplasia epatica si possono ottenere con il trapianto sopravvivenze paragonabili alla popolazione non neoplastica. In particolare; l'indicazione di elezione al trapianto di fegato per tumore è oggi rappresentata dall'epatocarcinoma che si manifesta come lesione singola inferiore ai 5 cm o in presenza di non più di 3 noduli nessuno superiore a 3 cm. Risultati ancora non completamente accettabili ed esperienze limitate, rendono il colangiocarcinoma e i tumori metastatici non endocrini, indicazioni da riservare a studi clinici controllati. Sono quindi estremamente esigue attualmente le controindicazioni al trapianto di fegato. In particolare non esiste un limite assoluto nell'età del ricevente anche se molti centri tendono a non superare orientativamente i 65 anni. Una controindicazione assoluta può essere rappresentata da gravi ipossie o da grave ipertensione polmonare del ricevente. Mentre significativi disturbi psichiatrici o neurologici devono essere oggetto di attenta valutazione polispecialistica pretrapianto. Da un punto di vista strettamente tecnico la trombosi portale anche completa non rappresenta più una controindicazione assoluta al trapianto mentre molto più limitante è la trombosi completa dell'intero distretto splenico.

La situazione in Italia

È ormai assodato che il trapianto di fegato è una metodica terapeutica efficace i cui vantaggi (ripristino funzionale e qualità di vita) prevalgono indubbiamente sulle complicanze (rigetto, infezioni e sulle loro conseguenze).

In Italia la qualità dei risultati è eccellente tanto che da una recente pubblicazione del Centro Nazionale Trapianti (anno 2003), sugli esiti degli interventi in Italia e pubblicata sul sito del Ministero della Salute, emerge con molta chiarezza l'ottima performance dei centri di trapianto italiani che riportano una sopravvivenza dell'organo e del paziente ad un anno dall'intervento rispettivamente del 72% e dell'82%; a fronte di una media europea del 72% per l'organo e del 79% per il paziente (Tabella 1).

Tabella 1. Qualità dei risultati in Italia in raffronto al registro europeo (sopravvivenza ad 1 anno)

Paese	Paziente	Organo
Italia (2000-2001)	82%	76%
ELTR* (1968-2000)	79%	72%
UNOS**(1998-1999)	87%	80%
CTS***(1994-2000)	83%	76%

*ELTR (European Liver Transplant Registry). Periodo di riferimento 1968-2000

** UNOS (United Network for Organ Sharing). Periodo di riferimento 1998-1999

***CTS (Collaborative Transplant Study). Periodo di riferimento 1994-2000

Nel nostro Paese tuttavia, i livelli di attività, tra le diverse regioni, sono fortemente disomogenei, sia in termini di donazioni, sia in termini di trapianti. Ci sono alcune aree geografiche che da diversi anni hanno raggiunto e superato in termini di attività la media europea (Nord 23,8 donatori Per Milione di Popolazione – PMP) e altre che sono oggettivamente in difficoltà (Sud 9,1 donatori PMP) (Tabella 2). Ciò non contribuisce certamente a garantire quella parità di accesso alle cure di cui i pazienti hanno bisogno e che dovrebbe invece essere assicurato in ugual misura, su tutto il territorio nazionale, a tutti i cittadini che ne fanno domanda. Questo è il vero punto critico di questa disciplina.

Tabella 2. Livelli di donazione in Italia per aree geografiche

Area	Donatori effettivi PMP*		Donatori utilizzati PMP*	
	Anno 2002	Proiezione Anno 2003**	Anno 2002	Proiezione Anno 2003**
Nord	24,9%	23,8%	23,0%	21,3%
Centro	18,0%	18,8%	16,4%	16,2%
Sud	9,6%	9,1%	9,2%	8,8%
Italia	18,1%	17,5%	16,8%	15,8%

*Per Milione di Popolazione

**dati al 30.06.2003

Nonostante ciò, nel corso dell'ultimo decennio l'incremento complessivo del numero di donazioni e della qualità dei trapianti in Italia, pone il nostro Paese sugli standard delle principali nazioni europee. Dal 1992 ad oggi il numero dei donatori è aumentato del 270,9%, determinando un incremento complessivo del numero dei trapianti pari al 247,6% (Tabella 3).

Tabella 3. Incremento donatori e trapianti in Italia

Area	Donatori effettivi PMP*		Donatori utilizzati PMP*	
	Anno 2002	Proiezione Anno 2003**	Anno 2002	Proiezione Anno 2003**
Nord	631	603	583	540
Centro	193	202	176	173
Sud	195	184	186	177
Italia	1019	988	945	891
Incremento donatori dal 1992			287,2%	270,9%
Incremento trapianti dal 1992			247,6%	

*Per Milione di Popolazione **dati al 30.06.2003

Tuttavia, a fronte di questo grande impegno clinico-organizzativo, il numero di donatori disponibili non è ancora sufficiente a coprire il numero di nuovi pazienti che ogni anno viene inserito nelle liste di attesa (Figura 1).

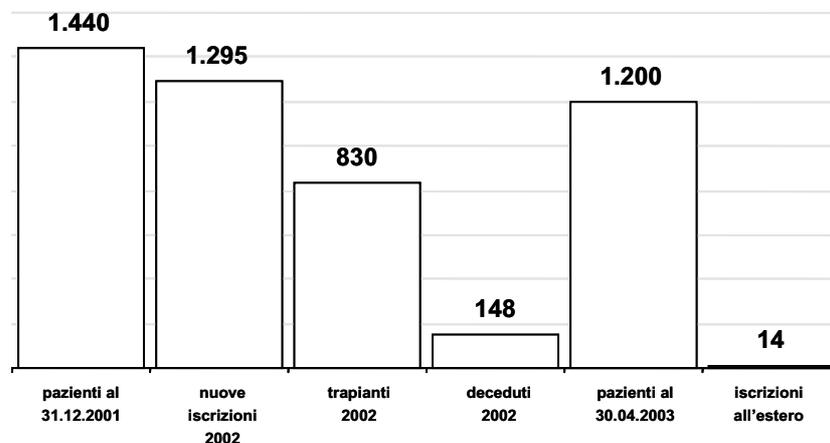


Figura 1. Soddisfacimento della domanda di trapianto

Questo significa che una certa quota di pazienti non riuscirà ad accedere al trapianto di fegato con un organo prelevato da un donatore cadavere. Negli ultimi anni molti gruppi chirurgici hanno cercato di arginare il problema ricorrendo a tecniche chirurgiche innovative quali la divisione di un organo in due unità funzionalmente autonome (*split liver*) da trapiantare in due riceventi diversi; in altri casi sono ricorsi al trapianto da donatore vivente, anche “geneticamente non correlato” al ricevente, con risultati sovrapponibili a quelli che si hanno con il trapianto da donatore cadavere.

Split liver

La possibilità di dividere il fegato nasce dal concetto che quest’organo, è stato considerato, come i reni e i polmoni, un organo pari e quindi da utilizzare per due riceventi ogni volta che sia possibile⁶. La procedura di divisione può essere effettuata in sede di prelievo sul donatore a cuore battente (*in situ*) o a prelievo ultimato durante la chirurgia di banco in condizioni di ipotermia (*ex situ*) (7, 8). Nella maggior parte dei casi il II e III segmento sono usati per un ricevente pediatrico mentre il resto dell’organo è assegnato ad un ricevente adulto (9). Questa tecnica ha permesso un significativo beneficio per i bambini in lista con una netta riduzione dei tempi di attesa, mantenendo al tempo stesso dei risultati ottimali comparabili con quelli del trapianto effettuato con fegato intero. Tuttavia la maggior parte dei pazienti in lista di attesa sono adulti ed è tra gli adulti che si riscontra la maggiore incidenza di mortalità in lista di attesa. È questo il motivo dell’estensione del principio dello *split liver* al fine di ottenere due emifegati trapiantabili in due riceventi adulti, ma la quota di parenchima da resecare per essere sufficiente a mantenere in vita un soggetto adulto deve essere maggiore di quella utilizzabile per un bambino. L’intervento di resezione nel donatore deve quindi essere ampliato. Emond (*Trasplantation* 1993) aveva individuato nel 50% della massa epatica ideale, la quota minima di

parenchima da trapiantare. A tale scopo sono stati messi a punto dei metodi matematici per stabilire, sulla base delle indagini radiologiche mirate (TAC, RMN), il rapporto tra quota di fegato prelevabile in un particolare donatore, e quota di fegato necessaria per quel particolare tipo di ricevente (*Graft Recipient Weight Ratio, GRWR*). È evidente che l'utilizzo di un donatore ottimale diventa un punto imprescindibile per la prognosi dei riceventi. Ma anche gli stessi riceventi dovrebbero essere in una fase intermedia di gravità della loro malattia. Appare quindi chiaro che oltre alle difficoltà tecniche insite di questo approccio chirurgico, gioca un ruolo determinante il rispetto di tutti i parametri per arrivare ad un buon match donatore-ricevente.

Trapianto di fegato da donatore vivente

Il primo trapianto di fegato da donatore vivente al mondo è stato eseguito da Raia nel 1988. Da allora sono stati eseguiti circa 1200 trapianti da donatore vivente adulto a ricevente pediatrico (10). I risultati di questa esperienza in termini di sopravvivenza dell'organo trapiantato e del paziente sono sovrapponibili e in alcune casistiche migliori di quelli raggiunti con il trapianto di fegato da donatore cadavere (sopravvivenza ad un anno del paziente trapiantato dall'82% all'88%). Fondamentale è stato il contributo dei chirurghi nipponici e in particolare di Tanaka, che a Kioto, ha perfezionato le tecniche di microchirurgia necessarie per ridurre l'incidenza di trombosi arteriose, maturando una notevole esperienza soprattutto nei pazienti pediatrici (11-14).

In Italia tale programma è stato avviato per la prima volta a Padova nel 1997 e, al mese di luglio 2003, risultano effettuati 80 trapianti presso 9 diversi centri. Di questi: 60 sono funzionanti (75%); 13 sono deceduti (16,2%); 8 sono stati ritrapiantati da donatore cadavere (10%) e in 2 casi (2,5%) si è verificato il decesso dopo il ritrapianto da donatore cadavere. Complessivamente la sopravvivenza dell'organo ad 1 anno dal trapianto è del 69% mentre quella del paziente è del 79%. Tuttavia, valutando gli esiti dei trapianti per singolo anno (2001 vs 2002) si nota un netto miglioramento dei risultati. Si passa da una sopravvivenza dell'organo del 58% ad un anno dal trapianto nel 2001, ad una sopravvivenza del 74% nel 2002. Ancora più alto è il livello delle performance relative alla sopravvivenza del paziente (71% nel 2001, 84% nel 2002) (Figura 2-3).

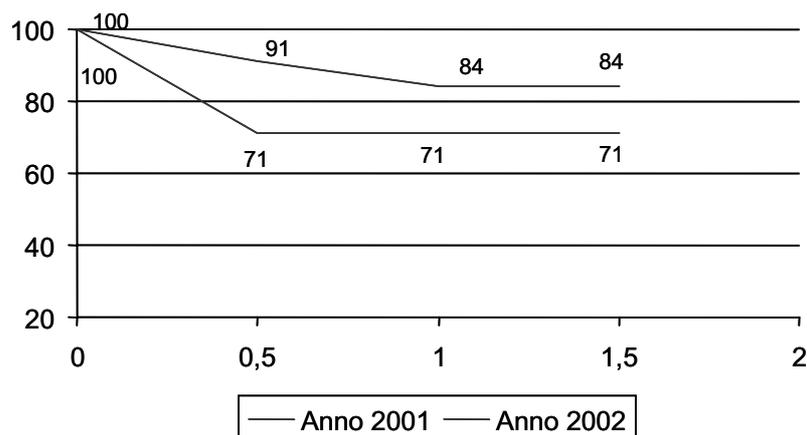


Figura 2. Trapianto fegato da donatore vivente: sopravvivenza del paziente 2001 vs 2002

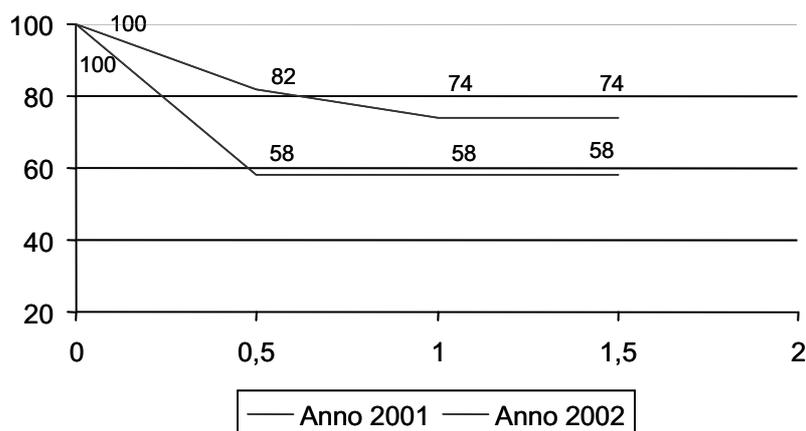


Figura 3. Trapianto fegato da donatore vivente: sopravvivenza del graft 2001 vs 2002

Ad oggi non si sono verificati decessi sui donatori né complicanze maggiori per le quali sia stato necessario un reintervento a cielo aperto. Tutti i centri che hanno iniziato l'attività di trapianto da donatore vivente hanno confermato nel breve e lungo termine una completa riabilitazione del donatore con dimissione dello stesso entro la quindicesima giornata post-operatoria.

È evidente che il trapianto di fegato da donatore vivente, anche geneticamente non correlato, offre diversi vantaggi di cui si giovano sia il singolo paziente che riceve l'emifegato, sia la comunità dei malati in attesa di trapianto (15). Tra essi vanno sicuramente evidenziati i seguenti:

- la realizzazione dell'intervento con caratteristiche di elezione permette flessibilità nella programmazione dell'intervento stesso;
- il graft proviene sempre da un donatore ottimale;
- la possibilità di studiare bene sia il donatore che il ricevente permette di scegliere il *timing* migliore per il buon esito del trapianto;
- i donatori viventi aumentano potenzialmente la disponibilità globale dei fegati da donatore cadavere.

Indubbiamente, sia lo *split liver* che il trapianto di fegato da vivente, rappresentano soluzioni tecniche d'avanguardia che hanno aumentato le possibilità di cura per i pazienti e che potranno ulteriormente contribuire ad un maggiore soddisfacimento della domanda, ma non hanno modificato né potranno mai farlo la problematica dell'insufficiente numero di organi trapiantabili. Infatti, il continuo ampliamento dell'indicazione al trapianto di fegato per un numero crescente di condizioni patologiche è tale che, nonostante un'auspicabile piena utilizzazione di tutti i donatori cadaveri, non permette di assicurare tale terapia a tutti i pazienti che ne hanno bisogno.

Quindi, l'obiettivo da raggiungere non riguarda più il confronto con il numero di donatori a livello europeo (raggiunto nel 1999), ma il massimo soddisfacimento del bisogno dei pazienti, sia in termini di numero di trapianti che di qualità delle prestazioni e, pur considerando che i livelli attuali di donazioni, hanno consentito di stabilizzare la numerosità delle liste di attesa, appare necessario un ulteriore incremento dei donatori almeno del 30-40% per poter rispondere efficacemente al bisogno.

Conclusioni

Il quadro appena delineato permette di individuare alcuni obiettivi a breve e medio termine.

Primo fra tutti, la necessità di monitorare l'attività dei centri di prelievo, attraverso la visione dei progetti presentati ai rispettivi coordinatori regionali e la verifica annuale dei risultati raggiunti.

In secondo luogo introdurre strumenti adeguati e permanenti per la valutazione di efficienza e di efficacia del sistema trapianti italiano. Questi strumenti devono prevedere, accanto ad una valutazione dei costi, un'attenzione particolare per la qualità dei risultati. Anche se occorre sottolineare che la valutazione di qualità dei centri, in questa disciplina, è articolata e non di facile interpretazione in quanto la complessità di fattori che la influenzano e la molteplicità delle variabili, pongono qualche problema di ordine metodologico.

In terzo luogo ridurre il divario fra le varie Regioni in termini di attività di *procurement*. Alcune realtà regionali del nostro Paese indicano che il numero delle 30 donazioni per milione di abitanti è raggiungibile ma dobbiamo portarvi tutto il Paese e consolidare il dato. Ciò è possibile attraverso l'attuazione di strategie organizzative mirate ad accrescere l'efficienza regionale e locale del sistema sanitario. Da questo punto di vista occorre:

- utilizzare il *know-how* delle regioni con maggior reperimento di organi in quelle con minore disponibilità, evitando, salvo casi di urgenza o di particolari condizioni precedentemente concordate, il trasferimento "obbligatorio" di organi da una regione all'altra;
- ottimizzare l'utilizzazione di tutti gli organi potenzialmente disponibili in modo omogeneo in tutto il territorio nazionale;
- mantenere l'elevata qualità dei trapianti effettuati;
- favorire l'applicazione di tecniche trapiantologiche avanzate in centri che abbiano una preparazione adeguata e incentivare la preparazione di operatori italiani all'utilizzo di tali metodiche;
- misurare l'efficienza, in termini di produttività, di ogni singola Azienda non solo in base al numero di trapianti effettuati, ma anche all'entità dei donatori individuati e utilizzati;
- individuare la donazione di organi e tessuti come obiettivo prioritario per ogni Azienda Sanitaria Locale;
- introdurre strumenti permanenti per valutare i livelli di qualità dei centri di trapianto e dei centri di coordinamento;
- attuare la Carta dei Servizi per i pazienti contenente tutte le informazioni riguardo i centri di trapianto nei quali potersi iscrivere, le attività di prelievo in regione e fuori, i risultati e i rischi connessi all'intervento.

Gli interventi sopra individuati, se applicati con rigore, garantiscono un buon livello di efficienza non solo nello svolgimento di tutto il processo che conduce al trapianto, ma anche sugli esiti degli interventi che rappresentano un punto imprescindibile per una scelta consapevole del paziente e per una completa comprensione del sistema trapianti in Italia. L'obiettivo finale è molto chiaro ed è rappresentato dal miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia globale di tutte le strutture sanitarie che partecipano all'erogazione di prestazioni assistenziali di grande rilevanza sociale quali quelle dei trapianti d'organo e tessuti, dove la domanda di salute continua a crescere in maniera costante e per la quale è indispensabile adeguare la quantità delle prestazioni.

Bibliografia

1. Starzl TE (with the assistance of C.W. Putnam). Experience in hepatic transplantation. Philadelphia: *WB Saunders Company* 1969;131-5.
2. Calne RY, Williams R. Liver Transplantation in man. I. Observations on technique and organizations in five cases. *Br Med J* 1968;4:535-40.
3. Starzl TE. History of clinical transplantation. *World J Surgery* 2000;24:759-82.
4. Steinmuller T, Neuhaus P, *et al.* Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2003;35(6):1529-35.
5. Ghobrial RM, Busuttil RW, *et al.* A 10-year experience of liver transplantation for hepatitis C: analysis of factors determining outcome in over 500 patients. *Ann Surg* 2001;234:384-93.
6. Humar A, Khwaja K, Sielaff TD, Lake J, Payne W. Technique of split-liver transplantation for two adult recipients. *Liver transplantation* 2002;8(8):725-9.
7. Busuttil RW, Goss JA. Split Liver transplantation. *Ann Surg* 1996;229:313-21.
8. Reyes J, Gerber D, Mazariegos GV, Casavilla A., Sindhi R, Bueno J, *et al.* Split liver transplantation: a comparison of ex-vivo and in situ techniques. *J Pediatr Surg* 2000;35:283-9.
9. Renz JF, Busuttil RW, *et al.* Changing faces of liver transplantation: partial-liver grafts for adults. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:31-44.
10. Marcos A. Right lobe living donor liver transplantation: a review. *Liver transpl* 2000;6:3-20.
11. Goldstein MJ, *et al.* Analysis of failure in living donor liver transplantation: differential outcomes in children and adults. *World J Surg* 2003;27:356-34.
12. Broelsch CE, *et al.* Liver transplantation in children from living related donors. *Ann Surg* 1991;214:428-39.
13. Kawasaki S, Makuuchi M, *et al.* Living related liver transplantation in adults. *Ann Surg* 1998;227:269-74.
14. Tanaka K, *et al.* Surgical techniques and innovations in living related liver transplantation. *Ann Surg* 1993;217:82-91.
15. Shiffman MI, *et al.* Living donor liver transplantation: summary of a conference at the National Institutes of health. *Liver Transplant* 2002;8(2):174-88.

STORIA NATURALE DELL'EPATITE C POST-TRAPIANTO DI FEGATO

Mario Angelico (a), Paola Piccolo (a), Daniele Di Paolo (a), Giuseppe Tisone (b)

(a) *Cattedra di Gastroenterologia, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Tor Vergata, Roma*

(b) *Clinica Chirurgica, Dipartimento di Chirurgia Generale, Università di Tor Vergata, Roma*

La cirrosi correlata all'infezione da virus dell'epatite C rappresenta la causa più frequente di trapianto di fegato. Tuttavia, l'epatite C ricorre quasi sempre dopo il trapianto. Le evidenze acquisite negli ultimi anni indicano che rispetto all'infezione pre-trapianto, l'epatite C post-trapianto è più rapidamente progressiva e meno responsiva alla terapia antivirale. In questa sede riassumeremo la storia naturale della ricorrenza da HCV post-trapianto, i fattori implicati nella sua progressione, e le prospettive attuali di prevenzione e terapia.

I pazienti infetti dal virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) al momento del trapianto vanno incontro a ricorrenza post-trapianto di tale infezione. L'infezione pre-trapianto ne rappresenta la fonte più comune, ma esistono rari casi (<5%) di infezioni post-trapianto *de novo* (1).

Nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato (OLT) per cirrosi HCV- relata, i valori sierici di HCV RNA si riducono rapidamente, sia durante l'intervento che nelle prime 24 ore del post-operatorio. Tuttavia, nei giorni successivi l'HCV RNA subisce un incremento nel 50% dei pazienti, con un tempo di raddoppio pari a 13 ore, mentre nel rimanente 50% tale velocità è minore (2).

Nel follow-up a breve termine, la ricorrenza da HCV è generalmente benigna. Un episodio di epatite acuta (ALT *flare*) si presenta di solito tra il 2° e il 6° mese post-trapianto in circa la metà dei pazienti. Dopo un anno di follow-up, il 55% dei pazienti presenta segni istologici di epatite cronica del *graft*, e a 5 anni post-OLT, dal 9% al 28% presenta segni istologici di cirrosi (3, 4). Un piccolo gruppo di pazienti (<5%) sviluppa una epatite fibrosante colestatica, che progredisce ad insufficienza del *graft* entro 1-2 anni dopo il trapianto (5). La diagnosi di epatite C cronica del *graft* è basata sull'esame istologico, in quanto i test di laboratorio della funzione epatica hanno bassa specificità nel post-trapianto, e i livelli di ALT non sono correlati all'attività di malattia. Inoltre la viremia è sempre presente e non necessariamente è indice di malattia.

La progressione di malattia dopo OLT è variabile, tuttavia l'epatite cronica HCV-relata post-trapianto sembra essere più rapidamente progressiva rispetto al pre-trapianto, con una più rapida progressione della fibrosi (6), un minore tempo medio per lo sviluppo di cirrosi (10-12 anni vs 20-30 anni, rispettivamente) (7), e una maggiore frequenza di scompenso una volta raggiunta la fase di cirrosi (50% in 1 anno vs 20-25% in 10 anni, rispettivamente) (8). La progressione della fibrosi sembra essere più veloce inoltre nei pazienti trapiantati negli ultimi anni, rispetto alle casistiche precedenti.

Nonostante gli studi dei singoli centri non abbiano riportato tassi di mortalità maggiori nei trapiantati HCV positivi rispetto agli HCV negativi (9), una recente analisi delle cause di morte nei pazienti sottoposti ad OLT con una sopravvivenza superiore ai 3 anni indicava una causa epatologica nel 42% dei decessi, di cui la maggior parte rappresentata dal rigetto cronico e dalla ricorrenza da HCV (10). Con la disponibilità di dati di follow-up a più lungo termine, la ricorrenza da HCV va emergendo quale importante causa di morbidità e mortalità nei pazienti trapiantati. Un recente studio retrospettivo sulla progressione dell'epatite C post-OLT evidenziava la presenza di danno istologico HCV-relato in oltre il 90% dei pazienti trapiantati

(11). In una analisi retrospettiva di oltre 11.000 trapiantati, la ricorrenza da HCV era associata ad un aumento di mortalità del 23%, e ad un aumento di insufficienza del *graft* del 30% (12).

L'osservazione che negli ultimi anni l'epatite C sia più rapidamente progressiva dopo il trapianto ha concentrato l'attenzione sull'identificazione degli eventuali fattori che influenzino la gravità, la progressione e la sopravvivenza.

Fattori legati all'ospite, al virus, al donatore, all'intervento chirurgico oltre a fattori esterni possono influenzare la progressione della ricorrenza da HCV. I fattori legati all'ospite comprendono l'HLA e la funzione immunitaria; i fattori virologici comprendono genotipo e viremia; i fattori legati al donatore comprendono età e sesso; i fattori legati all'intervento chirurgico comprendono la durata dell'ischemia e il tempo di riscaldamento; i fattori esterni comprendono l'immunosoppressione, l'anno del trapianto, la terapia antivirale. Per quanto riguarda i fattori virologici, sia il genotipo che la viremia sono stati associati alla progressione dell'epatite C post-trapianto. Nonostante la relazione tra genotipo e gravità di malattia rimanga poco chiara, la maggioranza dei pazienti che sviluppa l'insufficienza epatica è infetta dai genotipi 1a o 1b, i meno responsivi alla terapia antivirale pre-trapianto (13).

I livelli di HCV RNA prima e dopo il trapianto hanno un significato predittivo dello sviluppo e/o della gravità dell'epatite C del *graft* (14).

Per quanto riguarda l'immunosoppressione, è probabile che i farmaci immunosoppressivi abbiano un effetto sfavorevole sulla storia naturale della ricorrenza da HCV (15). Tuttavia, l'esatto meccanismo di azione di molti immunosoppressori non è ancora chiaro, pertanto il loro ruolo nella progressione dell'infezione da HCV rimane oggetto di speculazione.

I corticosteroidi hanno rappresentato il fondamento della terapia immunosoppressiva fino all'avvento dei nuovi farmaci più selettivi; gli steroidi sono controindicati nel pre-trapianto ed è stato dimostrato che sono in grado di provocare un aumento dei livelli di HCV RNA (16). Dal 1989, la durata del trattamento steroideo post-OLT si è ridotta (17); tuttavia molti regimi immunosoppressivi attuali comprendono il prednisone o altri derivati steroidei. Rimangono molti quesiti insoluti riguardo l'uso ottimale degli steroidi per l'immunosoppressione (18). Negli ultimi anni vi sono stati progressi nella terapia immunosoppressiva, con la disponibilità di farmaci più potenti. Tali nuovi farmaci permettono uno scalaggio più precoce degli steroidi, limitando lo sviluppo delle complicanze associate alla terapia steroidea a lungo termine (19). Data la quantità di immunosoppressori disponibili, rimane da chiarire se le associazioni polifarmacologiche siano meno dannose delle monoterapie, e quale sia il momento più indicato per iniziare la terapia combinata.

Bibliografia

1. Wright TL, Donegan E, Hsu HH, Ferrell L, Lake JR, Kim M, Combs C, Fennessy S, Roberts JP, Ascher NL, *et al.* Recurrent and acquired hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1992; 103(1):317-22.
2. Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, Rimola A, Rodes J. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35(3):680-7
3. Ferrell LD, Wright TL, Roberts J, Ascher N, Lake J. Hepatitis C viral infection in liver transplant recipients. *Hepatology* 1992;16(4):865-76.
4. Feray C, Gigou M, Samuel D, Paradis V, Wilber J, David MF, Urdea M, Reynes M, Brechot C, Bismuth H. The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1994;20(5):1137-43.

5. Schluger LK, Sheiner PA, Thung SN, Lau JY, Min A, Wolf DC, Fiel I, Zhang D, Gerber MA, Miller CM, Bodenheimer HC Jr. Severe recurrent cholestatic hepatitis C following orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1996;23(5):971-6.
6. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M, Cordoba J, Herola A, Ascher N, Mir J, Berenguer J, Wright TL. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol* 2000;32(4):673-84.
7. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349(9055):825-32.
8. Testa G, Crippin JS, Netto GJ, Goldstein RM, Jennings LW, Brkic BS, Brooks BK, Levy MF, Gonwa TA, Klintmalm GB. Liver transplantation for hepatitis C: recurrence and disease progression in 300 patients. *Liver Transpl* 2000;6(5):553-61.
9. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G, Williams R. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996;334:815-20.
10. Pruthi J, Medkiff KA, Esrason KT, Donovan JA, Yoshida EM, Erb SR, Steinbrecher UP, Fong TL. Analysis of causes of death in liver transplant recipients who survived more than 3 years. *Liver Transpl* 2001; 7(9):811-5.
11. Sanchez-Fueyo A, Restrepo JC, Quinto L, Bruguera M, Grande L, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Rimola A. Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft. *Transplantation* 2002;73(1):56-63.
12. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002;122:889-96.
13. Prieto M, Berenguer M, Rayon JM, Cordoba J, Arguello L, Carrasco D, Garcia-Herola A, Olaso V, De Juan M, Gobernado M, Mir J, Berenguer J. High incidence of allograft cirrhosis in hepatitis C virus genotype 1b infection following transplantation: relationship with rejection episodes. *Hepatology* 1999;29(1):250-6.
14. Sreekumar R, Gonzalez-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J, Burgart L, Wiesner R, Kremers W, Rosen C, Charlton MR. Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 2000;32(5):1125-30.
15. Berenguer M, Prieto M, Cordoba J, Rayon JM, Carrasco D, Olaso V, San-Juan F, Gobernado M, Mir J, Berenguer J. Early development of chronic active hepatitis in recurrent hepatitis C virus infection after liver transplantation: association with treatment of rejection. *J Hepatol* 1998;28(5):756-63.
16. McHutchison JG, Ponnudurai R, Bylund DL, Anguiano A, Pockros PJ, Mondala T, Wilkes LB. Prednisone withdrawal followed by interferon alpha for treatment of chronic hepatitis C infection: results of a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2001;32(2):133-7.
17. Tisone G, Angelico M, Palmieri G, Pisani F, Anselmo A, Baiocchi L, Negrini S, Orlando G, Vennarecci G, Casciani CU. A pilot study on the safety and effectiveness of immunosuppression without prednisone after liver transplantation. *Transplantation* 1999;67(10):1308-13.
18. Berenguer M, Crippin J, Bass N, Gish R, Netto G, Alonzo J, Garcia-Kennedy R, Prieto M, Watson J, Wright T. Proposed strategy to reduce post-transplantation HCV-related disease progression. *Hepatology* 2001;34(4):407. Abstract #942.
19. Magy N, Cribier B, Schmitt C, Ellero B, Jaeck D, Boudjema K, Wolf P, Labouret N, Doffoel M, Kirn A, Stoll-Keller F. Effects of corticosteroids on HCV infection. *Int J Immunopharmacol* 1999;21(4):253-61.

CIRROSI HCV E TRAPIANTO DI FEGATO

Mauro Salizzoni, Paolo Strignano, Bruna Lavezzo
Ospedale "Le Molinette", Torino

Introduzione

La cirrosi epatica da virus C risulta essere, nella maggior parte dei centri, la principale indicazione al trapianto di fegato in età adulta, costituendo circa il 50% della popolazione trapiantata (1). Tale percentuale è destinata ad aumentare nei prossimi anni, considerando la prevalenza dell'infezione HCV (Hepatitis c Virus) nei pazienti tra i 30 e 50 anni e la storia naturale della malattia. L'evoluzione della recidiva epatitica da virus C dopo trapianto di fegato è estremamente variabile: in alcuni pazienti si assiste alla presenza di viremie elevate con minime alterazioni istologiche, in altri si osservano severe forme di epatite sino alla cirrosi.

Storia naturale dell'infezione da HCV dopo il trapianto

Distinguiamo reinfezione dalla recidiva epatitica: per reinfezione si intende la viremia positiva; tale condizione si verifica nella pressoché totalità dei casi. La recidiva di malattia, definita come epatite istologicamente diagnosticata, si osserva nel 50-70% dei pazienti a 2 anni dal trapianto: generalmente si tratta di un'epatite lobulare, frequentemente asintomatica, che comunemente viene diagnosticata tra il primo e quarto mese post-trapianto. Tale quadro evolve in epatite cronica nel 50-70% dei pazienti ad un follow-up di 2-3 anni (2). Il livello di transaminasi e di viremia risultano essere uno scarso indice di severità del danno istologico; lo stato di "portatore sano" è inoltre molto raro dopo trapianto. In alcuni centri dove le biopsie sono eseguite annualmente si riscontra una epatite nella maggior parte dei pazienti (sino al 97% dei casi): di questi il 60% dei casi è di grado moderato-severo. La fibrosi si sviluppa in circa i 2/3 dei pazienti e la probabilità cumulativa di cirrosi aumenta con il tempo: entro il 5°anno di follow-up si può verificare nel 15-30% dei casi. In uno studio di Berenguer è stata calcolata una progressione di fibrosi di 0,3 per anno (significativamente più alto che nel pre-trapianto: 0,2/anno): questo significa che il tempo medio di sviluppo di cirrosi post-trapianto è di circa 10 anni (3). Nel 5-8% dei pazienti, tuttavia, si assiste ad una recidiva di epatite fibrosante rapidamente progressiva, la forma più severa e aggressiva, caratterizzata da una precoce insufficienza epatica con prognosi infausta.

I primi studi suggerivano che la sopravvivenza dei pazienti trapiantati per cirrosi HCV non era inferiore a quella dei trapiantati per altre cause. Nel 1994 Feray riportava una sopravvivenza dei pazienti HCV positivi dell'80% vs l'89% dei pazienti HCV negativi (2); anche Gane non aveva trovato differenze significative di sopravvivenza nei 2 gruppi (70 vs 69%). Per questi autori la recidiva HCV non aveva un significativo impatto sulla mortalità nella prima decade post-trapianto (4). Attualmente, però, molti centri hanno osservato che la storia naturale dell'epatite C nei pazienti immunodepressi risulta più aggressiva rispetto a quella dei pazienti immunocompetenti, in cui solo il 20% progredisce verso la cirrosi dopo 20 anni di esposizione al virus. Già nel 1994 alcuni autori riportavano una minore sopravvivenza del *graft* (56% vs

74%) e dei pazienti (66% vs 81%) nel gruppo HCV positivo rispetto al gruppo HCV negativo. In uno studio spagnolo la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti HCV positivi risulta significativamente inferiore rispetto ai controllo (60% vs 75%) (5). Anche nella nostra casistica la sopravvivenza risulta significativamente ridotta nel gruppo degli HCV positivi rispetto al gruppo degli HCV negativi (70% e 80% rispettivamente). L'aumentata mortalità dopo il terzo mese nel gruppo HCV positivo è causata dalla recidiva di cirrosi (Tabella 1).

Tabella 1. Sopravvivenza a cinque anni di follow-up dopo trapianto di fegato

Autore, anno	HCV + (%)	HCV – (%)
Gane, 1996	70	69
Boker, 1996	62	57
Shuart, 1997	71	75
Arraya, 1997 (3aa)	66	81
Eltr, 1999	67	66
Berenguer, 1999	60	75
Salizzoni, 1999	70	80

La storia naturale della cirrosi post-trapianto è ancora poco nota, tuttavia ha sicuramente una prognosi peggiore rispetto alla malattia dei pazienti immunocompetenti: la probabilità cumulativa di scompenso è circa del 50% a 1 anno (in confronto all'8% dei pazienti cirrotici non immunodepressi); lo scompenso più frequente è l'ascite. Alla comparsa dello scompenso la probabilità di sopravvivenza ad un anno del paziente crolla dal 74 al 41%. Variabili correlate con aumentato rischio di scompenso e di mortalità sono: breve intervallo tra trapianto e insorgenza istologica della cirrosi, bassi livelli di albumina e alto punteggio CHILD (6).

Nella nostra casistica 236 pazienti HCV positivi sono stati trapiantati tra il 1990 e il 1999, di questi 204 sono sopravvissuti più di 3 mesi: la recidiva di cirrosi è stata osservata in 28 pazienti (14%) dopo un follow-up medio di 29 mesi (range 6-68): 8 sono asintomatici, 6 pazienti presentano segni di scompenso epatico (emorragia digestiva o ascite), 3 sono stati ritrapiantati (di questi 2 sono vivi), 11 sono deceduti per insufficienza epatica dopo un tempo medio di 7 mesi (range 3-16 mesi) dalla diagnosi di cirrosi.

Fattori che influiscono sulla severità e progressione della malattia

Le ragioni dell'espressione variabile della malattia rimangono poco chiare, ma verosimilmente sono in relazione a:

- caratteristiche intrinseche del virus;
- caratteristiche geneticamente determinate dell'individuo;
- influenze dell'ambiente o iatrogene come ad esempio tipo e grado di immunosoppressione.

Le variabili più studiate sono i fattori virali (genotipo e carica virale) e l'immunosoppressione (7).

Genotipo

Il suo ruolo sull'*outcome* dell'epatite post-trapianto è ancora oggetto di dibattito. Diversi studi europei sostengono un'associazione tra genotipo 1b e recidiva epatitica severa, non confermata da altrettanti studi, soprattutto statunitensi. Questi dati discordanti possono essere in relazione alla differente epidemiologia del virus nelle diverse aree del mondo.

Viremia pre-trapianto

Alti livelli di viremia pre-trapianto sono stati messi in correlazione sia con una peggiore prognosi (8) sia con una più severa progressione della malattia (3): la soglia di viremia identificata varia tra 1 e $0,5 \times 10^6$ vEq/ml.

Recidiva epatitica

Il grado di attività istologica e lo score di fibrosi al primo anno sono fattori prognostici di sviluppo di cirrosi (9).

Immunosoppressione

Una immunosoppressione più elevata nell'immediato post-trapianto correla con un maggior rischio di recidiva epatitica severa e progressione verso la cirrosi. L'induzione con micofenolato, il numero di boli di prednisolone e la terapia con OKT3 aumentano la probabilità di sviluppare una grave fibrosi a 5 anni dal 30 al 60%. Si è osservata un'associazione tra incidenza di cirrosi e numero di rigetti: in uno studio spagnolo pazienti con più di 2 episodi di rigetto hanno una probabilità di sviluppo di cirrosi del 50%. Le ragioni che possono spiegare questa associazione non sono chiare, ma possono includere: aumento della viremia causata dall'immunosoppressione, *up-regulation* generalizzato del sistema immunitario (quindi aumentato riconoscimento di antigeni virali), similitudine del quadro istologico del rigetto cellulare e recidiva epatitica con conseguente difficoltà della diagnosi, soprattutto nel primo mese post-trapianto.

Anno di trapianto

In uno studio spagnolo è stato osservato che l'anno di trapianto correla con il rischio di sviluppo di cirrosi: pazienti trapiantati prima del '94 hanno un tempo medio di sviluppo di cirrosi tra 9 e 12 anni, per quelli trapiantati negli anni successivi questo tempo si può abbreviare sino a 2 anni. Questa associazione suggerisce che il trattamento dopo trapianto gioca un ruolo importante nella progressione della malattia. Questo significa inoltre che il numero di trapiantati in stadio di cirrosi aumenterà nei prossimi anni nei centri di trapianto che raggiungeranno la loro seconda decade di attività (3).

Approccio terapeutico

La prevenzione della recidiva epatitica è il principale scopo della terapia di questi pazienti. Ci sono quattro potenziali approcci complementari:

- terapia antivirale pre-trapianto, con lo scopo di sopprimere la replicazione virale;
- terapia antivirale nell'immediato post-trapianto in modo da prevenire la progressione della malattia HCV prima ancora che si instaurino lesioni istologiche;
- trattamento della recidiva epatitica con antivirali dal momento della diagnosi;
- modulazione dell'immunosoppressione.

Non vi sono studi clinici controllati di ampia scala, bensì molti gruppi hanno condotto studi su un numero limitato di pazienti per valutare l'efficacia dell'interferone, della ribavirina o della Terapia Combinata (TC), con risultati difficilmente confrontabili (10, 11) (Tabella 2).

Tabella 2. Risposta virologica end-treatment e dopo follow-up di 12 mesi in pazienti trattati con TC

Pazienti	Terapia end-treatment		
	durata	risposta	risposta dopo 12 mesi follow-up
27	6 mo	9 (33,3%)	6 (22%)
30	12 mo	7 (23,3%)	5 (17%)

La *terapia antivirale pre-trapianto* è un approccio interessante, tuttavia di difficile applicazione data la presenza di malattia spesso avanzata e la scarsa tolleranza della terapia antivirale attualmente disponibile.

La *terapia precoce nel post-trapianto* è stata proposta per ridurre l'incidenza e/o la severità della recidiva epatitica. Nello studio di Sheiner 86 pazienti sono stati randomizzati per ricevere IFN 3MU x 3/settimana per un anno oppure placebo, con inizio della terapia entro la seconda settimana dal trapianto. La sopravvivenza a 2 anni non differiva tra i due gruppi e la terapia non influenzava i livelli di viremia, tuttavia il gruppo dei trattati aveva un'incidenza significativamente minore di malattia istologica a un anno. In uno studio pilota italiano composto da 21 pazienti trattati per un anno con terapia combinata interferone + ribavirina (TC), solo 4 (19%) hanno sviluppato recidiva epatitica all'anno, tuttavia il 59% dei pazienti manteneva una viremia positiva. Uno studio multicentrico italiano è in corso per valutare il beneficio della monoterapia con interferone o della TC nell'immediato periodo post-trapianto.

Il *trattamento al momento della diagnosi della recidiva* è un'alternativa, tuttavia i risultati di studi preliminari sono controversi. Nello studio di Bizollon la normalizzazione delle transaminasi è stata ottenuta in tutti i 21 pazienti trattati con TC per 6 mesi, mentre la negativizzazione dell'HCV-RNA si è osservata nel 48% dei casi; la viremia si è mantenuta negativa in metà di quest'ultimi nei 6 mesi successivi di monoterapia con ribavirina. Nello studio di Gotz, la terapia combinata ha normalizzato le transaminasi nel 50% dei pazienti, ma solo uno ha negativizzato la viremia.

Bellati ha analizzato i risultati in 122 pazienti trattati con TC per 6-12 mesi, una risposta virologica alla fine del trattamento si è avuta nel 35% dei pazienti, una risposta a lungo termine nel 24%.

Nel nostro centro abbiamo trattato con TC 57 pazienti trapiantati tra il 1990 e il 1998: 15 pazienti presentavano un'epatite cronica nota da tempo, 42 una recidiva epatitica recente, il 70% dei pazienti era di genotipo 1b. 27 pazienti sono trattati per 6 mesi, 30 pazienti per 12 mesi. La risposta virologica alla fine del trattamento è stata rispettivamente del 33% e 23% e del 22% e 17% a 12 mesi di follow-up (Tabella 3).

Tabella 3. Terapia della recidiva epatitica c con interferone e/o ribavirina

Autore, anno	Pazienti	Tipo (durata del trattamento)	Risposta virologica		Miglioramento istologico
			<i>end-treatment</i>	<i>dopo follow-up</i>	
Wright 1994	18	IFN (4-6 mesi)	0,5 %	0	28%
Feray 1995	46	IFN (1-6 mesi)	22%	11%	22%
Vargas 1995	14	IFN (6 mesi)	0%	NN	8%
Cattral 1996	9	Ribavirina	0%	0%	25%
Gane 1998	30	IFN + Ribavirina (6 mesi)	46%	NN	0%
Bizzollon 1997	21	IFN + Ribavirina (6 mesi)	48%	28%	94%
Torino	57	IFN + Ribavirina (6-12 mesi)	28%	20%	100%
Bellati 1999	122	IFN + Ribavirina (6-12 mesi)	35%	24%	NN

I principali effetti collaterali sono l'anemia e la leucopenia. L'anemia è di tipo emolitico, e in media l'emoglobina si riduce di circa 2 g/dl durante la terapia; se severa può essere necessaria una terapia con emotrasfusioni. Dato il meccanismo di emolisi occorre valutare l'eventuale insorgenza di un sovraccarico marziale. Nel nostro studio questi effetti collaterali hanno determinato una riduzione della terapia nel 50% dei casi e una sospensione nel 3%. Altri studi riportano un'interruzione nel 49% dei casi. Un effetto collaterale raro è invece il rigetto, probabilmente grazie alle proprietà immunomodulatorie della ribavirina che controbilancia l'effetto dell'interferone.

Modulazione dell'immunosoppressione

Il regime immunosoppressivo ottimale per i pazienti HCV positivi non è purtroppo noto. La maggior parte degli studi non ha riscontrato una differenza significativa della sopravvivenza del *graft* e/o dei pazienti trattati con ciclosporina in confronto ai pazienti trattati con tacrolimus. Poiché una epatite più severa è descritta nei pazienti che hanno ricevuto una maggiore quantità di steroide e/o OKT3 (12), il trattamento del rigetto dovrebbe essere meno aggressivo in questi pazienti. Tuttavia rimane aperta la questione di quanto immunosopprimere il paziente HCV positivo: scegliere un trattamento immunosoppressivo meno efficace contro il rigetto ma che riduca la probabilità di recidiva epatitica o un trattamento più efficace nel ridurre l'incidenza di rigetto ma potenzialmente associato ad una accelerata recidiva HCV?

Ritrapianto

L'unica possibilità terapeutica dopo lo scompenso della cirrosi è un nuovo trapianto che dovrebbe essere effettuato nel più breve tempo possibile per ridurre l'alta mortalità post-

operatoria (13). Tuttavia il numero limitato degli organi, l'aumento della mortalità post-trapianto e il timore di una nuova recidiva precoce della cirrosi rendono questa scelta molto difficile. Alcuni dati suggeriscono che l'epatite C post-trapianto abbia un decorso aggressivo simile a quello osservato nel primo trapianto, pertanto terapie antivirali profilattiche o precoci dovrebbero essere prese in considerazione

Conclusioni

La recidiva epatitica da virus C è una importante causa di morbilità e mortalità dopo trapianto di fegato, pertanto sono necessarie terapie di prevenzione o di rallentamento della malattia. Purtroppo la terapia antivirale finora disponibile ha dato risultati limitati. nel prossimo futuro *trial* multicentrici valuteranno l'efficacia degli interferoni *pegylati*. Oltre all'efficacia, tossicità e costi sono gli altri parametri da valutare nell'applicazione di nuovi farmaci.

Bibliografia

1. *The European liver transplantation registry report*. Villejuif (France): Hôpital Paul Brousse; 1994.
2. Feray C, Gigou M, Samuel D, *et al*. The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 1994;20:1137-43.
3. Berenguer M, Ferrekk L, Watson J, *et al*. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *Journal of Hepatology* 2000;32:673-84.
4. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, *et al*. Long term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Eng J Med* 1996;334:815-20.
5. Berenguer M, Prieto M, Aguilera D, *et al*. Alarming decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. (Abstract) *Hepatology* 2001.
6. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, *et al*. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000;32:852-8.
7. Papatheodoridis GV, Patch D, Dusheiko M, *et al*. The outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation – is it influenced by the type of immunosuppression? *Journal of Hepatology* 1999;30:731-8.
8. Charlton M, Seaberg E, Wiesner R, *et al*. Predictors of patient and graft survival following liver transplantation for hepatitis C. *Hepatology* 1998;28:823-30.
9. Rosen HR, Gretch DR, Oehlke M, *et al*. Timing and severity of initial hepatitis C recurrence as predictors of long-term liver allograft injury. *Transplantation* 1998;65:1178-82.
10. Szabo G, Katz E, Bonkovsky HL. Management of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a concise review. *The American Journal of Gastroenterology* 2000;95:2164-70.
11. Bizollon T, Ducerf C, Trepo C. Hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Gut* 1999;44:575-78.
12. Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, *et al*. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995;21:30-4.
13. Rosen HR, Madden JP, Martin P. A model to predict survival following liver retransplantation. *Hepatology* 1999;29:365-70.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, settembre 2003 (n. 3) 12° Suppl.