

Viremia da virus dell'epatite C (HCV) negli emodializzati: prevalenza, implicazioni cliniche e metodiche di biologia molecolare

F. Aucella, C. Stallone

Divisione di Nefrologia e Dialisi

*Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" - Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
San Giovanni Rotondo (FG)*

Mentre la messa in atto delle misure di controllo dell'infezione da virus dell'epatite B (HBV) praticamente annullava l'incidenza di nuovi casi nei centri di emodialisi, la scoperta del virus dell'epatite C (HCV) apriva un nuovo capitolo nello studio delle epatopatie dell'uremico cronico trattato con terapia sostitutiva extracorporea. Sin dai primi riscontri apparve chiaro che l'HCV era il principale responsabile di quella che veniva precedentemente definita quale epatite nonA-nonB e, in particolare, dei casi di epatite post-trasfusionale (1, 2) nonché di malattia cronica criptogenetica e di carcinoma epatico (3). Nella popolazione emodialitica italiana gli studi pubblicati hanno documentato, con l'uso del test ELISA di seconda generazione, una prevalenza variabile dal 20 al 40% (4, 5), aprendo così tra i nefrologi un'ampia disputa sulle misure più idonee per la prevenzione di nuovi casi a trasmissione nosocomiale (6, 7). Tuttavia, il significato clinico della presenza di anticorpi antiHCV rimane ancora non ben definito, in quanto la sieropositività non è sinonimo di infettività. Gli anticorpi possono essere espressione sia di una precedente, ed ormai risolta infezione, sia di malattia acuta con replicazione vi-

rale in atto. Questo è ancor più vero ove si tenga presente la scarsa incidenza di alterazioni bioumorali nei pazienti uremici con epatopatia e la scarsa predittività delle stesse alterazioni enzimatiche (ALT, AST) (8). Ma l'attribuzione di un preciso valore al riscontro anticorpale sarebbe auspicabile per varie ragioni:

- 1 - l'eventuale adozione di speciali misure di prevenzione della trasmissione virale nosocomiale;
- 2 - la possibile terapia con interferon alpha per il trattamento dell'epatopatia da HCV prima del trapianto;
- 3 - il più volte documentato riscontro di normali valori di transaminasi nei soggetti antiHCV+;
- 4 - il possibile peggioramento dell'epatopatia dopo il trapianto renale per la terapia immunosoppressiva;
- 5 - la selezione di alcuni (tutti ?) pazienti per la biopsia epatica per una precisa definizione dell'epatopatia.

La risposta a questi complessi problemi non può essere garantita dal riscontro anticorpale, almeno con i test attualmente in uso. Con la disponibilità della reazione a catena polimerasica (PCR) e con l'identificazione del genoma virale e della sua sequenza nucleotidica, è possibile la determinazione diretta del genoma virale

sia nel siero che nei tessuti. In letteratura vi sono ancora scarse segnalazioni, di cui molte in forma di abstract, sulla prevalenza della viremia da HCV negli emodializzati (9, 10). Scopo del presente lavoro è stato quindi quello di valutare la sieroprevalenza della viremia da HCV nella nostra popolazione emodialitica, di confrontare i risultati con il riscontro anticorpale e valutare le possibili implicazioni cliniche.

Materiali e metodi

Sono stati valutati 76 pazienti in TEP (42 maschi e 34 femmine), con età anagrafica di 58 ± 23 anni (range 23-78) e anzianità dialitica di 75 ± 55 mesi (range 12-188). I pazienti sono stati arruolati in due unità di emodialisi ove venivano praticate sia la routinaria bicarbonato dialisi, sia emodiafiltrazione, paired filtration dialysis e acetate-free biofiltration. La durata della singola seduta variava da 3 a 4.5 ore. Nessun paziente risultava HIV positivo. L'anamnesi trasfusionale veniva valutata nel periodo della terapia extracorporea. Le cause di insufficienza renale nella popolazione studiata erano: glomerulonefrite (n. 21), nefrite interstiziale

(n. 16), nefropatia diabetica (n. 9), ipertensione arteriosa (n. 15), malattia renale policistica (n. 6), causa non determinata (n. 7) e amiloidosi (n. 2). In tutti i pazienti veniva ricercata la presenza di anticorpi antiHCV sia con il test ELISA di seconda generazione (Ortho), sia con il test di conferma RIBA anch'esso di seconda generazione (Chiron). L'antigene Australia e i marker dell'epatite B venivano determinati con test Abbott. Le ALT sieriche venivano determinate mensilmente; si definiva come epatopatia cronica un valore elevato di ALT protratto per più di 5 mesi, quale epatopatia acuta una elevazione delle ALT per non più di 3 mesi.

Reazione Polimerasica a Catena

Per la procedura della Polymerase Chain Reaction (PCR) tutti campioni venivano stoccati a -80 °C per non più di 15 giorni prima dell'effettuazione del test. La ricerca del genoma virale è

stata effettuata sia con la metodica messa a punto presso il nostro laboratorio (metodo A), sia con "Amplicor Hepatitis C virus test" (Roche Diagnostic System, Nutley, NJ) (metodo B). La metodica A, da noi messa a punto, comporta le seguenti procedure:

- diretta denaturazione del siero con shock termico a 92 °C per 30'' nel T.C. e successiva incubazione in ghiaccio per 10';
- retrotrascrizione con RT AVM a 42°C per 60';
- prima amplificazione con TAQ-poli-merasi e primer della regione conservata 5' non tradotta (utr);
- nested con primer interni alla regione del primo amplificato;
- migrazione elettroforetica su gel di agarosio al 2% con etidio bromuro;
- lettura agli U.V.

La metodica B, ovvero l'"Amplicor Hepatitis C virus test" della Roche è così sintetizzabile:

- estrazione dell'RNA con tampone di lisi contenente guanidino tiocianato e beta-mercaptoetanolo ed RNA carrier;
- incubazione a 65 °C per 10' e aggiunta di isopropanolo;

- dopo centrifugazione e rimozione del surnatante, trattamento del pellet con etanolo al 70%;

- risospensione del pellet nel diluente;
- retrotrascrizione e amplificazione in un'unica mix e in un solo step con rTth e primer biotinilati;
- fase di rivelazione dell'amplificato con metodica immunoenzimatica mediante ibridazione con specifiche sonde oligonucleotidiche e coniugazione con perossidasi di rafano marcata con avidina;
- lettura spettrofotometrica.

L'analisi statistica veniva condotta con il test del Chi Quadro per l'analisi della frequenza e con il t-test di Student attraverso un comune programma statistico montato su PC. Il livello di significatività era fissato a 0.05.

Risultati

I 76 pazienti arruolati venivano suddivisi in due gruppi: *gruppo A*, 48 pazienti antiHCV positivi in ELISA, 35 dei quali confermati in RIBA; *gruppo B*, 28 soggetti antiHCV negativi quale gruppo di

TABELLA I - CARATTERISTICHE CLINICHE DEI SOGGETTI ANTIHCV+ ED ANTIHCV-

	Età	Tep	U.Tr.	E.A.	E.C.	HBsAg	HBsAb	HBcAb	HBcAg	HBcAb
AntiHCV+ (n. 48)	57 ± 13	101 ± 65	14 ± 17	5 ± 4	8.1 ± 9	5	34	29	0	14
AntiHCV- (n. 28)	58 ± 16	54 ± 25	5 ± 8	3.5 ± 2	2.2 ± 2	2	17	14	0	8
p	n.s.	0.0003	0.02	n.s.	0.03	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Nota: risultati espressi come media ± DS; età, anni; Tep, mesi; U.Tr.: trasfusioni; E.A.: epatite acuta, E.C.: epatite cronica

TABELLA II - CARATTERISTICHE CLINICHE DEI SOGGETTI PCR+ E PCR- (TUTTI ANTIHCV+)

	Età	Tep	U.Tr.	E.A.	E.C.	HBsAg	HBsAb	HBcAb	HBcAg	HBcAb
HCV-RNA+ (n. 30)	62 ± 10	84 ± 52	15 ± 16	7 ± 3	7 ± 2	2	23	17	0	9
HCV-RNA- (n. 18)	56 ± 16	90 ± 73	11 ± 15	3 ± 2	5 ± 1	3	11	12	0	5
p	n.s.	n.s.	n.s.	0.02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Nota: risultati espressi come media ± DS; età, anni; Tep, mesi; U.Tr.: trasfusioni; E.A.: epatite acuta; E.C.: epatite cronica

controllo. Questi due gruppi mostravano delle significative differenze per l'anzianità dialitica ($p < 0.0003$), e l'anamnesi trasfusionale ($p < 0.02$); non si riscontravano invece differenze per la frequenza di episodi di epatite acuta, i livelli di ferritinemia o l'infezione di virus dell'epatite B (Tab. I). Gli episodi di epatite cronica risultavano più frequenti nel gruppo degli antiHCV positivi ($p < 0.03$). Tutti i soggetti, sia del gruppo A che del gruppo B, erano testati per la ricerca del genoma virale tramite PCR. Il virus dell'HCV si riscontrava in 30 su 48 degli antiHCV positivi (62.5%, PCR+) e in un unico paziente del gruppo B (3.6%). Diciotto pazienti antiHCV positivi non erano viremici (PCR-). I risultati erano i medesimi con entrambe le metodiche PCR adoperate, quella di nostra elaborazione e il test Roche. Esse, sebbene diverse in molti step, presentano lo stesso tipo di sensibilità e specificità. Dopo nove mesi di follow-up l'unico paziente antiHCV negativo e viremico risulta ancora privo di anticorpi, ma ripetutamente PCR positivo, in assenza di qualunque sintomo o segno di epatopatia. I soggetti viremici, PCR+, e i non viremici, PCR-, in totale 48 pazienti del gruppo A, venivano confrontati. L'unica differenza significativa risultava essere la frequenza di episodi di epatite acuta, più frequenti nei viremici ($p < 0.02$, Tab. II). 35 pazienti su 48 del gruppo A avevano un test RIBA positivo; tra i PCR+ (n. 30) 7 mostravano un RIBA indeterminato, di cui 3 reagenti per il solo c33, 3 per il solo c22 e 1 con bassi titoli di anti-c33 e -c22. Nel gruppo PCR- 6 soggetti mostravano un test RIBA indeterminato, 5 reagenti per il solo c22 e 1 per il solo c33. Al fine di verificare la possibile predittività del test RIBA, si valutava la frequenza sia della positività che dei singoli antigeni nei gruppi PCR+ e PCR-. Nessuna differenza di rilievo veniva notata (Tab. III).

Discussione

La diagnosi di infezione da virus dell'epatite C viene attualmente posta in prima istanza con la ricerca degli anticorpi antivirali nel siero e, ove sia necessario nonché possibile, tramite la ricerca diretta del genoma virale. Dopo l'isolamento dell'RNA virale nel 1989 ad opera di Choo (11) e la determinazione della sequenza nucleotidica (12), attraverso l'u-

so di moderne tecnologie biologiche quali la Reazione polimerasica a catena, è possibile ricercare direttamente l'RNA virale sia nel siero che nei tessuti. L'analisi condotta con la PCR è di grande ausilio per capire meglio la trasmissione e la storia naturale dell'infezione da HCV. Difatti, benché gli anticorpi antiHCV possano persistere per anni in soggetti clinicamente guariti da epatite acuta, l'unico test diretto per la diagnosi di infezione da HCV è la determinazione del genoma virale. Il presente studio si è prefisso di valutare la prevalenza della viremia da HCV in una popolazione di soggetti emodializzati e di valutarne le relazioni con alcuni parametri clinici e bioumorali. Nel confronto tra pazienti antiHCV+ e antiHCV- si confermava la significativa differenza per l'età dialitica ($p < 0.0003$, Tab. I) e per l'anamnesi trasfusionale ($p < 0.02$), come già noto in letteratura (13-15).

Nella nostra popolazione, tuttavia, si notava una necessità trasfusionale molto più limitata rispetto ad altri gruppi studiati (16); l'anzianità dialitica diveniva quindi il fattore più rilevante per l'infezione nelle unità dialitiche. D'altro canto la trasmissione nosocomiale è stata già documentata, anche in forme epidemiche (17). A differenza di studi precedenti (18) non si riscontrava alcuna relazione tra antiHCV positività e marker dell'epatite B; tuttavia, la maggior parte dei nostri pazienti risultava coinfectata dal virus B (Tab. I). Altra significativa differenza tra i soggetti antiHCV- ed antiHCV+ era la frequenza di episodi di epatite cronica ($p < 0.03$): si confermavano, quindi, le conclusioni di Dussol che documentava come soli tre parametri differissero significativamente nelle due categorie, ovvero l'anzianità dialitica, il numero di trasfusioni e la frequenza di epatite cronica (16). Tutti i pazienti arruolati venivano quindi sottoposti a ricerca della viremia da HCV tramite PCR. Nel gruppo A, antiHCV+, si riscontrava una prevalenza del 62.5%, 30/48; mentre nel gruppo B, antiHCV-, un unico paziente risultava positivo (3.6%). Questi risultati sono in accordo con la letteratura esistente (10, 16, 19), confermandosi da un lato una elevata percentuale di viremici tra i soggetti con positività anticorpale, dall'altro l'eccezionalità della viremia nei soggetti senza anticorpi. Dopo 9 mesi di follow-up l'unico paziente antiHCV- e ripetutamente

PCR+, risulta ancora negativo al test anticorpale, sia in ELISA di II e III generazione, sia al RIBA II: è tuttavia descritto in letteratura una latenza sino a 18 mesi nella comparsa della risposta anticorpale (16). È comunque interessante notare che il suddetto paziente non mostra alcun segno clinico o bioumorale di epatopatia. Sottolineiamo come con entrambe le metodiche di PCR adoperate si ottenessero identici risultati; in particolare, tutti i campioni positivi e negativi, analizzati più volte, non hanno mai dato luogo a discordanze nei risultati. Anche se i sistemi di rivelazione sono completamente diversi, abbiamo constatato come nel metodo A le bande e la loro intensità fossero sempre perfettamente visibili agli UV, mentre con il kit Roche, metodo B, la lettura spettrofotometrica risultasse sempre superiore al cut-off nei campioni positivi. Mentre il metodo B ha tutti i vantaggi di un kit già assemblato, nonché un tempo di esecuzione di circa 6 ore, invece delle 8 ore del metodo A, tuttavia quest'ultimo vanta un costo notevolmente inferiore (circa 1/5). Tale dato assume ancor più rilevanza se si pensa alla possibile estensione dell'uso delle metodiche PCR nella pratica clinica. Confrontando i soggetti viremici, PCR+, con quelli non viremici, PCR-, l'unica differenza di rilievo era la frequenza di epatite acuta ($p < 0.02$, Tab. II). Tuttavia, la frequenza complessiva di malattia epatica, valutata senza biopsia, risultava bassa. Ciò non sorprende, vista la scarsa relazione esistente tra viremia e segni bioumorali di epatopatia (10). Si aveva, quindi, una presentazione clinica estremamente simile dei soggetti viremici e non, così come era stata da altri segnalata l'assenza di relazione tra replicazione virale e andamento enzimatico (10, 20). Per valutare le possibili relazioni tra viremia e anticorpi abbiamo valutato sia la positività al RIBA di seconda generazione sia la frequenza dei singoli anticorpi; infatti, precedenti riscontri avevano documentato o una buona relazione (21, 22) o nessuna relazione (23); i nostri risultati sono in accordo con questi ultimi lavori, non avendo riscontrato alcuna relazione né con il test RIBA né con i singoli anticorpi. Una viremia intermittente potrebbe spiegare questi risultati, ma riteniamo più probabile che in alcuni casi la positività anticorpale sia la spia di infezioni ormai risolte o, in alternativa, che la PCR possa non identificare livelli vi-

remici molto bassi. A conferma di ciò, un secondo test con PCR eseguito ad un mese di distanza risultò positivo in 29/30 casi precedentemente PCR+.

In conclusione, nella nostra popolazione di emodializzati si documentava una prevalenza di viremia da HCV nel 62,5% dei soggetti antiHCV+. La presenza degli anticorpi non risultava essere di per sé predittiva di viremia e, quindi, di infettività.

Il test RIBA di seconda generazione non differenziava i soggetti viremici dai non viremici, i quali avevano anche una presentazione clinica estremamente simile. Pertanto, sembra profilarsi la necessità della ricerca diretta del genoma virale tramite PCR per stabilire la replicazione virale e l'infettività. Ciò sembra maggiormente appropriato per gli uremici cronici nei quali è nota una minore frequenza di alterazioni bioumorali in corso di epatopatia; d'altro canto, gli stessi pazienti sono esposti all'infezione nosocomiale e sono possibili riceventi di un trapianto renale. La biopsia epatica si profila quindi come indagine necessaria per stabilire l'effettiva patologia in atto e per l'eventuale prescrizione di terapia antivirale.

Riteniamo quindi che la ricerca diretta dell'RNA virale possa essere un ottimale approccio per future strategie terapeutiche o per la pianificazione di misure atte a limitare l'infezione nosocomiale.

BIBLIOGRAFIA

1. Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2: 294-7.
2. Hopf U, Moller B, Kuther D, et al. Long-term follow-up of post-transfusion and sporadic chronic hepatitis nonA nonB and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *J Hepatol* 1990; 10: 69-76.
3. Colombo M, Kuo G, Choo GL, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 2: 1006-18.
4. Mosconi G, Campieri C, La Manna G, et al. Epidemiologia dell'epatite C nei pazienti in emodialisi: studio della prevalenza con test (ELISA) di seconda generazione. *Giorn It Nefrol* 1992; 4: 179-82.
5. Gessoni G, Manoni F, Nordio B, et al. Studio policentrico sulla sierologia dell'HCV in emodializzati veneti. *Gior It Nefrol* 1992; 4: 203-8.
6. Gilli P, Bergami M, Soffritti S. Considerazioni sulla presenza di pazienti antiHCV positivi nei centri dialisi. *Gior It Nefrol* 1990; 7: 271-2 (lettera alla Redazione).
7. Boero R, Martina G. Prevenzione della diffusione dell'epatite C nei pazienti in emodialisi. *Gior It Nefrol* 1994; 2: 137-8 (lettera alla Redazione).
8. Yamaguchi K, Nishimura Y, Fukuoka N, et al. Hepatitis C virus antibodies in hemodialysed patients. *Lancet* 1990; 335: 1419-22.
9. Adorati M, Pipan C, Botta GA, et al. La ricerca del genoma del virus dell'epatite C mediante PCR in pazienti emodializzati. *Gior It Nefrol* 1993; 3: 191-8.
10. Pol S, Romeo R, Zins B, et al. Hepatitis C virus RNA in anti HCV positive hemodialysed patients: Significance and therapeutic implications. *Kidney Int* 1993; 44: 1097-100.
11. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood borne nonA nonB viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-61.
12. Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-5.
13. Schilpkoter U, Roggendorf M, Ernst G, et al. Hepatitis C virus antibodies in hemodialysed patients. *Lancet* 1990; 335: 1409.
14. Gilli P, Moretti M, Soffritti S, Menini C. Anti-HCV positive patients in hemodialysis units. *Lancet* 1990; 336: 243-4.
15. Gianmaria U, De Meo F, Accitelli S, et al. HCV infection in hemodialysed patients: incidence and correlation with dialytic age. *Nephron* 1992; 61: 335-6.
16. Dussol B, Chicheportiche C, Cantaloube JF, et al. Detection of hepatitis C infection by polymerase chain reaction among hemodialysed patients. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 574-80.
17. Marchesi D, Arici C, Poletti E, et al. Out break of nonA nonB hepatitis in centre hemodialysis patients: a retrospective analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1988; 3: 795-9.
18. Elisaf M, Tsianos E, Mavridis A, et al. Antibodies against hepatitis C virus (HCV) in hemodialysis patients: association with hepatitis B serological markers. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 476-9.
19. Kuhns M, Medina M, Mac Namara A, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in patients on maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 334 (abstract).
20. Garcia Valdecasas J, Bernal MC, Garcia F, et al. Hepatitis C virus in hemodialysis: evaluation of transaminases as a viral replication marker. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 968 (abstract).
21. Picciotto A, Varagona G, Gurreri G, et al. Anti hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus viraemia in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 1115-7.
22. Bouchardeau F, Chaveau P, Zins B, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 967 (abstract).
23. Adorati M, Pipan C, Botta GA, et al. HCV RNA in anti-HCV positive haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 965 (abstract).