

# Problematiche inerenti l'epatite C nei centri dialisi

M. Beccari

*Servizio di Nefrologia e Dialisi  
Ospedale Fatebenefratelli e Oftalmico - Milano*

**L**e epatiti virali costituiscono da sempre un serio problema per i centri dialisi di tutto il mondo.

A causa della ben nota immunodepressione degli uremici, che rende tali pazienti facilmente aggredibili dagli agenti infettivi e poi incapaci di eliminarli, i soggetti infettati rappresentano un cronico serbatoio e possono trasmettere l'infezione, con diffusione spesso epidemica, agli altri pazienti del centro, allo staff dialitico, ad altri operatori della sanità e ai loro stessi familiari (1). Le infezioni sono una delle principali cause di morbilità e mortalità degli uremici, essendo responsabili del 20% delle morti in questa popolazione (2-5).

L'1.9% di tutte le morti dei dializzati sono attribuibili a sequele di epatiti virali (6).

L'incidenza di epatiti virali nei centri dialisi, assai elevata fino agli inizi degli anni '70, ha subito un declino negli ultimi 20 anni (1).

A ciò hanno contribuito il miglioramento delle strategie di controllo delle infezioni (incluse le misure di segregazione dei pazienti), la profilassi con Ig normali e iperimmuni e con la vaccinazione anti-epatite B, il perfezionamento delle procedure di disinfezione dell'ambiente e delle apparecchiature dialitiche (7).

Nonostante tutto ciò, numerosi dializzati mostrano tutt'oggi degli aumenti transitori o permanenti delle transaminasi.

Epidemie di epatite HBsAg-negative furono già segnalate sul finire degli anni '60 (8, 9). La prima in assoluto, riconosciuta retrospettivamente, fu quella che colpì 29 dei 68 dializzati del Charing Cross Hospital di Londra tra il '68 e il '70 (10).

Nel '75 fu la prima coparsa su Lancet il termine "epatiti non-A, non-B" (NANB) e già allora fu documentato come queste epatiti potessero cronicizzarsi (11).

Fin dai primi anni '70 l'epatite

NANB fu messa in relazione a pregresse terapie trasfusionali (12).

Nel '79, però, alcuni Autori dimostrarono che la trasmissione della malattia poteva non essere correlata a trasfusioni di sangue o emoderivati (13).

La diagnosi veniva posta solo "per esclusione" di altre epatopatie virali (HBV, HAV, CMV, EBV), tossiche o metaboliche (14).

Sin dal 1980 l'European Dialysis and Transplant Association (EDTA) aveva distinto analiticamente l'incidenza annuale di epatiti da HBV, HAV e NANBV.

In quell'anno la prevalenza di epatite NANB era del 17% tra i pazienti e del 9% negli staff. Nei successivi 5 anni una riduzione progressiva delle infezioni da HBV fu accompagnata da una crescita dei casi di NANB, fino al 34%, con una incidenza media di più di 700 nuovi casi/anno (1).

L'identificazione nel 1989 di uno dei virus responsabili dell'epatite

NANB, cui fu dato il nome di virus C (HCV), rese disponibile un test (ELISA C100-3) per la ricerca di anticorpi anti-HCV (15, 16).

L'HCV è oggi considerato il maggiore responsabile di epatiti NANB, sia post-trasfusionali (oltre il 90% dei casi) che sporadiche (circa il 60%) (17-19).

I soggetti colpiti presentano una evoluzione in epatopatia cronica in oltre il 50% dei casi e in cirrosi in almeno il 20% (20, 21).

La sieroprevalenza nei donatori di sangue è dello 0.3-1.4% (22, 23) mentre non sono disponibili dati sicuri sulla popolazione generale (si presume sia attorno all'1%).

Popolazioni riconosciute a rischio sono:

- emofilici e politrasfusi (24-27): 64-85%
- tossicodipendenti per uso di droghe endovenose (24, 26, 28): 48-81%
- omosessuali maschi (24, 28): 8-15%
- epatopatici cronici per:
  - cirrosi criptogenetica (24, 29-31): 8-82%
  - cirrosi alcolica (24, 31, 32): 24-47%
  - cirrosi biliare primitiva (24, 29): 7-33%
  - epatite cronica attiva autoimmune (24, 29, 33, 34): 5-60%
  - epatite cronica da HBV (30, 31): 11-29%
  - insufficienza epatica fulminante (35): 29%
  - epatocarcinoma (29, 31, 32, 36): 26-75%
- trapiantati d'organo (37, 38): 20-48%
- dializzati

La diagnostica si avvale attualmente sia di test di screening ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) e RIBA (Recombinant Immuno-Blot Assay) di I genera-

zione a 1 o 2 antigeni (C100-3, 5-1-1), sia di test ELISA e RIBA di II generazione a 3 o 4 antigeni (C22-3, C33c, C100-3, 5-1-1). I test ELISA utilizzano uno spettrofotometro, che misura l'intensità della colorazione del campione. Il risultato viene determinato confrontando la densità ottica con un valore limite. I campioni con valori di assorbanza inferiore al valore del cut-off sono considerati negativi (non reattivi), quelli con assorbanza superiore al cut-off positivi (reattivi). Nei test RIBA, invece, i singoli antigeni ricombinanti dell'HCV vengono immobilizzati come bande singole su striscie di nitrocellulosa. A fine esame, su ciascuna striscia compaiono delle bande la cui intensità cromatica è proporzionale alla quantità di anticorpo fissato. I test RIBA, quindi, svelano la presenza dei singoli anticorpi (anti-C100-3, anti 5-1-1, anti-C22-3, anti-C33c). Confrontando l'intensità delle colorazioni con quella di due controlli interni alla striscia (livello 1 e 2), si può distinguere tra risultati positivi, negativi e indeterminati. I test di II generazione presentano alcuni vantaggi (39):

- maggiore sensibilità (più precoce evidenziazione degli anticorpi);
- maggiore specificità (sia nelle popolazioni ad alto che a basso rischio);
- minore incidenza di campioni indeterminati (rispetto al RIBA 1);
- studio dei patterns antigenici (RIBA 2);
- elevata correlazione con lo stato di infettività (pazienti PCR polymerase chain reaction-positivi per l'HCV RNA).

La prevalenza dell'HCV nella popolazione dialitica è variabile, con notevoli differenze geografiche, tra lo 0% e il 46.7% (media 15-25%)

con i test di I generazione (24, 26, 28, 40-47, 49-59). Dati preliminari con test di II generazione mostrano, invece, una prevalenza media quasi raddoppiata (98, 99; comunicazioni al Convegno "Epatiti virali e rene", Ancona 14.9.91).

Sono state ritrovate correlazioni con il numero di trasfusioni (40-42), l'età dialitica (42-47), l'elevazione delle ALT (42, 44-46) e la positività per altri markers virali (HBsAg, HBcAb) (43, 46).

Quelle più sicure sembrano essere l'età dialitica e l'elevazione delle transaminasi, mentre sono sempre più numerosi gli Autori che negano la correlazione con le trasfusioni. In tal senso, l'impiego sempre più estensivo della r-HuEPO dovrebbe ridurre solo di poco la comparsa di nuovi casi di epatite C.

Rimane irrisolto il problema di cosa fare di questi pazienti.

Come considerarli? Dove trattarli? Su questo punto non c'è accordo tra i vari Autori.

Alcuni sono decisamente interventisti, favorevoli all'isolamento in sezioni contumaciali simili a quelle già esistenti per i portatori del virus B (48, 49); altri si attestano su posizioni più o meno interlocutorie (50).

Nel complesso, non si può negare che:

- ① l'isolamento di questi pazienti (come già attuato efficacemente per i portatori di HBsAg) si scontra con ovvie difficoltà pratiche (50);
- ② l'infettività dell'HCV sembra essere inferiore a quella dell'HBV (39, 50);
- ③ tutti i test attualmente disponibili, sia di I che di II generazione, hanno dei limiti; nessuno è completamente attendibile e interpretabile (39, 60, 61).

● RIBA 1 sembra essere meno sensibile dell'ELISA 1 e pertanto non può rappresentare un test di conferma ideale (39).

Inoltre, molti sieri ELISA 1(+) si rivelano "indeterminati" (una sola banda reattiva) in RIBA 1, ed il significato biologico e clinico di tale pattern è tuttora sconosciuto (39), pur ritenendosi che l'associazione RIBA (ind) ed elevazione delle transaminasi (in particolare delle ALT) sia altamente predittiva di epatite C (84).

Nonostante ciò, il RIBA 1 è più specifico dell'ELISA 1 nel predire l'infettività, ed ha anche permesso di ipotizzare una relazione eziologica tra l'infezione da HCV e certe forme di epatite cronica che non si pensava correlate ad infezioni virali, quali l'epatite cronica attiva autoimmune (78) e alcune forme di epatite cronica in pazienti alcolizzati (79).

Il RIBA 2, da parte sua, sembra risolvere il problema dei risultati "indeterminati" e dei "falsi negativi" propri dei test di I generazione (57, 60) e, secondo alcuni Autori (80-82), discriminerebbe tra soggetti infettivi e non infettivi, risultando utile nello screening dei donatori di sangue ELISA 1 (anti-C100-3)-positivi.

● Falsi positivi e falsi negativi.

Ci sono incertezze circa la specificità dei test ELISA nei pazienti con artrite reumatoide (62), epatite cronica attiva autoimmune (33, 67), paraproteinemie (gammopatie monoclonali, crioglobulinemie miste essenziali) (63, 64) o portatori di anticorpi isolati anti-SOD (superossido dismutase) (65).

Queste reazioni, verosimilmente "falsamente positive", sono caratterizzate da una lettura ottica relativamente bassa e sono rare nei gruppi ad alto rischio (39)

La loro frequenza aumenta significativamente nelle popolazioni a basso rischio (ad esempio donatori di sangue).

Di conseguenza, mentre l'anti-HCV scoperto in un paziente con epatite post-trasfusionale, in un tossicodipendente per uso di droghe endovenose, in un emofilico o in un dializzato è probabilmente un "vero" anticorpo virale, la probabilità che la reazione sia specifica è inferiore anche del 50% in un donatore di sangue o in un paziente con epatopatia cronica di origine non virale (autoimmune, alcolica, metabolica) (39).

I test di conferma RIBA I e II dovrebbero teoricamente, almeno in parte, by-passare questo problema.

In definitiva, nei gruppi "non a rischio" (ad esempio donatori di sangue) i test di I generazione, soprattutto ELISA, sovrastimano la prevalenza di anti-HCV (falsi positivi) e i test di II, soprattutto RIBA, ne riducono drasticamente la frequenza (80, 83, 84).

Nei gruppi "a rischio", invece, come ad esempio i dializzati, i test di I generazione sottostimano le positività (falsi negativi) e i test di II ne aumentano di molto (fino al 50% e oltre) la prevalenza.

● L'intervallo tra esposizione al virus e comparsa degli anticorpi (periodo finestra) è in media di 15 settimane (range 4-32) (18) ma può superare i 6-12 mesi (16, 66).

Se ne deduce che, in assenza di significativi aumenti delle transaminasi, si corre sempre il rischio di non isolare in tempo utile tutti i pazienti potenzialmente infettivi.

In tali casi possono risultare utili i test RIBA II perché l'anti-C22-3 degli ELISA I nella infezione acuta, riducendo la fase finestra di negatività della sierologia e permet-

tendo così una diagnosi più precoce (39).

Ancor più utile, in tal senso, sembra essere la PCR (polymerase chain reaction), che rivelerebbe l'infezione entro 2 settimane dal contatto col virus (66).

● Non si può escludere la presenza di infezioni a bassa carica virale, in cui, per scarsa sensibilità dei test, non si riescono a rilevare gli anticorpi (19, 39, 51).

● Sebbene sia prudente considerare tutti i portatori di anti-HCV come potenzialmente infettivi, il valore diagnostico degli attuali test, presi isolatamente e non nel contesto clinico, rimane tutt'oggi da determinare, in quanto non permettono di discriminare realmente tra pazienti infettivi e pazienti immuni, tra infezione presente e attiva o infezione pregressa (cicatrice immunologica) (46, 68).

Sembra, comunque, che il ritrovare l'anticorpo in associazione con l'elevazione delle transaminasi (e, ancor più, con altri fattori di rischio) sia altamente predittivo di infezione (42, 44-46).

● i test identificano solo uno degli agenti dell'epatite NANB (50, 69)

④ I cosiddetti test di conferma (neutralizzazione e RIBA) sono in effetti solo dei test di "pseudoconferma" (39, 61).

I veri test di conferma sono rappresentati dall'isolamento dell'RNA virale con la tecnica della PCR (già disponibile) oppure dalla estrazione diretta dal sangue degli antigeni virali (non ancora possibile) (61). Probabilmente a causa di una concentrazione sierica estremamente bassa (39).

D'altra parte, recenti segnalazioni indicano come antigeni virali sia non strutturali (86) che strutturali

(87) possano essere evidenziati con metodiche immunoistochimiche in fegati infettati.

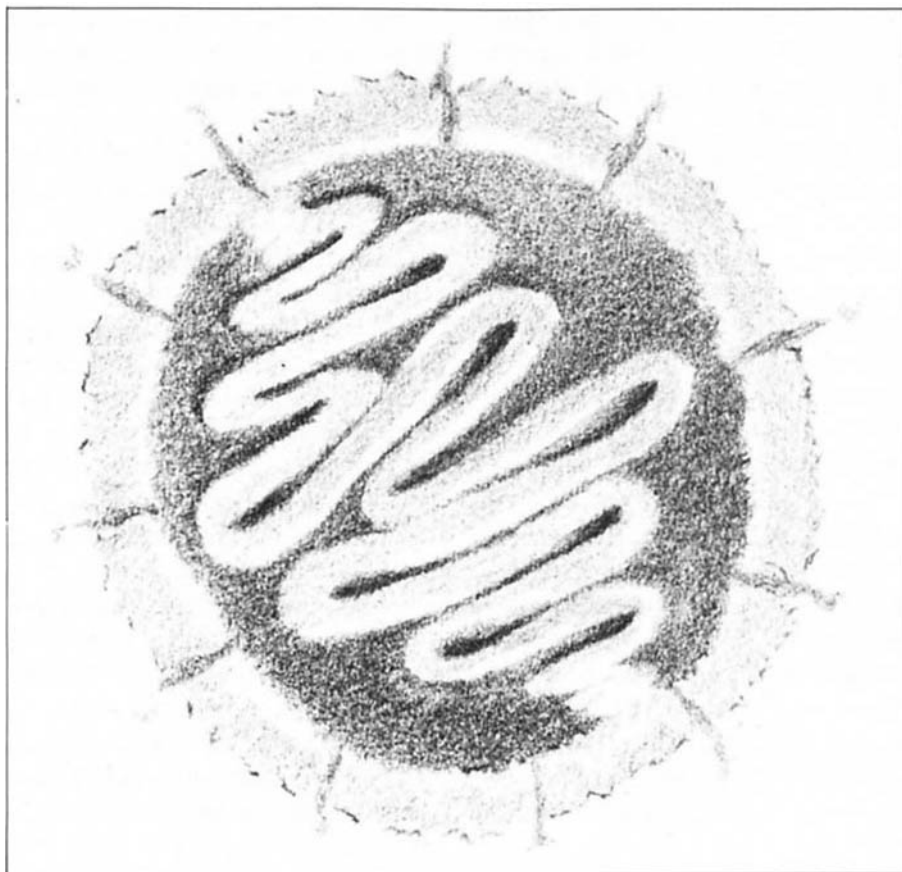
La tecnica della PCR, descritta per la prima volta nel 1985 (70) ha rappresentato una rivoluzione nel campo della Biologia Molecolare e della Genetica Umana in quanto permette di ottenere rapidamente un gran numero di copie di una qualsiasi regione di acido nucleico (con metodica di amplificazione) di cui si conoscano almeno piccole sequenze agli estremi (71, 72).

L'utilizzazione di questa tecnica sta rapidamente diventando una necessità per ogni laboratorio sia di ricerca che di diagnostica che voglia essere al passo con i tempi.

Si tratta del metodo di scelta per quasi ogni problema riguardante la scoperta di quantità estremamente piccole di acido nucleico. Oltre ad essere di rapida esecuzione, possiede un alto grado di sensibilità e di specificità. Può essere eseguita su qualsiasi tessuto o liquido corporeo e non richiede una risposta anticorpale.

L'uso della PCR è di particolare interesse nella scoperta di agenti infettivi (batteri, funghi, parassiti, virus) e rende obsolete alcune tradizionali procedure diagnostiche (ad esempio l'ibridazione diretta). Recenti segnalazioni indicano che l'RNA dell'HCV, scoperto tramite la PCR, è un migliore predittore di infettività rispetto agli anticorpi (39, 60, 73-76), potendo essere messo in evidenza anche in sieri anti-HCV(-) di gruppi ad alto rischio (88). La PCR potrebbe anche essere utilizzata come test di terzo livello in caso di risultati indeterminati in II generazione (60).

L'HCV RNA sarebbe, in definitiva, il marker cruciale per stabilire una diagnosi precoce e per discriminare tra infezione pregressa o attuale sia nei pazienti con pattern



**Fig. 1**

anticorpali persistenti che in quelli con patterns fluttuanti nel tempo (85).

In più, la PCR avrebbe valore diagnostico: la clearance ematica dell'HCV RNA si correlerebbe con la risoluzione della malattia, mentre la persistenza di livelli dosabili dell'acido nucleico virale predirebbe la progressione in cronicità dell'epatopatia (85).

Non è comunque da sottovalutare la possibilità di falsi positivi della PCR (dovuti alla contaminazione del campione da parte di altri agenti infettivi) e di falsi negativi (cattiva processazione del campione o viremia solo transitoria dell'HCV (60).

La possibilità di associare l'esecuzione della PCR ai test anti-HCV permette di ipotizzare svariate si-

tuazioni clinico-laboratoristiche (76).

In caso di soggetti PCR(+)/anti-HCV(-), potremmo trovarci di fronte a:

- false positività della PCR, se la tecnica non è stata eseguita correttamente (inquinamenti virali)
- pazienti che non si sono sierconvertiti agli antigeni del virus presenti negli attuali test anti-HCV
- pazienti portatori di titoli anticorpali troppo bassi per poter essere svelati dagli attuali kit (è ben nota l'incapacità degli uremici sia di produrre che di mantenere significative concentrazioni anticorpali in risposta a stimoli infettivi)
- pazienti che hanno perso gli anti-

corpi, pur continuando ad essere portatori del virus (e quindi infettivi).

Nel caso, invece, di soggetti PCR(-)/anti-HCV(+), potremmo avere a che fare con:

- false positività dell'anti-HCV

- pazienti sicuri portatori di epatite cronica NANB, con rilascio intermittente di particelle virali nella circolazione sistemica.

Quest'ultima ipotesi sarebbe in accordo con le fluttuazioni periodiche delle transaminasi di molti pazienti affetti da epatite C (o comunque NANB), che potrebbero rappresentare periodi di attiva replicazione virale.

5) La prevalenza di portatori di anticorpi nel personale d'assistenza delle sale dialisi (1.1-3.7%) non sembra essere particolarmente più elevata di quella dei donatori volontari di sangue della stessa area geografica e di quella dell'altro personale ospedaliero (47, 49, 59, 66). In particolare, un Autore (59) segnala una prevalenza dell'1.1% in 90 membri di staff dialitici il 52.2% dei quali era stato contaminato dal sangue di pazienti infetti tramite punture accidentali d'ago o contatti con lesioni cutanee.

Un altro Autore (66) riporta una prevalenza del 3.7% in personale medico incorso in punture con aghi contaminati. Gli staff dialitici non costituiscono, quindi, gruppi a rischio di infezione.

6) Sebbene la trasmissione del virus C sia in genere parenterale, un numero significativo di epatiti non-A, non-B sono dovute a contatti non parenterali, di tipo orizzontale, quali i rapporti sessuali e contatti interfamiliari di tipo non sessuale (66, 89-96).

In conclusione, tanto è stato fatto ma molto resta ancora da fare.

Già nell'87 i Centers for Disease Control (CDC) di Atlanta avevano elencato delle precauzioni universali per la prevenzione della trasmissione delle infezioni virali (97) ma ciò non ha limitato il diffondersi dell'epatite C.

Un punto che resta da elucidare è il possibile contagio dei circuiti interni delle apparecchiature dialitiche. Utile potrebbe rivelarsi il tentativo di dializzare i portatori del virus su apparecchiature specifiche, separate da quelle dei pazienti anti-HCV(-), pur nell'ambito dello stesso ambiente di trattamento, come già del tutto recentemente proposto o attuato, con incoraggianti risultati, da alcuni Autori (43; comunicazioni al recente convegno di Ancona su Epatiti virali in Dialisi e al IX Congresso della Sezione Piemonte e Valle d'Aosta della Società Italiana di Nefrologia - 26.10.91). Identico atteggiamento potrebbe essere riservato a pazienti che presentano aumenti ingiustificati delle alanino-aminotransferasi (ALT): ciò è già stato messo in pratica in un centro statunitense (51). Anche la pratica del riutilizzo dei filtri viene ritenuta una manovra a rischio di trasmissione dell'HCV (47).

Alcuni Autori ritengono, comunque, indispensabile l'isolamento dei pazienti anti-HCV(+) in locali contumaciali, simili a quelli già esistenti per i portatori dell'HBV (49, 52, 56).

Tutto ciò, unito a migliori procedure di disinfezione delle apparecchiature dialitiche (amuchina tra un turno e l'altro, sterilizzazione a caldo a fine giornata, formaldeide nel giorno di riposo), a stretto controllo dei pazienti (misurazioni periodiche delle ALT/AST e dei markers virali) e a sempre più accurate misure igienico-profilattiche, dovrebbe poter

condurre ad una minor incidenza dell'infezione (51, 52).

Nonostante il gran numero di pubblicazioni che compariranno nel prossimo futuro sull'argomento, l'impressione è che l'HCV continuerà, almeno per qualche tempo ancora, a sfidare l'abilità dei ricercatori e ad eludere le aspettative dei medici.

## Bibliografia

1. Crosnier J, Degos F, Jungers P. Dialysis associated hepatitis. In: Maher JF, ed. Replacement of Renal Function by Dialysis, ed 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1989; 42: 881-903.
2. Keanne WF, Raij LR. Host defences and infectious complications in maintenance hemodialysis patients. In: Drukker W, Parsons FM, Maher JF, eds. Replacement of Renal Function by Dialysis, ed 2. Boston, Nijhoff, 1983; 648-58.
3. Ruiz P, Gomez F, Schreiber A. Impaired function of macrophage FcY receptors in end-stage renal disease. N Engl J Med 1990; 322: 717-22.
4. Tolkoff-Rubin N, Rubin R. Uremia and host defense. N Engl J Med 1990; 322: 770-2.
5. Degast G, Howen B, Van der Hem K. T-lymphocyte number and function and the course of hepatitis B in hemodialysis patients. Infect Immun 1976; 14: 1138-45.
6. Jacobs C, Brunner C, Hantler C, et al. Dialysis, transplantation, nephrology; Robinson B, ed. Proc 14th Congr EDTA 1977.
7. Alter MJ, Favero MS, Maynard JE. Impact of infection control strategies on the incidence of dialysis-associated hepatitis in the United States. J Infect Dis 1986; 153: 1149-51.
8. Eastwood JB et al. Hepatitis in a

- maintenance hemodialysis unit. *Ann Intern Med* 1968; 69: 59-66.
9. Coleman JC, et al. Hepatitis and epidemic hepatitis associated antigen (HEAA) in a hemodialysis unit with observations on haemoglobin levels. *Br J Urol* 1972; 44: 194.
  10. Simon N, Mèry JP, Trèpo C, Vitvitsky L, Couroucè AM. A non-A non-B hepatitis epidemic in a HB antigen free haemodialysis unit. Demonstration of serological markers of non-A non-B virus. *EDTA Proc.* 1980; 17: 173-8.
  11. Galbraith RM et al. Non-A, non-B hepatitis associated with chronic liver disease in a haemodialysis unit. *Lancet* 1975; i: 951-3.
  12. Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. Recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85: 439-62.
  13. Avram MM, Feinfeld DA, Gan AC. Non-A, non-B hepatitis: a new syndrome in uraemic patients. *Proc EDTA* 1979; 16: 141-7.
  14. Alter MJ. Non-A, non-B hepatitis: Sorting through a diagnosis of exclusion. *Ann Intern Med* 1989; 110: 583-5.
  15. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a c-DNA clone derived from bloodborne viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
  16. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibody to a major aetiological virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 262-4.
  17. Brechot C. Les virus "non-A non-B" ont trouvé leur identité. *La Press Medicale* 1990; 34: 1567.
  18. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-500.
  19. Alter MJ, Sampliner RE. Hepatitis C and miles to go before we sleep. *Ne Engl J Med* 1989; 321: 1538-40.
  20. Alter HJ. Chronic consequences of non-A, non-B hepatitis. In: Seeff LB, Lewis JH, eds. *Current perspectives in Hepatology*. New York, Plenum Medical Books, 1989; 83-97.
  21. Dienstag JL, Alter HJ. Non-A non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 67-81.
  22. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46: 423-41.
  23. Contreras M, Barbara JAJ. Screening for hepaatitis C virus antibody. *Lancet* 1989; ii: 505.
  24. Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; ii: 294-7.
  25. Ludlam CA, Chapman D, Cohen B, Litton PA. Antibodies to hepatitis C virus in haemophilia. *Lancet* 1989; ii: 560-1.
  26. Roggendorf M, Deinhardt F, Rasshofer R, et al. Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet* 1989; ii: 324-5.
  27. Rumi MG, Colombo M, Gringeri A, Mannucci PM. High prevalence of antibody to hepatitis C virus in multitransfused hemophiliacs with normal transaminase levels. *Ann Intern Med* 1990; 112: 379-80.
  28. Mortimer PP, Cohen BJ, Litton PA, et al. Hepatitis C virus antibody. *Lancet* 1989; ii: 798.
  29. Katkov WN, Dienstag JL, Cody H. Role of hepatitis C virus in non-B chronic liver disease. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1548-52.
  30. Sánchez-Tapias JM, Barrera JM, Costa J, et al. Hepatitis C virus infection in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Ann Intern Med* 1990; 112: 921-4.
  31. Bruix J, Calvet X, Costa J, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 2: 1004-6.
  32. Vargas V, Castells L, Esteban JI. High frequency of antibodies to the hepatitis C virus among patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Intern Med* 1990; 112: 232-3.
  33. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive results? *Lancet* 1990; 335: 754-7.
  34. Lenzi M, Johnson PJ, McFarlane IG, et al. Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet* 1991; 338: 277-80.
  35. Yanagi M, Kaneko S, Unoura M, et al. Hepatitis C virus in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991; 324: 1895-6.
  36. Colombo M, Choo QL, Del Ninno E, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 2: 1006-8.
  37. Read AE, Donegan E, Lake J, et al. Hepatitis C in patients undergoing liver transplantation. *Ann Intern Med* 1991; 114: 282-4.
  38. Ponz E, Campistol JM, Bruguera M, et al. Hepatitis C virus infection among kidney transplant recipients. *Kidney Int* 1001; 40: 748-51.
  39. Alberti A. Diagnosis of hepatitis C. Facts and perspectives. *J Hepatol* 1991; 12: 279-82.
  40. Gilli P, Moretti M, Soffritti S, et al. Non-A, non-B hepatitis a and anti-HCV antibodies in dialysis patients. *Int J Artif Organs* 1990; 13: 737-41.
  41. Tamura I, Kobayashi Y, Koda T. Hepatitis C virus antibodies in haemodialysis patients. *Lancet* 1990; 335: 1409.
  42. Mondelli MU, Cristina G, Filice G, Rondanelli EG, Piazza V, Barbieri C. Anti-HCV positive patients in dialysis units? *Lancet* 1990; 336: 244.
  43. Elisaf M, Tsianos E, Mavridis A, Dardamanis M, Pappas M, Sia-

- mopoulos KC. Antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV) in haemodialysis patients: association with hepatitis B serological markers. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 476-9.
44. Schlipkoter U, Roggendorf M, Ernst G, et al. Hepatitis C virus antibodies in haemodialysis patients. *Lancet* 1990; 335: 1409.
  45. Yamaguchi K, Nishimura Y, Kukuoka N, et al. Hepatitis C virus antibodies in haemodialysis patients. *Lancet* 1990; 335: 1409-10.
  46. Kallinowski B, Theilmann L, Gmelin K, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Nephron* 1991; 59: 236-8.
  47. Hsien-Hong L, Chiu-Ching H, I-Shyong S, Deng-Yn L, Yun-Fan L. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in the hemodialysis unit. *Am J Nephrol* 1991; 11: 192-4.
  48. Marchesi D, Arici C, Poletti E, Mingardi G, Minola E, Mecca G. Outbreak of non-A, non-B hepatitis in centre hemodialysis patients: a retrospective analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1988; 3: 795-9.
  49. Casati S, Graziani G, Giachino G, Rumi MG. L'epatite C in dialisi: epidemiologia e proposte di intervento. In: D'Amico G, Bazzi C, Colasanti G, eds. Milano. Attualità nefrologiche e dialitiche '90. Wichtig editore, 1991; 255-61.
  50. Gilli P, Moretti M, Soffritti S, Menini C. Anti-HCV positive patients in dialysis units? *Lancet* 1990; 336: 243-4.
  51. Jeffers LJ, Perez GO, De Medina MD, et al. Hepatitis C infection in two urban hemodialysis units. *Kidney Int* 1990; 38: 320-2.
  52. Zeldis JB, Depner TA, Kuramoto IK, Gish RG, Holland PV. The prevalence of hepatitis C virus antibodies among hemodialysis patients. *Ann Intern Med* 112: 958-60.
  53. Grob P, Joller M, Jelmelka H. Hepatitis C virus (HCV), anti-HCV und non-A, non-B hepatitis. *Schweiz Med Wochenschr* 1990; 120: 117-24.
  54. Getzug T, Lindsay K, Brezina M, et al. Hepatitis C virus antibody in hemodialysis patients: prevalence and risk factors. *Gastroenterology* 1990; 8: 1395.
  55. Laufs R, Polywka S, Kruger W, et al. Hepatitis-C-Virus antikörper bei hepatitis-patienten und risikogruppen. *Dtsch Arztebl* 1989; 50: 23-4.
  56. Almroth G, Ekermo B, Franzen L, Hed J. Antibody responses to hepatitis C virus and its modes of transmission in dialysis patients. *Nephron* 1991; 59: 232-5.
  57. Leon A, Cantòn R, Elia M, Mateos M. Second-generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection. *Lancet* 1991; 337: 912.
  58. Gilli P, Bergami M, Soffritti S. Considerazioni sulla presenza di pazienti anti-HCV positivi nei centri dialisi. *Giorn Ital Nefrol* 1990; 7: 271-2.
  59. Di Maggio A, Montemurro NE, Marangi AL, et al. Prevalence of hepatitis C antibodies in hemodialysis patients and staff. A preliminary study. *J Nephrol* 1991; 2: 83-7.
  60. Fagan EA. Testing for hepatitis C virus. *BMJ* 1991; 303: 535-6.
  61. Editorial. The A to F of viral hepatitis. *Lancet* 1990; 336: 1158-60.
  62. Theilmann L, Blazek M, Goeser T, Gmelin K, Kommerell B, Fiehn W. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989; 335: 1346.
  63. Boudart D, Lucas JC, Muller JY, Le Carrer D, Planchon B, Harousseau JL. False positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinaemia. *Lancet* 1990; 336: 63.
  64. Casato M, Taliani G, Pucillo LP, Goffredo F, Laganà B, Bonomo L. Cryoglobulinaemia and hepatitis C virus. *Lancet* 1991; 337: 1047-8.
  65. Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Kurokawa K. Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335: 1345-6.
  66. Cotton P. Tests help nail down HCV – but not entirely. *JAMA* 1991; 265: 312.
  67. Gray JJ, Wreghitt TG, Friend PJ, Wight DGD, Sundaresan V, Calne RY. Differentiation between specific and non-specific hepatitis C antibodies in chronic liver disease. *Lancet* 1990; 335: 609-10.
  68. Editorial. Hepatitis C virus upstanding. *Lancet* 1990; 335: 1431-2.
  69. Bradley DW, Maynard JE, Popper H, et al. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* 1983; 148: 254-65.
  70. Saiki RK, Scharf S, Fallovna F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
  71. Brèchot C. Polymerase chain reaction. A new tool for the study of viral infections in hepatology. *J Hepatol* 1990; 11: 124-9.
  72. Peter JB. The polymerase chain reaction: amplifying our options. *RID* 1991; 13: 166-71.
  73. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 1419-22.
  74. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335: 1-3.
  75. Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K, Kuno K, Murakami S, Hattori N. Detection of serum hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1990; 335: 976.
  76. Cristiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Hepatology* 1991; 14: 51-5.

77. Ebling F, Naukkari R, Liikola J. Recombinant immunoblotting assay for hepatitis C virus as predictor of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 982-3.
78. Fusconi M, Lenzi M, Baraldini G, et al. Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and in primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1990; 336: 822-3.
79. Brillanti S, Masci C, Siringo S, et al. Serological and histological aspects of hepatitis C virus infection in alcoholic patients. *J Hepatol* 1991 (in stampa).
80. Van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337: 317-9.
81. Bassetti D, Cutrupi V, Dallago B, Alfonsi P. Second-generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection. *Lancet* 1991; 337: 912.
82. Ebeling F, Naukkarinen R, Myllylä G, Leikola J. Second generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection. *Lancet* 1991; 337: 912-3.
83. Weiner AJ, Truett MA, Rosenblatt J, et al. Hepatitis C virus testing in low risk population. *Lancet* 1990; 336: 695.
84. Alberti A, Chemello L, Cavalletto D, et al. Antibody to hepatitis C virus and liver disease in volunteer blood donors. *Ann Intern Med* 1991; 114: 1010-12.
85. Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 98-104.
86. Alberti A, Cavalletto L, Rugge M, et al. Detection of hepatitis C virus in liver of patients with non-A, non-B hepatitis. *Proceedings II Int. Symposium on HCV. Los Angeles, November 1990*; 45.
87. Krawczynski K, Beach M, Di Bisceglie A, et al. Hepatocellular HCV-associated antigen and antibody: viral specificity and relation to natural history of infection. *Hepatology* 1990; 12: 905.
88. Simmonds P, Zhang LQ, Watson HG, et al. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs, and drug users. *Lancet* 1990; 336: 1469-72.
89. Melbye M, Biggar RJ, Wantzin P, Krogsgaard K, Ebbesen P, Becker NG. Sexual transmission of hepatitis C virus: cohort study (1981-9) among European homosexual men. *Br Med J* 1990; 301: 210-2.
90. Tor J, Llibre JM, Carbonell M, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus and its relation with hepatitis B virus and HIV. *Br Med J* 1990; 301: 1130-3.
91. Tedder RS, Gilson RJC, Briggs M, et al. Hepatitis C virus: evidence for sexual transmission. *Br Med J* 1991; 302: 1299-302.
92. Alter MJ. Inapparent transmission of hepatitis C: footprints in the sand (editorial). *Hepatology* 1991; 14: 389-91.
93. Hess G, Massing A, Rossol S, Schutt H, Clemens R, Meyer zum Buschenfeld KH. Hepatitis C virus and sexual transmission. *Lancet* 1989; ii: 987.
94. Kamitsukasa H, Harada H, Yakura M, et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1989; ii: 987.
95. Ideo G, Bellati G, Pedraglio E, et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335: 353.
96. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990; 264: 2231-5.
97. Update: Universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other blood-borne pathogens in health-care settings. *JAMA* 1988; 260: 462-5.
98. Beccari M, d'Aloja G, Rizzolo L, et al. Ricerca di anticorpi anti-HCV con test di II generazione in pazienti dializzati. XI Convegno della Sezione Tosco-Ligure della Società Italiana di Nefrologia. *Alassio, Ottobre 1991 (in stampa)*.
99. Canavese C, Pacitti A, Thea A, et al. Discrepancies in results of different methods employed to detect antibodies against hepatitis C virus in dialysis patients. (Abstract) XXVIII Congress of the EDTA, Rimini Novembre 1991.