



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE NEFROLOGICHE**

(MED/14)

XIX Ciclo

**Coordinatore: Prof. Sergio Stefoni**

**UTILITA' DELLA BIOPSIA EPATICA NELLA  
VALUTAZIONE DI IDONEITA' AL TRAPIANTO DI  
RENE DEL PAZIENTE CON INFEZIONE DA VIRUS C**

Relatore:

**Chiar.mo Prof. Giovanni Cancarini**

Dottorando:

**Dott. Paolo Maiorca**

**- ANNO ACCADEMICO 2005-2006 -**

## **INDICE**

1. INTRODUZIONE.....pag.	2
2. SCOPO DELLO STUDIO..... pag.	36
3. PAZIENTI E METODI.....pag.	37
4. RISULTATI.....pag.	41
5. DISCUSSIONE.....pag.	53
6. CONCLUSIONI.....pag.	60
7. BIBLIOGRAFIA.....pag.	61

# INTRODUZIONE

## ***1. Il virus dell'epatite C***

### *1.1 Struttura del virus*

Il virus dell'Epatite C, è un virus a RNA, classificato nella famiglia degli Hepacivirus, appartenente al genere dei Flaviviridae (1). Identificato nel 1989 da Choo e collaboratori (2), fu riconosciuto come il principale responsabile di quella patologia fino ad allora conosciuta come epatite non-A e non-B (2).

Il virus è composto da un involucro sferico (envelope) e da un nucleocapside di circa 50-60 nm di diametro, all'interno del quale è contenuto il genoma (3).

Il genoma virale è formato da una singola catena a struttura lineare di RNA a polarità positiva (in grado di fungere direttamente da RNA messaggero), composta da circa 9500 nucleotidi che codificano per una singola glicoproteina di 3011 aminoacidi. Quest'ultima viene sottoposta ad una serie di clivaggi proteolitici ad opera di proteasi codificate sia dal virus sia dall'ospite, che portano alla formazione di 10 proteine, alcune strutturali (componenti di envelope e nucleocapside), altre non strutturali, con funzioni enzimatiche deputate al controllo della replicazione virale.

La regione aminotermine della poliproteina contiene le proteine del core e le due proteine dell'envelope (E1 ed E2). Due regioni all'interno di E2 (regioni ipervariabili HVR1 e HVR2) mostrano un'estrema variabilità di sequenza. Sulla base del grado di tale variabilità sono oggi conosciuti 10 tipi di virus C ed almeno 100 sottotipi. Oltre alle regioni ipervariabili, la regione E2 contiene anche il sito CD81 o binding site, che riveste il ruolo di recettore o corecettore per il legame delle cellule virali con gli epatociti e i linfociti B, che sono le cellule bersaglio del virus C (4).

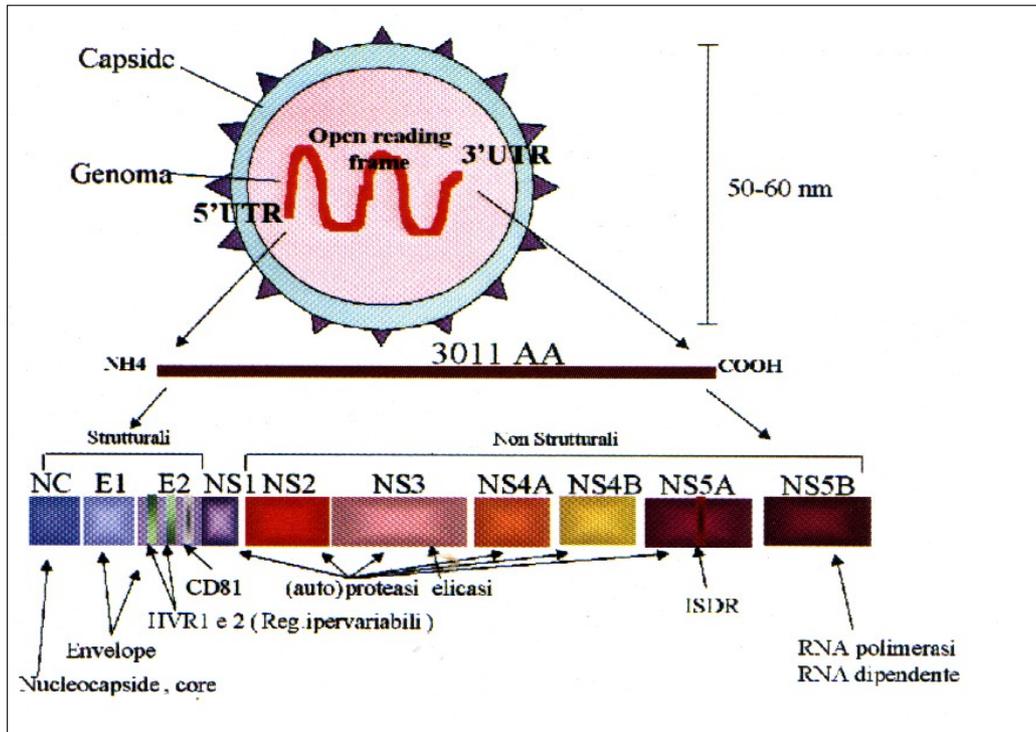


Figura 1. Espressione poliproteica del genoma del virus C

Alle proteine non strutturali è assegnata la funzione di proteasi (NS2, NS3, NS4A), elicasi (NS3) e RNA polimerasi RNA-dipendente (NS5B). Questa polimerasi, che ha il compito di replicare il genoma, è sprovvista della funzione di protezione della trascrizione. Questo rende conto dei frequenti errori di trascrizione, responsabili delle continue mutazioni virali che si verificano all'interno dello stesso ospite.

I virus mutanti hanno un'elevata omologia genomica (95%), ma si differenziano per le caratteristiche antigeniche delle proteine dell'envelope, codificate dalle regioni ipervariabili di E2 e vengono denominati "quasispecies". E' lo sviluppo delle quasispecies che conferirebbe al virus la capacità di sfuggire alle difese immunitarie dell'ospite, giustificando l'elevata percentuale di cronicizzazione della malattia (5).

Infine, all'interno della proteina NS5A vi e' una regione che sembra essere correlata con la risposta alla terapia con interferone alpha (interferon-sensitivity-determining region o ISDR)

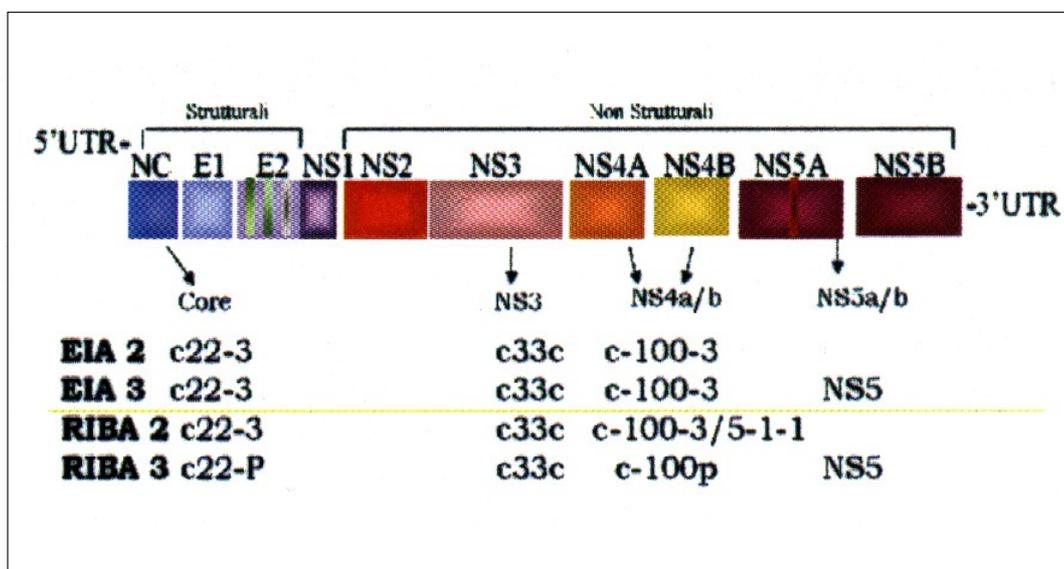


Figura 2. Schema della sequenza genetica del virus C.

## 2. Epidemiologia

Oltre 170 milioni di persone nel mondo sono cronicamente infetti dal virus dell'epatite C. Tale infezione rappresenta una vera e propria pandemia, le cui dimensioni sono almeno cinque volte maggiori di quelle dovute al virus dell'HIV-1 (5). L'infezione da epatite C può essere contratta a qualsiasi età con un picco di incidenza tra i 20 e i 40 anni ed una lieve predominanza del sesso maschile (6). Anche la prevalenza nella popolazione generale ha un picco tra i 30 e i 50 anni e nel sesso maschile (7), attestandosi mediamente intorno al 1-2%. Esistono però enormi variazioni in base ai diversi fattori di rischio presenti nelle diverse popolazioni studiate (8).

In Europa tra i donatori di sangue la prevalenza è pari allo 0.32% e si stimano circa 4-5 milioni di soggetti infetti nella sola sua parte Occidentale. In Asia nella popolazione generale varia dal 0.5 al 3% (8); stime più recenti indicano una prevalenza di infezione superiore al 10% in diverse aree del globo tra cui Asia, Sud America ed Africa (9). Emblematico è il caso dell'Egitto, in cui è registrato il maggior numero di infezioni con una media nella popolazione generale del 22%, ma con punte di anti HCV positività che in alcune regioni arrivano fino al 28% e nelle regioni a minor prevalenza non scendono mai al di sotto del 6%. Questa elevata prevalenza sembra essere correlata alla terapia per via parenterale praticata in queste zone contro la schistosomiasi (10).

Negli stati Uniti la prevalenza media anticorpale per HCV nella popolazione generale è stimata intorno al 1.8% e quella nei volontari donatori di sangue è 0.5%.

Sebbene le conoscenze acquisite nell'ultimo decennio sul virus C e sui suoi meccanismi di diffusione abbiano prodotto in alcune zone dei paesi civilizzati una riduzione della sua incidenza (ad esempio in alcune coorti di popolazione degli USA si è passati dal 15 al 2.5%), si stima che la prevalenza continuerà ad aumentare almeno per i prossimi 15 anni.

In Italia la prevalenza nella popolazione generale adulta oscilla tra l'1,5 ed il 3% (1, 4) con un gradiente decrescente dal Sud al Nord del Paese (11).

La distribuzione geografica dei 6 principali genotipi, secondo la classificazione di Chan e Simmonds, è la seguente:

- 1a e 1b: Stati Uniti (Nord America), Europa occidentale, Sud America;
- 2a-2b-2c: Giappone, Europa occidentale, Nord America;
- 3: Europa occidentale, Nord America;
- 4: Africa, Medio Oriente;

- 5: Sud-Est Asiatico, Sud Africa;
- 6: Sud Africa, Estremo Oriente.

In Europa ed in America i più comuni genotipi sono l'1a e l'1b, seguiti dal 2 e 3. Gli altri genotipi non sono mai stati riscontrati in queste aree ma sono comuni in Egitto (genotipo 4), in Sud Africa (genotipo 5) e nel Sud Est Asiatico (genotipo 6) (12).

In Italia i genotipi più diffusi sono l'1b (40%) e il 2a-2c (40%). Il restante 20% dei casi è costituito dai genotipi 1a, 3a e 4.

Trasmissione dell'infezione e principali fattori di rischio.

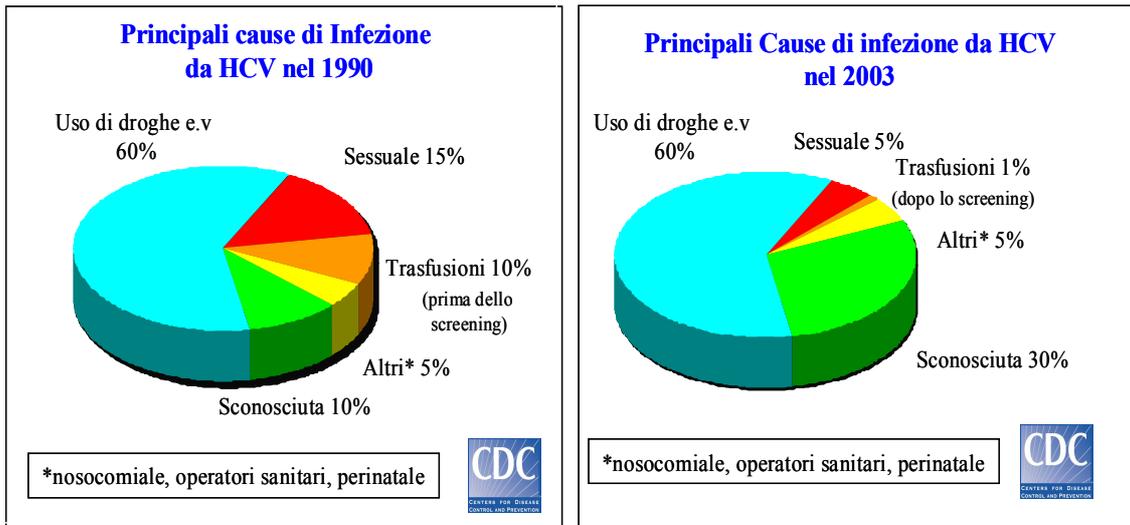
Il virus C è trasmesso per via parenterale. Le principali vie di trasmissione conosciute sono:

- **trasfusionale, per trapianto, tossicodipendenza.** Dagli anni ottanta ad oggi il rischio di acquisire l'HCV per via trasfusionale si è pressoché azzerato. Si è passati da un rischio superiore al 50% nel 1985, ad uno attualmente stimato intorno allo 0.001% unità trasfuse. Lo stesso dicasi per i trapianti di organi/tessuti. La tossicodipendenza per via endovenosa rimane invece il più importante fattore di rischio (13).
- **nosocomiale:** oggi la trasmissione nosocomiale da HCV è possibile solo per inosservanza delle tecniche di controllo della diffusione delle infezioni (precauzioni standard). Le popolazioni a più alto rischio di contagio sono quelle dei reparti di emodialisi, rianimazione e cardiocirurgia (14).

- **occupazionale:** è di scarsa rilevanza, visto che la prevalenza dell'infezione in infermieri, medici, vigili del fuoco, appartenenti alle forze dell'ordine e volontari non è superiore a quella nella popolazione generale (1-2%) (8).
- **sessuale:** questa via di trasmissione rappresenta in realtà una via inefficace, forse per una bassa concentrazione dei virus nei tessuti e nei fluidi genitali o forse per la mancanza di un target cellulare del virus nel tratto genitale. Ad ogni modo la coinfezione col virus HIV-1 ne fa aumentare il rischio (9).
- **perinatale:** la trasmissione materno-fetale è poco frequente e riguarda soprattutto madri HIV-1 positive (10).

In sintesi, negli ultimi 10-15 anni le modalità di trasmissione del virus si sono modificate. Nei paesi sviluppati il rischio di trasmissione del virus attraverso la trasfusione di emoderivati ed il trapianto di organi infetti è considerato trascurabile. Anche la trasmissione perinatale, domestica, sessuale ed occupazionale risulta sempre più limitata. Rimane invece elevata l'incidenza di trasmissione attraverso la condivisione di siringhe (tossicodipendenza), ed in minor misura attraverso altre vie di esposizione percutanee e/o mucose.

Oggi i dati mostrano un aumento dei casi in cui non è riconoscibile alcun fattore di rischio conosciuto di trasmissione della malattia: dal 10 al 50% a seconda dell'area geografica (fig. 3) (15, 16).



Modificata

Figura 3. Modifica nel tempo delle cause di infezione da virus C pubblicata dal Center for Disease Control and prevention nel 2003.

### 3. Storia naturale e diagnosi dell'infezione HCV

#### 3.1 Diagnosi dell'infezione da HCV

I test diagnostici per l'infezione da HCV sono divisi in test sierologici per la determinazione degli anticorpi e test molecolari per particelle virali.

I test di screening per la determinazione degli anticorpi anti HCV hanno notevolmente ridotto il rischio post-trasfusionale di infezione. Dopo la comparsa degli anticorpi i pazienti rimangono generalmente sieropositivi. Tuttavia dati recenti indicano che il titolo di anticorpi anti HCV decrescono gradualmente nel tempo nei soggetti in cui l'infezione si risolve spontaneamente. In una coorte di soggetti con una documentata sorgente e tempi di infezione conosciuti, la determinazione degli anticorpi anti HCV diventava negativa dopo 18-20 anni in 18 di 43 soggetti con clearance spontanea della viremia (17). E' probabile che la vera incidenza di epatite acuta HCV con clearance spontanea sia stata sottostimata, dato che non tutti i soggetti infetti hanno evidenza sierologica persistente di infezione.

Il test sierologico di screening di prima generazione era un metodo immunoenzimatico di cui sono state preparate tre consecutive versioni, sempre più sensibili. I test di II e III generazione in uso, anch'essi immunoenzimatici, contengono proteine del core e le proteine non strutturali 3 e 4 e 5 e sono in grado di evidenziare gli anticorpi da quattro a dieci settimane dopo l'infezione.

In una popolazione a basso rischio tali test hanno percentuali bassissime di falsa negatività (0.5-1%) (18). I falsi negativi sono più frequenti tra i soggetti immunocompromessi, come i pazienti HIV-1 positivi (19), i pazienti con insufficienza renale ed i pazienti affetti da crioglobulinemia mista HCV correlata (20).

I test di immunoblot ricombinante sono stati usati per confermare la positività ai test immunoenzimatici. Si utilizzano antigeni simili, ma in formato immunoblot, così che si possano individuare le risposte alle singole proteine. Il test è considerato indeterminato in caso di risposta ad un singolo antigene, positivo se a due o più.

Negli anni passati sono stati introdotti nuovi test, basati sulla determinazione di molecole dell'RNA virale. Tali test possono essere suddivisi in qualitative e quantitative.

I test qualitativi sono basati sulla tecnica della Polimerase Chain Reaction (PCR) ed hanno un limite di sensibilità di poco più di 100 copie di HCV RNA/ml (21). Questi sono i test di scelta per la conferma della viremia e per seguire la risposta terapeutica.

Sono disponibili diversi metodi per determinare il genotipo virale dell'HCV (22), molti basati sull'amplificazione con PCR. La genotipizzazione virale aiuta a predire i risultati terapeutici ed influenza la scelta terapeutica (23, 24).

Un importante test di laboratorio non specifico, poco costoso e disponibile in ogni laboratorio per identificare l'epatopatia, è la determinazione dei livelli di Alanino-

Amino-Transferasi (ALT). Attualmente questo test risulta essere il migliore per monitorare l'infezione da HCV e l'efficacia della terapia negli intervalli tra due test molecolari. Tuttavia nelle persone con infezione da HCV i livelli di ALT possono essere normali o fluttuanti, quindi un singolo valore normale non esclude infezione, progressione della malattia epatica o addirittura cirrosi (25). Così pure la normalizzazione delle ALT durante la terapia antivirale non dimostra il successo della terapia stessa. D'altra parte i livelli di ALT possono rimanere elevati per altri motivi anche dopo la clearance del virus.

### *3.2 Caratteristiche cliniche e storia naturale della malattia*

L'infezione da HCV è diagnosticata molto raramente durante la fase acuta, poiché nella maggior parte dei casi non si hanno sintomi. Quando presenti, le manifestazioni cliniche si hanno generalmente entro 7-8 settimane (range 2-26) dall'esposizione al virus. Durante questo periodo sono stati descritti anche rari casi di epatite fulminante (26). I sintomi dell'epatite acuta sono, quando documentati, ittero, malessere, astenia, nausea (25).

Il 15-30% dei soggetti con epatite acuta da HCV va incontro ad una clearance spontanea del virus (27), tuttavia si stima che dal 74 all'86% dei pazienti vadano incontro ad una cronicizzazione dell'infezione e presentino una viremia persistente (28, 29).

La storia naturale della malattia è molto difficile da chiarire a causa del "silenzio sintomatico" della fase acuta e della paucisintomaticità dell'inizio della fase cronica, che spesso si rivela molto lunga: l'intervallo tra infezione e sviluppo di cirrosi epatica può arrivare fino a 30 anni.

Dai dati degli studi prospettici e retrospettivi svolti finora si possono trarre alcune conclusioni: l'infezione acuta, come già detto, esita in infezione cronica nella maggior parte dei pazienti e, una volta cronicizzata, la clearance spontanea della viremia è rara. La maggior parte delle infezioni croniche esitano in epatite e fibrosi di diverso grado, che si possono accompagnare a sintomi relativamente aspecifici come la stanchezza (30, 31). L'intervallo di tempo in cui evolvono i vari stadi di malattia epatica è molto variabile. Il 20% dei pazienti con epatite cronica da virus C avranno cirrosi dopo vent'anni (25). Una volta che si instaura la cirrosi il rischio di epatocarcinoma (HCC) va dall'1 al 4% ogni anno (5). Sebbene raramente, l'HCC può verificarsi anche in assenza di cirrosi. In un terzo dei casi non si ha progressione per oltre trentanni (32).

I principali fattori di rischio per la progressione della malattia sono: consumo di alcool, età avanzata al momento dell'infezione, sesso maschile, coinfezione con altri virus.

Non sono state invece dimostrate differenze significative tra i vari genotipi nel grado di aggressione epatica. Si stima che, indipendentemente dal genotipo, circa il 50% degli epatociti vada incontro all'aggressione del virus ospitandolo cronicamente al loro interno. La presenza di linfociti nel parenchima epatico è stata interpretata come evidenza di danno immunomediato.

L'infezione da HCV può dare anche manifestazioni extraepatiche, nella maggior parte dei casi associate a patologie autoimmuni o linfoproliferative, indotte dalla presenza del virus C nelle cellule linfoidi.

### *3.3 Diagnosi istologica*

La valutazione istologica della biopsia epatica rimane il gold standard per la determinazione dell'attività dell'epatopatia HCV correlata. Il dosaggio quantitativo dell'HCV RNA non è un indicatore preciso del danno epatico contrariamente allo staging istologico che rimane il solo predittore attendibile della prognosi e della probabilità di progressione (33). Boletis e collaboratori (34) hanno chiaramente evidenziato che non c'è correlazione tra il grado di danno istologico ed il numero di coppie virali presenti nel siero dei pazienti affetti da epatite cronica HCV correlata. Lo stesso può essere affermato per i livelli sierici di transaminasi (35).

Esistono diversi score che permettono di classificare il danno in base alla presenza o meno di ben specifiche lesioni a carico del parenchima epatico.

Nel 1981, Knodell propose un indice numerico di valutazione del danno epatico, detto HAI (Histological Activity Index), basato su diversi elementi, tra cui la necrosi cellulare intralobulare, la necrosi della parte periferica del lobulo epatico, l'infiammazione intraepatica, la fibrosi (36). In base a questi elementi, le epatiti croniche furono divise in lobulari, persistenti e attive, e si ritenne a lungo che solo queste ultime evolvessero in cirrosi. In tempi più moderni, e soprattutto dopo la scoperta della epatite C, fu chiaro che anche le altre due forme potevano evolvere, e che il limite dell'HAI era di valutare contemporaneamente sia l'attività (indice della intensità della distruzione cellulare e della infiammazione intraepatica) che la fibrosi, indice della evoluzione a cirrosi e della cicatrizzazione.

Ishak, pertanto nel 1994, propose un nuovo sistema, basato su grading (valutazione del danno, della attività, della infiammazione, della necrosi) e staging

(valutazione della fibrosi e della evolutività verso la cirrosi). Il grading massimo è 18, lo staging massimo è 6 (37).

Il grading è una "fotografia" di ciò che sta accadendo in quel momento, lo staging è un "film" di ciò che è accaduto negli anni precedenti.

In altre parole un'epatite con grading 10 e staging 1 è una forma florida, "calda", ma non evoluta a cirrosi, data la minima cicatrizzazione; un grading 1 e staging 0 è una forma minima; un grading 2 o 3 e staging 6 è una cirrosi conclamata la cui attività va spegnendosi.

In base al nuovo sistema di Ishak, le epatiti croniche sono oggi divise in minime (grading 0-3), miti (4-8), medie (9-12), severe (12-18).

L'analisi istologica del danno epatico risulta essere indispensabile in alcuni casi ed estremamente opportuna in altri.

La biopsia epatica può essere considerata indispensabile nei seguenti casi:

- in caso di ipertransaminasemia da causa ignota o nel caso di coesistenza di più patologie epatiche come HCV ed emocromatosi.
- ipertransaminasemia con anti-HCV positivi e HCV RNA negativo per capire se si tratta di una fase di non replicazione virale con presenza virale nel fegato.

La biopsia è consigliata anche in casi in cui il quadro clinico è chiaro (transaminasi elevate, anti-HCV positivo, viremia in PCR positiva) perché non vi è correlazione fra transaminasi e danno epatico ed il dato istologico può essere determinante nelle successive decisioni terapeutiche.

Ad esempio la presenza di cirrosi epatica istologica (cioè di noduli e di fibrosi severa) è un criterio predittivo di scarsa risposta all'Alpha Interferone (IFN- $\alpha$ ). In

assenza di un dato istologico si potrebbe erroneamente decidere di iniziare una terapia con IFN destinata a sicuro insuccesso. Pertanto l'analisi istologica è generalmente raccomandata per l'inquadramento generale dei pazienti con infezione cronica da HCV (25).

#### ***4. Cenni di terapia nella popolazione generale***

La terapia con IFN- $\alpha$  fu utilizzata già dagli anni ottanta, prima dell'identificazione dell'HCV quale agente eziologico delle epatiti non A non B, e spesso comportava la normalizzazione delle transaminasi in molti pazienti. Tuttavia, anche dopo la scoperta del virus C, l'alta frequenza di recidive rendeva necessario un nuovo trattamento che spesso si dimostrava inefficace. Negli anni seguenti sono stati utilizzati diversi tipi di Interferone, ma tutti con simili risultati (38).

Solo con l'introduzione della terapia combinata IFN- $\alpha$  e Ribavirina si è assistito ad un incremento dei risultati con una probabilità di risposta positiva alla terapia di circa il 50% (39, 40).

Il successo terapeutico può essere misurato sia in termini di risposta biochimica (normalizzazione delle ALT) che in termini di risposta virologica, cioè la negativizzazione dell'HCV RNA alla PCR qualitativa.

La risposta istologica e' stata considerata come fondamentale in molti trial clinici, tuttavia nella pratica clinica solo raramente si ricorre ad una biopsia post trattamento per decidere l'efficacia o meno della terapia.

La risposta terapeutica è valutata alla fine del trattamento e sei mesi dopo (risposta protratta). Soggetti che mostrano una risposta virologica protratta hanno un'alta probabilità di avere anche una durevole risposta biochimica ed istologica (41).

#### *4.1 Terapia dell'infezione acuta*

I dati riguardanti l'efficacia del trattamento dell'infezione acuta sono molto limitati, anche perché l'infezione è raramente diagnosticata nella fase acuta. Molti soggetti hanno una clearance spontanea del virus, pertanto la terapia in questi soggetti potrebbe non essere necessaria (42).

Tuttavia, data l'alta percentuale di progressione verso la cronicizzazione (e la limitata efficacia nell'infezione cronica) il trattamento della fase acuta può acquisire una grande importanza.

Un trattamento precoce anche con solo IFN- $\alpha$  sembra poter avere un'elevata efficacia (43), ma non è ancora ben chiaro il regime terapeutico ottimale.

#### *4.2 Terapia dell'infezione cronica*

Teoricamente tutti i pazienti con infezione cronica anti HCV sono candidati alla terapia antivirale (38). Tuttavia, dato il lento corso dell'infezione, deve essere valutato sempre il rapporto rischi benefici. L'indicazione principale al trattamento è la positività dell'HCV RNA, associata a livelli di ALT costantemente elevati ed una biopsia epatica che mostra fibrosi o moderata necrosi ed infiammazione. Questi soggetti hanno un elevato rischio di progressione della malattia ed il trattamento è fortemente raccomandato in assenza di controindicazioni (38). Anche soggetti con ALT elevate e solo minima o moderata infiammazione potrebbero essere trattati, ma in questo caso il rischio di progressione è basso ed un follow-up con ripetuti controlli di ALT ed una biopsia epatica a tre o cinque anni rappresenta una valida alternativa al trattamento (38).

I soggetti con valori di ALT costantemente normali e nessuna o minima evidenza di infiammazione o necrosi hanno una prognosi eccellente anche senza terapia (44).

Soggetti con cirrosi epatica compensata sono meno candidati ad una risposta protratta alla terapia, ma alcuni studi hanno suggerito che anche in assenza dell'eradicazione dell'HCV, i pazienti trattati possono presentare una più lenta progressione verso lo scompenso epatico e verso l'epatocarcinoma (HCC) (5, 45). La terapia combinata sembra aumentare la percentuale di responder nei cirrotici (39, 40) ma non sono ancora chiari gli esatti benefici ed il corretto regime terapeutico da adottare. L'alta incidenza di effetti collaterali, specie la neutropenia e la trombocitopenia, richiedono in tali soggetti un'attenzione particolare.

I soggetti con malattia scompensata non sono mai candidati alla terapia e le loro condizioni possono addirittura peggiorare con l'uso dell'Interferone associato o meno alla Ribavirina (43).

#### *4.3 Regime terapeutico iniziale*

La percentuale di soggetti che rispondevano all'IFN- $\alpha$  fu inizialmente pari al 40%, con una risposta a lungo termine inferiore al 20% (39, 40). Ciò vale soprattutto per i pazienti infetti che presentano genotipo 1a o 1b. Due grossi trial prospettici hanno dimostrato che la terapia combinata con IFN- $\alpha$  e Ribavirina aumentava la percentuale di successi dal 16 al 40%. La risposta era massima dopo 20 settimane in pazienti con genotipo 2 o 3 ed in quelli con bassa carica virale, mentre richiedeva 48 settimane di trattamenti nel caso di genotipo 1 ed in quelli con elevata carica virale (39, 40, 46). Da ciò si deduce che la durata del trattamento dovrebbe essere funzione del genotipo virale e della carica virale, oltre che dell'età, del sesso e del risultato istologico della biopsia epatica.

La Ribavirina è un analogo sintetico della guanosina e sembra inibire l'attività dell'RNA polimerasi RNA dipendente attraverso una deplezione intracellulare del pool guanosinico ed interferendo col processo di capping dell'RNA. Il suo effetto antivirale si completa agendo anche come immunomodulatore, promuovendo lo switch dei linfociti T da TH2 (che sostiene la persistenza del virus) a TH1 (che ne induce invece la clearance). Il più severo effetto collaterale della ribavirina è un'anemia emolitica dose dipendente, che compare nel 20% circa dei casi. La severità dell'anemia può rendere necessaria la sospensione del farmaco mantenendo l'IFN- $\alpha$  in monoterapia (43).

L' Interferone Pegilato deriva dall'attacco di un glicole polietilenico all'INF Alpha (INF Alpha pegilato 2a e 2b). Questo ne aumenta l'emivita e la durata dell'attività terapeutica. La modalità di somministrazione del farmaco è settimanale, non più trisettimanale, la dose è calcolata sulla base del peso corporeo e, secondo recenti trial, questo nuovo trattamento ha incrementato la percentuale di responder rispetto alla convenzionale monoterapia con IFN- $\alpha$ , soprattutto se in terapia combinata con Ribavirina (25, 46-48).

#### *4.4 Trattamento delle recidive*

Il 49% dei pazienti che recidivano dopo monoterapia con IFN- $\alpha$  mostrano una risposta superiore alla terapia combinata con ribavirina rispetto ad un secondo trattamento con IFN- $\alpha$ , con percentuali di successo fino al 30% dei non responder alla monoterapia.

Secondo le linee guida internazionali, la risposta virologica al trattamento combinato deve essere valutata dopo 24 settimane: i pazienti che non presentano una negativizzazione dell'HCV-RNA dovrebbero essere considerati non responder e

pertanto interrompere la terapia; i soggetti responder sospenderanno o proseguiranno il trattamento per altre 24 settimane a seconda che presentino o meno un genotipo 2 o 3.

Un trattamento prolungato con Peg Interferon rappresenta un'altra opzione terapeutica, soprattutto nei pazienti con controindicazioni all'uso della ribavirina (46). I pazienti che presentano recidive anche dopo la terapia combinata non dovrebbero più essere trattati, ma solo monitorati (46).

### ***5. Andamento clinico in dialisi***

Nella popolazione dialitica la prevalenza di HCV positività è stimata intorno al 20-30% (49, 50) ed è più frequente nei pazienti in dialisi extracorporea rispetto ai pazienti in dialisi peritoneale o domiciliare. In Italia la prevalenza dei pazienti con anticorpi anti HCV è circa il 18%, in progressiva riduzione rispetto ai primi anni novanta.

La storia naturale dell'infezione da HCV nella popolazione in dialisi è difficile da delineare, sia per la difficoltà di individuare il momento del contagio, sia perchè l'infezione decorre spesso in modo asintomatico ed evolve molto lentamente. Inoltre, nei pazienti uremici i livelli di transaminasi sono usualmente ridotti (51) e questo rende difficoltoso riconoscere l'epatopatia tramite gli esami biochimici. A questo si aggiunge l'esiguità di biopsie epatiche eseguite nella popolazione dializzata, per definizione ad elevato rischio di complicanze emorragiche, e l'aumentata mortalità nei dializzati rispetto alla popolazione generale, che ostacola periodi di osservazione protratti.

Ad ogni modo il decorso dell'infezione da HCV nella popolazione in dialisi sembra essere molto lento ed asintomatico a causa, sia dell'immunodepressione conferita dall'uremia, che attenua la distruzione degli epatociti infetti da parte

dell'ospite, sia della procedura dialitica, che abbassa la viremia attraverso la sintesi endogena di Interferone.

L'infezione sembra cronicizzare in un numero molto elevato di dializzati. Uno studio osservazionale francese durato 12 anni, evidenzia come il 69.2% dei pazienti anti HCV positivi avevano  $\gamma$ GT persistentemente elevate in combinazione con livelli di ALT normali (38%) o aumentati (30%) (52). Pochi studi sono supportati da un numero sufficiente di biopsie epatiche che, peraltro, hanno fornito risultati poco consistenti causa la scarsità di informazioni sul momento del contagio non permettendo di valutare l'eventuale nesso tra istologia epatica e durata dell'infezione (53-55).

Un end point affidabile nella storia naturale dell'HCV e' sicuramente la mortalità. E' stato ripetutamente riportato che la mortalità dovuta ad epatopatia e' molto bassa (1-2%) nei dializzati (34). L'intervallo di tempo che separa la data del contagio dallo sviluppo di complicanze quali cirrosi o HCC molto spesso supera l'aspettativa media di vita di molti dializzati. I pazienti HCV positivi in dialisi cronica decedono con l'infezione piuttosto che a causa dell'infezione. Si stima che l'intervallo di tempo necessario per lo sviluppo di cirrosi ed HCC sia rispettivamente di 21 e 29 anni, intervallo sicuramente più lungo della sopravvivenza media di un paziente in dialisi.

Tuttavia, recenti studi hanno rimesso in discussione i precedenti assunti. I dati che emergono da un'analisi del Registro Lombardo di Dialisi e Trapianto (56) confermano che l'incidenza di cirrosi epatica è molto bassa, ma la mortalità nei dializzati con cirrosi è circa il 35% più alta rispetto ai dializzati senza cirrosi. Questi dati sono stati confermati in uno studio del gruppo di Seattle (57). Nakayama et al. si spingono oltre, affermando che la mortalità e' significativamente maggiore nei dializzati anti HCV positivi, rispetto a quelli anti HCV negativi. Un'analisi multivariata ha evidenziato

come l'età, il diabete mellito e la positività per anticorpi anti HCV siano indipendenti fattori di rischio di morte in dialisi (39).

Si suppone che l'accresciuto rischio di morte in questi pazienti possa essere il risultato combinato delle anomalie del sistema immunitario indotte dall'uremia e dall'epatopatia cronica (53, 58, 59).

Alcuni studi osservazionali hanno infine mostrato una frequenza più elevata di cirrosi ed insufficienza epatica nei pazienti dializzati anti-HCV positivi o anti HCV/HBsAg positivi rispetto ai sieronegativi, così come il rischio di sviluppare HCC sembra essere più elevato nei dializzati rispetto alla popolazione generale (53).

## ***6. Andamento clinico dopo trapianto di rene***

### ***6.1 Prevalenza di HCV nella popolazione trapiantata di rene***

La prevalenza di HCV nei pazienti portatori di trapianto renale varia dal 6% al 46% a seconda del centro e dell'area geografica considerata (58). L'analisi epidemiologica dei maggiori studi è stata eseguita mediante test immunoenzimatici di seconda generazione (ELISA-2), che accertano la presenza di anticorpi rivolti contro gli antigeni del virus C (58). La prevalenza di positività per gli anticorpi anti-HCV è influenzata da vari fattori quali, etnia, tipo di dialisi (emodialisi versus dialisi peritoneale), durata della terapia sostitutiva prima del trapianto, fabbisogno trasfusionale, precedenti trapianti, positività per marcatori sierologici d'infezione da virus B e sensibilità/specificità dei test utilizzati per la diagnosi (58).

La frequenza di viremia in pazienti HCV-Ab positivi trapiantati di rene varia dal 74% al 92%, ed è persistente nella maggioranza dei casi (60). Non è invece chiara la frequenza di pazienti trapiantati renali HCV RNA positivi ma senza anticorpi anti-HCV.

In questi casi, l'assenza di anticorpi contro il virus C potrebbe essere legata ad un'incapacità di produrre una corretta risposta anticorpale, oppure alla presenza di anticorpi diretti contro antigeni virali attualmente non ancora testati.

La distribuzione del genotipo in una stessa regione geografica nei pazienti trapiantati segue quella della popolazione generale (1a 60%; 1b 24%; 2a 7%; 2b 12%; 3a 4%; 4 2%). Non c'è correlazione tra genotipo e score istologico o livello delle transaminasi (58).

### *6.2 Trasmissione del virus attraverso il trapianto da donatori infetti*

La maggior parte dei trapiantati renali con infezione da HCV diventano infetti prima del trapianto, allorché sono in dialisi, oppure, più raramente acquisiscono l'infezione attraverso il trapianto da donatori infetti (61). E' invece infrequente l'acquisizione di HCV dopo il trapianto (62, 63). Si deve tuttavia sottolineare una notevole variabilità nella frequenza di trasmissione del virus al ricevente (dal 43 al 100%) (64-67).

Tale eterogeneità può essere almeno in parte spiegata dai seguenti fattori:

- diversi livelli di viremia nell'organo donato (carica virale);
- diversa infettività del genotipo virale (virulenza);
- volume dell'organo e modalità di conservazione (percentuale più alta di trasmissione dove si usa la flush preservation rispetto alla perfusione pulsatile) (100);
- trasfusioni perioperatorie;
- differenze nei test diagnostici per la rilevazione dell'HCV positività;
- diversa suscettibilità del ricevente (65-69, 100).

Complessivamente tra i riceventi d'organo da donatori HCV-positivi:

- 35%(0-55%)sviluppano epatopatia post-trapianto;
- 50% (14-100%)diventano HCV-Ab positivi;
- 73% (14-96%) diventano HCV-RNA positivi (64)

Indubbiamente i pazienti HCV negativi che ricevono un rene da un donatore HCV positivo presentano un alto rischio di sviluppare una malattia epatica, compresa un'epatite fulminante ed un'epatite fibrosante colestatica (63, 64, 70). Pertanto è opinione comune che reni provenienti da donatori HCV positivi devono essere trapiantati solo in riceventi HCV positivi ed HCV RNA positivi.

### *6.3. Storia clinica dell'HCV nel post trapianto.*

La valutazione della storia naturale dell'infezione da HCV nei trapiantati renali è complicata da una serie di fattori: l'epatopatia da HCV è frequentemente asintomatica e le transaminasi sono un indice poco sensibile, spesso non correlato all'entità del danno epatico; inoltre i pazienti con insufficienza renale cronica hanno valori basali di transaminasemia inferiori alla popolazione generale (71). Di conseguenza, valori di transaminasi nel range di norma per la popolazione generale possono risultare elevati per i pazienti con trapianto renale ed insufficienza renale. Bisogna anche considerare che l'infezione evolve molto lentamente (fino a 4-5 decadi), con intervalli di tempo spesso superiori alla durata media del trapianto. La ridotta sopravvivenza dei pazienti trapiantati limita la possibile comparsa delle complicanze legate all'infezione.

I primi studi condotti su un follow-up di 3-5 anni non evidenziano differenze significative tra riceventi HCV positivi e HCV negativi, sia in termini di

sopravvivenza del rene e del paziente, sia in termini di frequenza e severità delle complicanze epatiche (88-90). I lavori più recenti (58, 72-76), condotti con tempi di osservazione più lunghi, dimostrano che i riceventi HCV positivi nella seconda decade post-trapianto presentano un maggior rischio di epatopatia, una peggior sopravvivenza sia del graft che del paziente stesso e riconoscono l'infezione da HCV come la più importante causa di epatopatia dopo trapianto di rene (dall'8% al 28% dei decessi risultano secondari ad insufficienza epatica).

L'analisi istologica epatica rimane fondamentale per accertare l'entità delle alterazioni indotte dal HCV, benché i pazienti con trapianto renale possano avere insufficienza renale cronica e le anomalie della coagulazione legate all'uremia possano rendere più rischiosa l'esecuzione della biopsia epatica. Gli studi basati sui dati istologici dimostrano come l'epatopatia HCV-correlata, dopo trapianto renale progredisca anche a fronte di una sostanziale stabilità clinico-laboratoristica (58, 77, 78).

Zylberberg et al. (79) hanno effettuato biopsie epatiche seriate in 28 pazienti HCV positivi con trapianto renale ed hanno confrontato l'andamento della epatopatia in 28 controlli con epatopatia cronica da HCV e funzione renale normale. Il periodo di osservazione era  $7,1 \pm 4,0$  e  $6,1 \pm 3,2$  anni rispettivamente. La progressione annua della fibrosi e dell'attività necroinfiammatoria era maggiore nel gruppo di studio rispetto al gruppo di controllo:  $0,26$  vs  $0,01$  ( $p < 0,01$ ) e  $0,26$  vs  $0,05$  ( $p < 0,03$ ). La mortalità per epatopatia era maggiore nei pazienti dopo trapianto rispetto ai controlli:  $10\%$  vs  $0\%$  ( $p < 0,05$ ).

Anche Vosnides et al. (80) segnalano che biopsie effettuate in pazienti trapiantati con movimento delle transaminasi documentavano la presenza di severa malattia epatica (epatite cronica attiva o cirrosi) in più del 20% dei casi biopsiati.

In un altro studio di Glicklich et al (99) che prevedeva biopsie seriate a tutti i pazienti trapiantati di rene HCV positivi, si evidenziò che l'epatite cronica era comune (cronica persistente nel 37%, cronica attiva nel 34%) e la cirrosi era infrequente (7%) (81). Il limite di questo lavoro sta nel fatto che le biopsie erano fatte poco dopo il trapianto.

Rao et al (35) hanno analizzato le caratteristiche morfologiche evolutive dell'epatite HCV correlata e la conseguente progressione clinica in 34 trapiantati di rene HCV-Ab positivi, seguiti per circa 4 anni di follow-up. Lo studio mostra come la progressione è strettamente legata al dato istologico di base (cioè presente al trapianto): pazienti con steatosi epatica o epatite cronica persistente non hanno mostrato segni di progressione, contrariamente a quelli con emosiderosi o epatite cronica attiva di grado lieve che progrediscono verso la cirrosi in un tempo relativamente breve (circa 4 anni) nel 60% dei casi. L'evoluzione cirrotica si avrebbe infine nel 100% dei casi di epatite cronica attiva di grado severo.

La stessa conclusione è tratta da Sandrini et al. (82), con un follow-up di circa 10 anni e biopsie seriate dei pazienti HCV-Ab positivi, che documenta una consistente progressione del danno morfologico. In particolare individua una progressione dell'epatite cronica attiva in tutti i pazienti, con una sopravvivenza a dieci anni pari al 91%. Nella storia clinica dell'epatite HCV correlata in pazienti trapiantati di rene devono essere considerati anche fattori non strettamente legati al virus ma alla storia clinica dei pazienti stessi:

- A. Momento di contrazione del virus, durata dell'epatopatia nel pre-trapianto e severità del danno istologico al trapianto (82, 100).
- B. Coinfezione HCV-HBV: la sopravvivenza in questi pazienti a 12 mesi sembra sovrapponibile a quella dei pazienti solo HCV positivi, ma il rischio di evoluzione verso la cirrosi è sensibilmente maggiore nei pazienti con coinfezione (26% vs 10%) (100, 101).
- C. Terapia immunosoppressiva: di per sé facilita la replicazione virale e la progressione del danno morfologico inibendo l'azione del sistema immunitario. Tuttavia sembra che alcuni farmaci influiscano più di altri sull'azione dannosa del virus; per esempio l'Azatioprina sembra correlata ad un maggior rischio di sviluppare epatite colestatica fibrosante. Questa rara ma severa forma di epatite si sviluppa principalmente nei pazienti con epatite B, ma recentemente è stata diagnosticata anche in trapiantati d'organo affetti da epatite C, soprattutto in terapia immunosoppressiva con Azatioprina ma anche con gli inibitori delle calcineurine. Sembra essere indotta da un effetto citopatico diretto del virus C sugli epatociti, supportato dal deficit immunitario farmaco-indotto. Morfologicamente è caratterizzata da diffusa fibrosi, infiltrati leucocitari e differenti gradi di colestasi; l'andamento clinico è molto rapido ed infausto con un incremento degli indici di colestasi fino all'insufficienza epatica (58, 83). Anche l'uso di anticorpi monoclonali e/o di farmaci antitimociti sembra essere associato ad una più rapida progressione dell'epatite.

In sintesi, i dati della letteratura sull'andamento dell'epatopatia HCV correlata nei pazienti trapiantati di rene sono i seguenti:

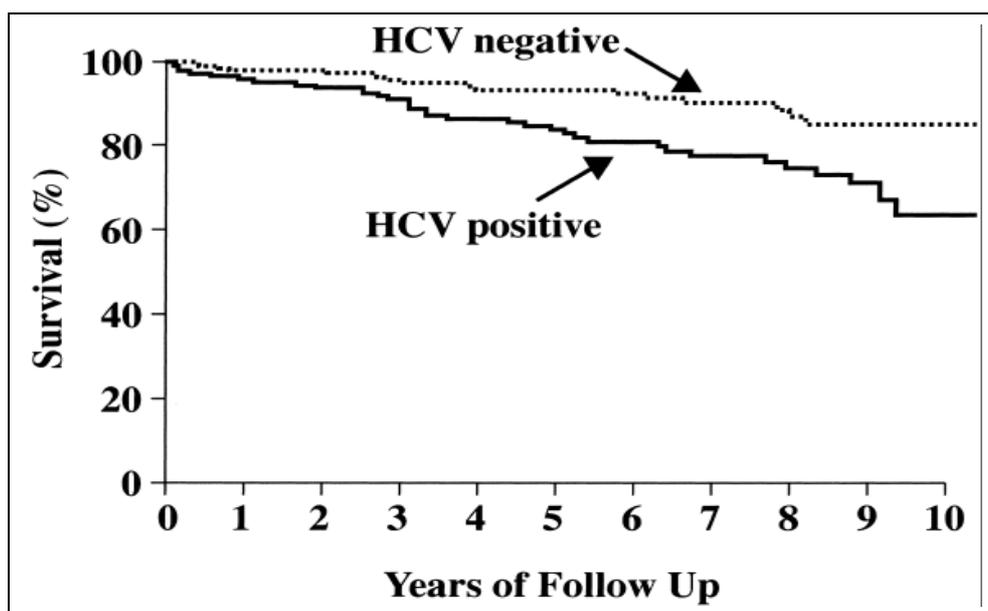
- il 20-60% hanno un'epatite cronica (transaminasi elevate per più di 6 mesi) (59, 84)
- il 70-95% hanno HCV-RNA nel siero (59)
- il titolo di HCV-RNA incrementa di 1,8-30,3 volte dopo il trapianto nei pazienti già HCV-RNA positivi prima del trapianto. Il titolo non correla con la gravità della malattia epatica (85).
- il 20-51% non presentano mai alterazioni delle transaminasi, nonostante l'HCV-RNA sia positivo, ma questo non significa che la malattia non progredisca sul piano istologico (86)
- più del 70% dei pazienti trapiantati HCV Ab positivi presenta un'epatite cronica (persistente nel 37% e attiva nel 34%) (87).
- circa il 7% di questi pazienti sviluppa cirrosi (39), ma la percentuale è verosimilmente destinata ad aumentare sensibilmente se si considerano pazienti con più di 20 anni di trapianto.
- il 19% dei pazienti presenta alterazioni istologiche minime o aspecifiche (87)
- una piccolissima percentuale di pazienti presenta epatite colestatica fibrosante (58, 83).

#### *6.4. Impatto dell'epatite C sulla sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato.*

Molte indagini hanno valutato l'impatto sulla sopravvivenza dopo trapianto renale legato alla presenza di HCV. La durata dell'osservazione si è rivelata cruciale nel valutare le conseguenze dell'infezione dopo il trapianto. Nei primi studi in cui il periodo di osservazione non superava usualmente i 5 anni, non si rilevava differenza significativa riguardo alla sopravvivenza tra individui HCV positivi vs negativi (72, 88-

90). Gli studi successivi, che sono stati elaborati con periodi di osservazione adeguati (fino a 20 anni), hanno rivelato differenze significative in termini di sopravvivenza del paziente trapiantato (41, 73-75), pur confermando che l'infezione da virus C non influenza significativamente l'esito del trapianto nei primi 5 anni.

La maggior parte di questi studi non ha mostrato una riduzione della sopravvivenza dei pazienti trapiantati HCV positivi nel primo decennio post trapianto rispetto ai trapiantati HCV negativi, ma l'andamento cambia nella seconda decade con una netta separazione delle curve di sopravvivenza tra i due gruppi, in accordo con la lenta evoluzione del danno epatico (75) (Figura 4).



*Figura 4. Curva di sopravvivenza a 10 anni dal trapianto di rene in due gruppi di pazienti, analoghi per età, sesso e terapia immunosoppressiva, uno HCV positivo e uno HCV negativo. La sopravvivenza era significativamente ridotta nei pazienti HCV positivi ( $P = 0.001$ ) (75).*

Già Pereira et al. avevano riportato nel 1997 un rischio relativo di morte aumentato di 3.3 volte nei pazienti trapiantati HCV positivi rispetto ai negativi (72). Hanafusa (91)

aveva confermato nel 1998 come la riduzione della sopravvivenza si potesse osservare soprattutto nella seconda decade e come essa fosse correlata alla mortalità da malattia epatica. L'HCV è stato perciò classificato come un fattore di rischio indipendente sulla sopravvivenza del paziente.

Nella tabella I sono riassunti i principali lavori apparsi in letteratura sull'argomento.

*Tabella I. HCV e sopravvivenza del trapianto e del paziente.*

Autore	Anno di Pubbl.	n° riceventi	Sopravvivenza paz		p	Sopravvivenza TX		p	Follow-up (aa)
			HCV pos	HCVneg		HCVpos	HCVneg		
Roth D (92)	1994	641	81 %	80 %	NS	63 %	63 %	NS	5
Ynares C (88)	1993	260	72 %	75 %	NS	52 %	52 %	NS	5
Fritsche (93)	1993	309	58 %	82 %	NS	32 %	53 %	0.05	8
Stempel (94)	1993	596	84 %	88 %	NS	59 %	59 %	NS	5
Aroldi (95)	2000	320	77 %	85 %	0.01	55 %	59 %	NS	14
Legendre (74)	1998	499	70 %	90 %	0.01	40 %	65 %	0.0001	17
Hanafusa (91)*	1998	280	64 %	88 %	0.05	36 %	64 %	0.05	20
Gentil (96)	1999	596	72 %	90 %	0.006	51 %	66 %	0.007	10
Mathurin(85)**	1999	834	65 %	80 %	0.001	49 %	63 %	0.0001	10
Bouthot (41)	1997	110	58 %	75 %	0.05	50 %	58 %	NS	8
Lee (97)	2001	477	76 %	83 %	NS	50 %	74 %	NS	10
Meier (75)	2001	73.707	69 %	69 %	NS	50 %	65 %	NS	8
Batty (98)***	2001	28.692	81 %	87 %	0.01				3

\* A 10 anni non vi erano differenze

\*\* A 5 anni non vi erano differenze

\*\*\* Cause di morte più frequenti: infezione (45%), cardiovascolare (33%), epatica (6%). Più alta ospedalizzazione nei pazienti HCV positivi

Nei pazienti HCV positivi dopo trapianto è stata evidenziata una più elevata mortalità da epatopatia (cirrosi, epatite colestatica fibrosante e carcinoma epatocellulare) rispetto ai soggetti HCV negativi. Nell'indagine retrospettiva di Bruchfeld (99) la mortalità per epatopatia era 7% (2/29) e 0% (0/171) (P=0,015) nei pazienti HCV positivi e negativi rispettivamente. Nella casistica di Legendre (74) la mortalità per epatopatia era 40% (6/15) nei pazienti HCV positivi vs 1,3% (1/19) nei

pazienti HCV negativi ( $P < 0,0001$ ). Hanafusa (91) ha osservato che la mortalità per insufficienza epatica era 28% (5/18) vs 0% (0/18) ( $P = 0,053$ ) nei pazienti HCV positivi rispetto a quelli HCV negativi dopo trapianto. Il grado ed il tipo di terapia immunosoppressiva sembrano influenzare la progressione della epatopatia; in particolare, l'impiego di anticorpi monoclonali rappresenta un importante fattore di rischio (60, 87, 100). L'Azatioprina invece si associa più frequentemente all'epatite colestatica fibrosante. Ne deriva che in questi pazienti la terapia immunosoppressiva deve essere modulata in funzione dell'andamento clinico e dei dati forniti dalla biopsia epatica.

Bouthot (41) attribuisce l'accresciuta mortalità nei pazienti HCV positivi dopo trapianto renale ad una più elevata frequenza di infezioni. D'altra parte già nel 1981 fu segnalata la comparsa di severe infezioni extraepatiche in pazienti trapiantati affetti da epatite non A non B. Dopo la scoperta dell'HCV un attento follow-up dei trapiantati HCV positivi ha mostrato un aumento delle infezioni potenzialmente fatali del sistema nervoso centrale ed a livello polmonare, soprattutto da CMV, TBC e Pneumocystis Carinii, con maggior rischio di sepsi rispetto alla popolazione trapiantata HCV negativa. È verosimile che la presenza del virus si associ all'azione immunosoppressiva dei farmaci alterando la risposta delle T-cell agli agenti infettivi.

L'infezione da HCV è stata anche associata ad una maggiore incidenza di diabete mellito dopo trapianto di rene o fegato (41, 101). Anche una più frequente insorgenza di glomerulonefriti nel post-trapianto sembra essere correlata all'infezione da HCV. Numerosi dati epidemiologici e sperimentali supportano l'associazione tra HCV e glomerulonefrite *de novo* da immunocomplessi (58). Hestin et al. (86) hanno mostrato una maggior frequenza di proteinuria dopo trapianto nei pazienti HCV positivi. La

casistica di Cruzado et al. (84) evidenzia una correlazione significativa tra HCV ed insorgenza *de novo* di glomerulonefriti post-trapianto.

L'impatto dell'infezione da HCV sulla sopravvivenza dell'organo trapiantato è ancora controverso. Alcuni autori associano la positività sierologia per HCV in modo indipendente e significativo con la perdita di funzione dell'organo trapiantato (102). La maggior parte degli autori sembra però non trovare differenze significative nella sopravvivenza dell'organo nei pazienti HCV positivi rispetto a quelli HCV negativi. Addirittura Correl (103) evidenzia una minor incidenza di rigetto acuto nei pazienti HCV positivi rispetto agli HCV negativi (28% vs 40%) correlandola ad una ridotta funzionalità dei linfociti T helper nei trapiantati HCV positivi, ma si tratta di una segnalazione isolata.

Altre patologie extraepatiche sono state segnalate in letteratura, anche se la loro incidenza è molto bassa e la correlazione di alcune di queste con il virus C rimane ancora controverso. Segnaliamo di seguito le più importanti:

- ✓ Linfoma non Hodgkin a basso grado di malignità.
- ✓ Porfiria cutanea tarda
- ✓ Sindrome di Sjogren
- ✓ Tiroidite autoimmune
- ✓ Lichen ruben planus
- ✓ Panarterite nodosa

Nonostante tutto, il trapianto di rene rimane l'opzione migliore per i pazienti con IRC terminale HCV positivi, perché la loro sopravvivenza in dialisi risulta peggiore per l'elevata mortalità da causa cardiovascolare (58, 87, 104).

### *6.5. Terapia dell'epatite C nel paziente trapiantato e sue indicazioni.*

Lo scopo del trattamento antivirale nei pazienti trapiantati è principalmente quello di evitare lo sviluppo di cirrosi e di complicanze extraepatiche come le glomerulonefriti. Nella popolazione generale la terapia combinata con Interferone e Ribavirina sembra dare ottimi risultati anche a lungo termine. Tuttavia nei pazienti trapiantati il significativo rischio di rigetto acuto limita l'uso di questi farmaci, soprattutto  $\text{INF}\alpha$ , a rari casi selezionati:

- ✓ Interferone alpha: gli studi pilota con  $\text{INF}\alpha$  nel trapianto mostrano scarsa tolleranza, limitata efficacia (non è mai stata osservata una risposta contenuta) e significativo rischio di rigetto acuto (più del 40% dei casi) che in alcuni casi è risultato irreversibile. Rostaing (105) ha pubblicato i dati del più grande trial eseguito sull'uso di  $\text{INF}\alpha$  in pazienti trapiantati con funzione renale stabile, confermando un'alta incidenza di rigetto a discapito di una scarsa risposta del virus. L'unica vera indicazione all'uso di  $\text{INF}\alpha$  nel post trapianto è l'epatite colostatica fibrosante.
- ✓ Ribavirina: l'esperienza nel trapianto è molto limitata, gli studi pilota sono eseguiti su un numero esiguo di pazienti con scarsi risultati (solo il 25% mostra una negativizzazione dell'HCV-RNA) e numerosi effetti collaterali, in particolar modo la comparsa di anemia emolitica che costringe alla riduzione fino alla sospensione del farmaco.
- ✓ Interferone + Ribavirina: non sono segnalate esperienze nel trapianto sulla terapia combinata. Tale terapia potrebbe essere presa in considerazione in casi estremi di rapida evoluzione cirrogena in pazienti a basso rischio di rigetto.

Poiché non esistono dati univoci sull'efficacia e la tossicità delle terapie attualmente disponibili, diventa fondamentale uno stretto follow-up dei pazienti trapiantati HCV positivi con periodici controlli biochimici, virologici ed eventualmente bioptici.

#### *6.6 Valutazione del paziente uremico HCV positivo per immissione in lista di trapianto di rene.*

Benché la presenza del virus C possa determinare nel lungo termine risultati peggiori di sopravvivenza del paziente trapiantato, la sopravvivenza e la qualità di vita del soggetto HCV positivo trapiantato risulta nettamente migliore rispetto al paziente HCV positivo che rimane in dialisi (39, 106). I pochi lavori prodotti sull'argomento mostrano che l'effetto sfavorevole indotto dal trapianto sul corso dell'infezione da HCV non riesce ad annullarne gli effetti vantaggiosi a lungo termine sulla sopravvivenza dei pazienti in trattamento sostitutivo. Questo deve stimolare i centri dialisi ad inserire i pazienti HCV positivi in lista trapianto. Ma poiché è altrettanto chiaro che il trapianto può peggiorare il decorso dell'epatopatia da HCV, che in alcuni casi può assumere un decorso particolarmente rapido (107), sarebbe molto importante riuscire a distinguere i pazienti la cui epatopatia rimarrà sostanzialmente stabile dopo il trapianto, e che quindi trarranno probabilmente vantaggio da esso, da quelli in cui il trapianto indurrà una progressione più tumultuosa dell'infezione con aumentato rischio di morte e pertanto dovrebbe essere evitato. Sicuramente uno dei fattori prognostici più importanti è l'entità del danno istologico epatico di base. Già nei primi anni '90 uno studio bioptico (35) aveva chiaramente mostrato che pazienti trapiantati con epatite cronica istologicamente avanzata (indipendentemente dall'eziologia) avevano una progressione dell'epatopatia

più rapida ed un rischio di morte per insufficienza epatica più elevato di quelli con lesioni istologiche di partenza meno gravi, che potevano invece rimanere stabili nonostante anni di immunosoppressione. Inoltre Mathurin et al. (85) hanno dimostrato che la presenza di cirrosi prima del trapianto risulta fattore di rischio indipendente per la sopravvivenza a lungo termine (10 anni) dei pazienti. Su queste basi sono state emesse una serie di linee guida e flow-chart per la valutazione e gestione del paziente HCV positivo potenziale candidato al trapianto di rene. Secondo le linee guida tale valutazione si deve basare su tre punti fondamentali:

1. **Test sierologici** (ELISA, RIBA) per la ricerca di anticorpi contro il virus C e tecnica PCR per la ricerca di HCV-RNA, necessaria per confermare la presenza dell'infezione attiva. Consigliato inoltre il dosaggio quantitativo dell'HCV-RNA e lo studio del genotipo virale. Tutti i potenziali candidati devono essere sottoposti ai test per rilevare la presenza o meno di anti-HCV. La maggior parte (70-95%) dei pazienti anti HCV+ sono viremici (80). L'assenza di HCV-RNA in una percentuale di pazienti anti HCV positivi potrebbe essere il risultato della persistenza di anticorpi anche dopo l'eliminazione del virus (evenienza rara), di livelli di HCV-RNA al di sotto del limite di determinazione o di viremia intermittente. La viremia, comunque, sia in termini qualitativi che quantitativi, pur esprimendo il grado di attività replicativa virale, non correla con l'entità delle lesioni epatiche.
2. **Test di funzionalità epatica**, che includono i classici parametri di sintesi (albumina, tempo di protrombina), di colestasi (bilirubina), di necrosi (SGOT, SGPT). Essi esprimono l'evidenza biochimica di malattia epatica sia in termini di

attività (livelli di aminotransferasi sieriche) sia in termini di evoluzione (indici di sintesi epatica). Tuttavia, alterazioni degli enzimi epatici sono presenti in una percentuale di pazienti estremamente variabile (4-67%). E' evidente che un considerevole numero di pazienti in dialisi con infezione da HCV mantiene normali indici di citolisi (72).

3. **Biopsia epatica**, che rappresenta il *gold standard* nel definire la severità dell'interessamento epatico. Infatti, nessun altro esame è in grado di dare informazioni più precise inerenti al grado e lo stadio dell'epatite. Secondo le linee guida attualmente in uso, tutti i pazienti con infezione da virus C, con viremia (HCV-RNA+), devono essere sottoposti a biopsia epatica, indipendentemente dalla evidenza biochimica di malattia epatica (ipertransaminasemia). Non sembra esistere, infatti, correlazione tra indici di citolisi epatica e quadro istologico (1, 4, 108).

Altri possibili marker sono stati proposti per valutare lo stadio dell'epatite senza ricorrere a biopsie ripetute. Il dosaggio dell'acido ialuronico è risultato, in un recente lavoro, il parametro più promettente, per quanto sia dotato di una specificità e sensibilità comunque inferiori alla biopsia epatica, che rimane il gold standard.(1).

E' sulla base dei dati forniti dalla biopsia epatica, unitamente ai risultati dei test biochimici (soprattutto andamento delle transaminasi, carica virale e genotipo), che sarà possibile valutare l'opportunità di sottoporre i pazienti HCV+ a terapia antivirale, prima dell'inserimento in lista di trapianto di rene.

Si propone qui di seguito la flow-chart più comunemente accettata per la valutazione ed il trattamento dei pazienti uremici HCV+ possibili candidati al trapianto di rene.

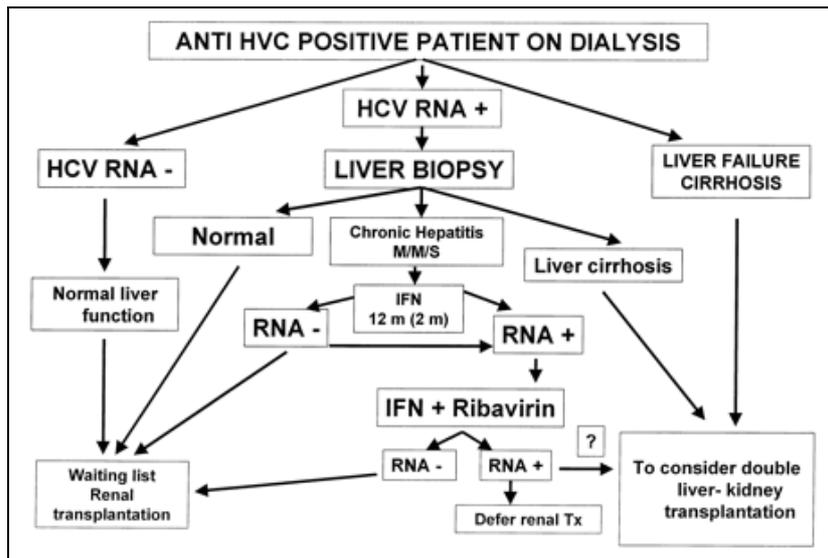


Figura 5. Algoritmo per i pazienti in lista trapianto HCV positivi (87).

## SCOPO DELLO STUDIO

La progressione dell'epatopatia HCV correlata sembra dipendere dalla severità delle lesioni istologiche presenti al momento del trapianto. Per questo motivo, da alcuni anni, è stato proposto di inserire lo studio morfologico del danno epatico tra i parametri da utilizzare per la valutazione del paziente HCV positivo candidato al trapianto di rene. Sebbene questa strategia abbia trovato largo consenso da parte di molti autori, tuttora non esistono dati che abbiano documentato la sua effettiva utilità in questo specifico ambito.

Obiettivo di questo studio è stabilire se la valutazione morfologica epatica pre-trapianto permetta una selezione più accurata del paziente HCV positivo rispetto ai parametri clinici e di laboratorio comunemente utilizzati.

## PAZIENTI E METODI

Si tratta di uno studio retrospettivo effettuato *in pazienti HCV positivi*, in terapia dialitica, valutati per l'immissione in lista trapianto di rene presso il Centro Trapianti della Divisione di Nefrologia degli Spedali Civili di Brescia.

### **PAZIENTI**

*Criteri di selezione della popolazione in studio.*

Sono stati considerati tutti i pazienti sottoposti ad una valutazione di idoneità dal 01/01/1990 fino al 31/07/2005. La data di inizio dell'osservazione è stata motivata dal fatto che il test per la ricerca degli anticorpi anti HCV si è reso disponibile nella pratica clinica routinaria solo nel 1990. Sono stati esclusi dallo studio tutti pazienti con positività all'HBs antigenemia.

*Dati anagrafici, clinici e virologici valutati*

In tutti i pazienti, sono stati valutati i seguenti parametri, quando disponibili:

- caratteristiche demografiche: sesso, età al momento della valutazione, età ad inizio dialisi
- eziologia della malattia renale
- caratteristiche relative alla dialisi: durata e tipo di dialisi. In caso di precedente trapianto, come data di inizio della dialisi veniva considerata quella del ritorno in dialisi dopo l'ultimo trapianto fallito
- fattori di rischio per infezione da HCV diversi dalla dialisi e fattori di progressione della malattia: trasfusioni, precedenti trapianti, tossicodipendenza, abuso di alcool
- stima della durata dell'infezione da HCV: veniva sempre desunta dalla data della prima esposizione ad un fattore di rischio
- ricerca della presenza di replicazione virale (HCV-RNA qualitativo e/o quantitativo) e tipizzazione genomica del virus C
- presenza di epatopatia: la diagnosi clinica di malattia epatica HCV-correlata veniva posta controllando i valori degli indici di citolisi epatica (AST, ALT),  $\gamma$  GT, albuminemia e tempo di protrombina (PT), misurati almeno due volte nel corso dell'anno precedente alla valutazione di idoneità al trapianto. Veniva

considerato patologico qualsiasi valore di transaminasi al di sopra del range di normalità; il riscontro di ipertransaminasemia, anche se lieve e transitorio definiva la presenza di epatocitolisi

- presenza di segni clinici di cirrosi e/o scompenso epatico: quadro ecografico compatibile con cirrosi, ipertensione portale, ascite, varici esofagee, encefalopatia

*Dati istologici valutati*

L'indicazione alla biopsia veniva posta in seguito al riscontro di replicazione virale (HCV RNA positività) in presenza o assenza di epatocitolisi.

Ogni biopsia epatica veniva eseguita in regime di Day Hospital sempre previo consenso scritto del paziente, dopo aver verificato la normalità dei parametri coagulativi standard (PT, PTT, Fibrinogeno), della conta piastrinica e del tempo di sanguinamento (tempo di Ivy).

Il danno istologico era classificato utilizzando uno score descrittivo (tabella I) anziché la classificazione di Knodell (36) poichè quest'ultima non era disponibile in tutti i pazienti.

*Tabella I. Diagnosi descrittiva utilizzata per classificare i risultati della biopsia epatica.*

<b>Lesioni epatiche aspecifiche (LEA)</b>	epatite senza piecemeal necrosis e necrosi lobulare minima
<b>Epatite cronica persistente (ECP)</b>	epatite senza piecemeal necrosis
<b>Epatite cronica aggressiva minima (ECA minima)</b>	epatite con piecemeal necrosis focale in alcuni spazi portali
<b>Epatite cronica aggressiva moderata (ECA moderata)</b>	epatite con piecemeal necrosis continua coinvolgente meno del 50% del perimetro degli spazi portali e/o setti
<b>Epatite cronica aggressiva severa (ECA severa)</b>	epatite con piecemeal necrosis continua coinvolgente più del 50% del perimetro degli spazi portali e/o setti
<b>Fibrosi lieve</b>	fibrosi degli spazi portali
<b>Fibrosi severa</b>	fibrosi a ponte porto-portale e/o porto-centrale
<b>Cirrosi</b>	epatite con presenza di setti e atteggiamento nodulare focale e/o incompleto del parenchima
<b>Siderosi</b>	presenza di granuli intraepatocitari e/o macrofagici

## **METODI**

### *Metodi di laboratorio*

La ricerca della positività per anticorpi anti-HCV è stata eseguita utilizzando una metodica immunoenzimatica (IgM EIA II Abbott), confermata da metodica radioimmunologica (RIBA) dal 1990.

La determinazione qualitativa della viremia è stata effettuata con Polimerase Chain Reaction (Roche Diagnostic System), in corso dal 1997; la determinazione quantitativa della viremia (HCV-RNA) è stata condotta con metodo di amplificazione del DNA su Branched DNA (bDNA, Quantiplex <sup>TM</sup> 1.0, HCV RNA Chiron Corporation), in corso anch'essa dal 1997 (positività per valori >1000 copie/ml).

La tipizzazione genomica del virus è stata eseguita con Line Probe Assay (LiPA) con tecnica di ibridizzazione inversa, classificata secondo Simmonds (109).

L'analisi dei valori di transaminasi,  $\gamma$ GT, albuminemia e PT non è stata centralizzata in un singolo laboratorio, per tale motivo sono state considerate valide le metodiche di routine dei laboratori periferici.

### *Metodi di valutazione istologica*

La biopsia epatica è stata eseguita sotto guida ecografica con ago 21 G, in anestesia locale, previa ricovero del paziente in regime di Day-Hospital e controllo dei parametri ematochimici di coagulazione e riscontro di un corretto tempo di sanguinamento secondo metodica di Ivy. Il frustolo ottenuto col prelievo bioptico era fissato in Formalina al 10% e poi processato rispettivamente in Alcool 70-95-100% e Cilene in appositi processatori. Era poi incluso in Paraffina e quindi tagliato in fettine da 0.1 mm, montate su vetrino.

L'analisi istochimica prevedeva una colorazione di base con Ematossilina –Eosina ed una colorazione PAS e PAS con Diastasi per la valutazione del glicogeno e della struttura reticolare.

### *Analisi statistica*

Dopo una prima valutazione statistica descrittiva delle variabili considerate, sono stati utilizzati i seguenti test:

- t di Student per dati appaiati e non appaiati
- Test  $\chi^2$

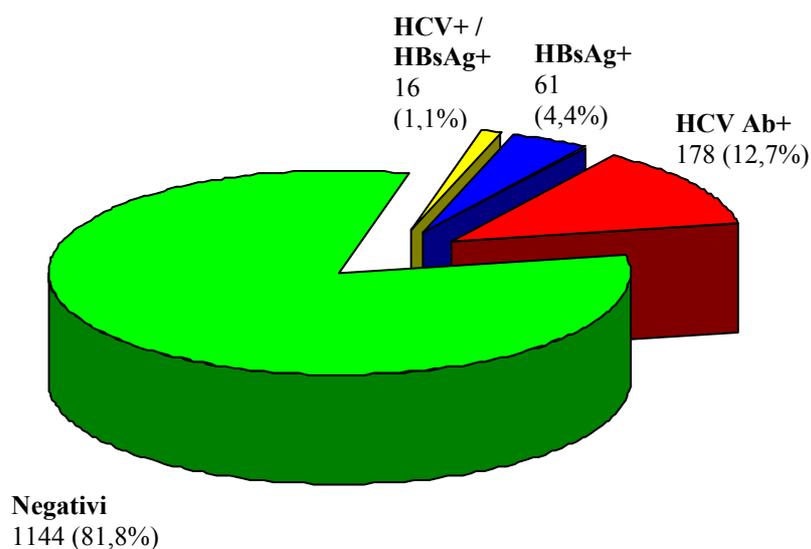
L'archiviazione dei dati è stata seguita con il programma "Excel"® di Microsoft; l'analisi statistica con i programmi statistici di Excel ®. E' stata accettata come significatività una  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### 1. *Caratteristiche epidemiologiche e cliniche della popolazione studiata*

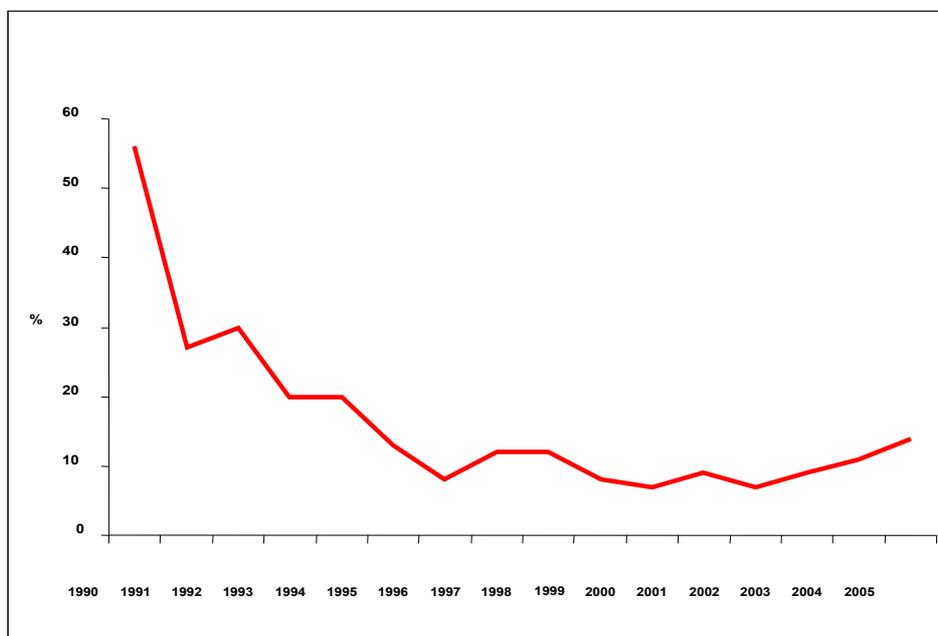
Dal 01/01/1990 fino al 31/07/2005 sono stati valutati per idoneità al trapianto di rene 1399 pazienti: 884 maschi e 515 femmine, con un'età media di  $45 \pm 13$  anni

In questa popolazione il riscontro di anticorpi anti-HCV è stato rilevato in 194 pazienti (13,8%), di cui 16 erano coinfezzati con virus B. I portatori di HCV-Ab isolato sono risultati 178 (12,7%), di HbsAg isolato 61 (4,4%) ed i pazienti HCV-Ab negativi ed HbsAg negativi sono risultati 1144 (81,8%) (Fig 1).



*Figura 1. Prevalenza di epatite C e B nella popolazione candidata al trapianto di rene.*

Nel corso degli ultimi 15 anni la prevalenza dell'epatite C, nella popolazione dialitica valutata per idoneità al trapianto di rene, si è progressivamente ridotta dal 20-50%, nei primi anni '90, ad una percentuale attuale intorno al 10% (Fig 2).



*Figura 2. Incidenza dei pazienti HCV positivi valutati dal 1990 al 2005.*

## ***2. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti HCV-Ab positivi e confronto con la popolazione HCV-Ab negativa***

Dopo l'esclusione dei 16 pazienti portatori di HbsAg e dei 22 pazienti con dati clinici non sufficienti, la popolazione selezionata in questo studio è risultata costituita da 156 pazienti HCV-Ab positivi: 93 maschi e 63 femmine. L'età media al momento della valutazione era di  $43 \pm 11$  anni.

Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti HCV-Ab positivi e negativi, valutati per idoneità al trapianto sono riassunte nella tabella I.

Al momento della valutazione per inserimento in lista trapianto, i pazienti HCV-Ab positivi avevano mediamente un'età inferiore rispetto a quelli HCV-Ab negativi.

La popolazione HCV-Ab positiva era caratterizzata da una durata di dialisi maggiore, da una maggior frequenza di trasfusioni e di pregressi trapianti. La condizione di HCV positività era più frequente nella popolazione in dialisi extracorporea rispetto a quella in dialisi peritoneale (fig. 3,4).

Tabella I. Caratteristiche della popolazione studiata.

	HCV +	HCV-	p
Numero dei pazienti	156	1205	
Età	43±11	46±12	< 0,023
Sesso (%M)	59.6	63.3%	NS
Durata della dialisi (mesi)	80 ± 68	27±36	<0,001
Tipo di dialisi			
- <i>Emodialisi</i>	91,0 %	77,7%	<0,0001
Fattori di rischio per HCV			
- <i>Trasfusioni</i>	66,0 %	41,3%	<0,001
- <i>precedenti tx</i>	38.5%	9,6%	< 0,001
- <i>tossicodipendenza</i>	0	0	

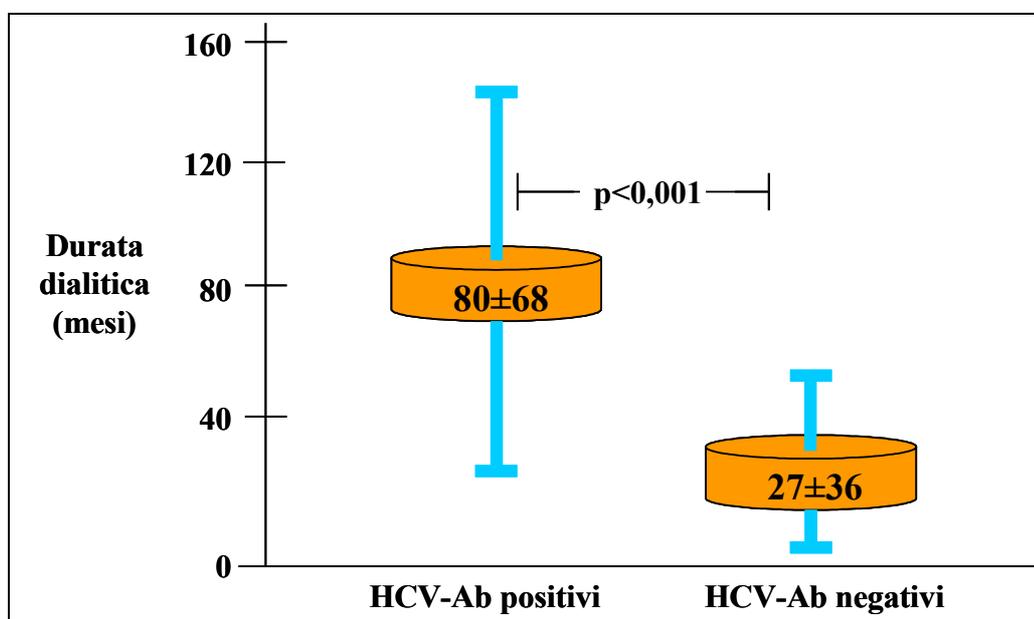


Figura 3 . Durata dialitica nei pazienti HCV-Ab positivi e HCV-Ab negativi.

Figura 4. Confronto tra tipo di dialisi, incidenza di trasfusioni e precedenti

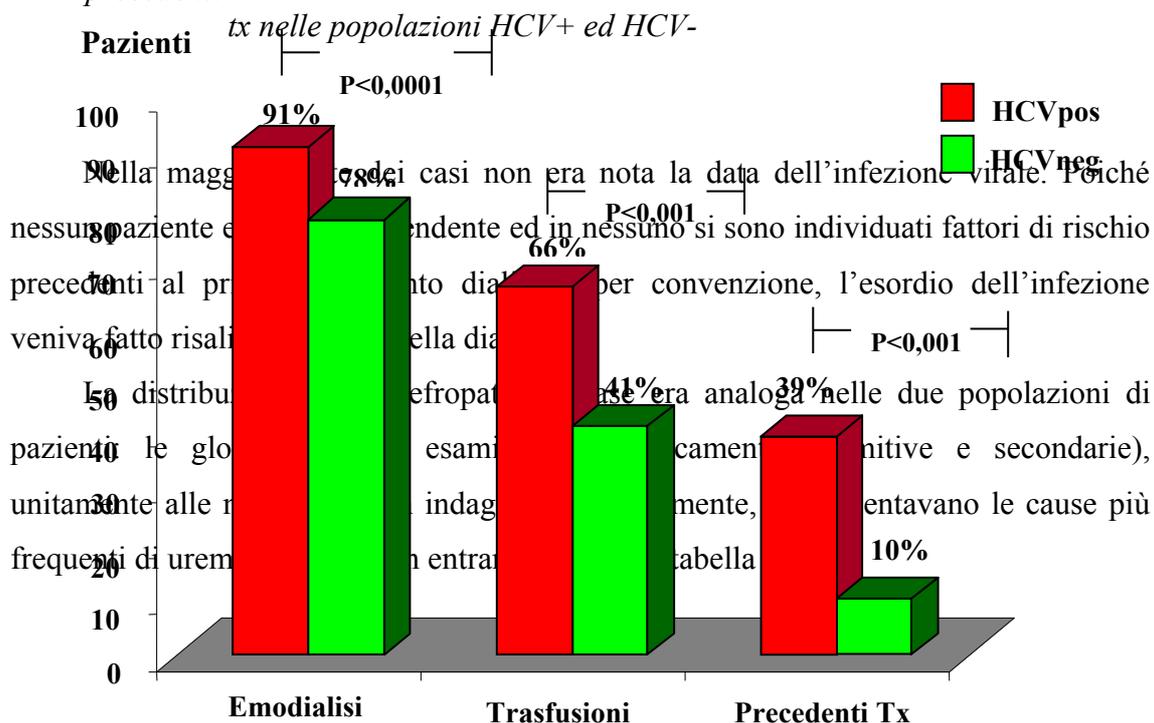


Tabella II. Malattia di base

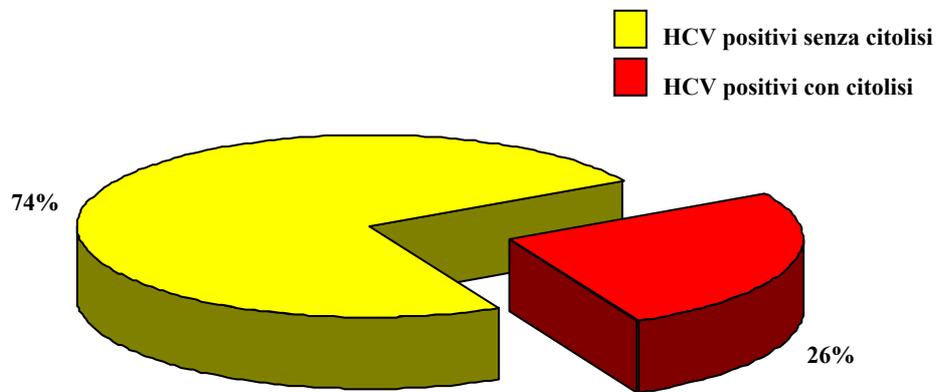
<b>EZIOLOGIA MALATTIA DI BASE</b>	<b>HCV-Ab negativi</b>	<b>HCV-Ab positivi</b>	<b>p</b>
Glomerulonefrite esaminata istologicamente*	29,5%	33,1%	NS
Nefropatia non determinata istologicamente	37,2%	33,1%	NS
Malformativa (compreso reflusso v-u)	10,2%	6,6%	NS
Nefrite interstiziale	5,1%	5,6%	NS
ADPKD	12,2%	15,2%	NS
Nefropatia reno-vascolare	1,3%	2,9%	NS
Altro	4,5%	3,3%	NS

\*GN sia primitive che secondarie

### 3. Caratteristiche cliniche e virologiche dei pazienti HCV-Ab positivi

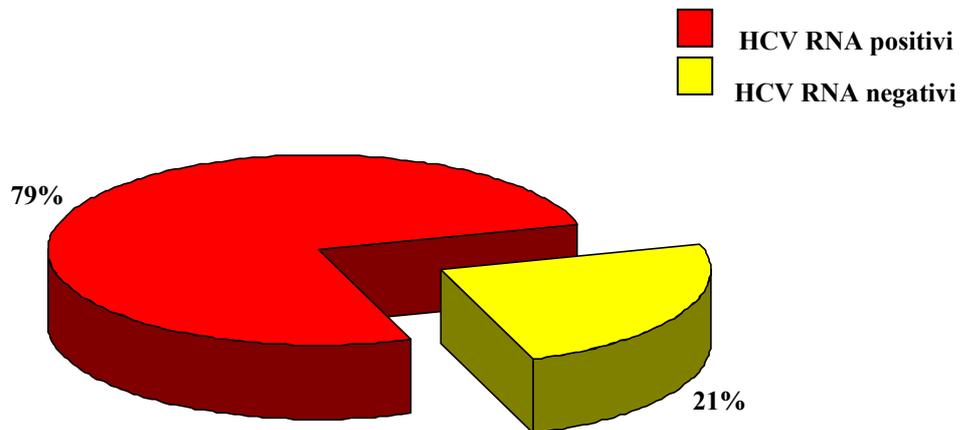
Dei 156 pazienti esaminati è stato possibile ricostruire la storia clinica dell'anno precedente alla valutazione di idoneità al trapianto. In 40/156 (25,6%) pazienti era

presente un incremento persistente o transitorio delle transaminasi, indice di citolisi (Fig. 5).



*Figura 5. Prevalenza di citolisi epatica nei pazienti HCV-Ab positivi.*

La ricerca dell'HCV-RNA è stata effettuata in 131/156 (84%) dei pazienti ed è risultata positiva in 102 (76%) (Figura 6).



*Figura 6. Prevalenza di viremia in 131 pazienti HCV-Ab positivi.*

Il genotipo è stato studiato in 63/102 (62%) pazienti: i genotipi più frequenti sono 1b (49.2 %) e 2a/2c (36.5%) (Fig. 7).

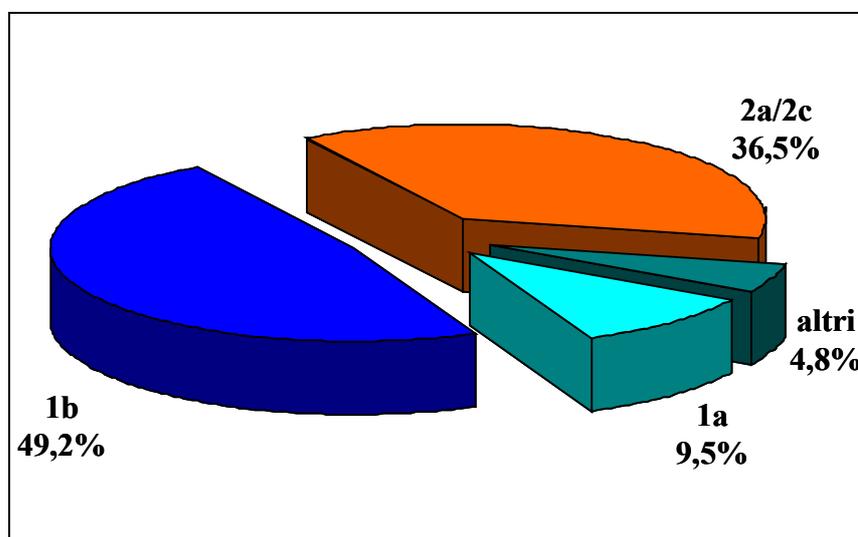


Figura 7. Distribuzione dei genotipi in 63 pazienti viremici.

Segni clinici e/o strumentali di cirrosi e/o insufficienza epatica furono rilevati in 1/156 pazienti (0.6 %).

I genotipi più diffusi nella popolazione (1 e 2a/2c) sono stati confrontati per quanto concerne la probabilità di associarsi a citolisi epatica; come mostra la Tabella III non sono state riscontrate differenze significative.

Tabella III. Distribuzione dei genotipi nelle popolazioni di pazienti rispettivamente con citolisi e senza citolisi.

Genotipo	paz con citolisi (19)	paz senza citolisi (44)	P
genotipo 1	57.9%	59.1%	NS
genotipo 2a/2c	36.8%	36.4%	NS
altri	5,3%	4,5%	NS

#### 4. BIOPSIE EPATICHE

##### 4.1 Caratteristiche dei pazienti sottoposti a biopsia epatica

Sono stati sottoposti a biopsia epatica 63 pazienti: 26 di questi presentavano sia viremia che citolisi, 37 solo viremia (Figura 8).

L'intervallo di tempo intercorrente tra l'inizio della dialisi (considerato come inizio dell'infezione da virus C) e la data di esecuzione della biopsia epatica, era mediamente di  $68 \pm 64$  mesi.

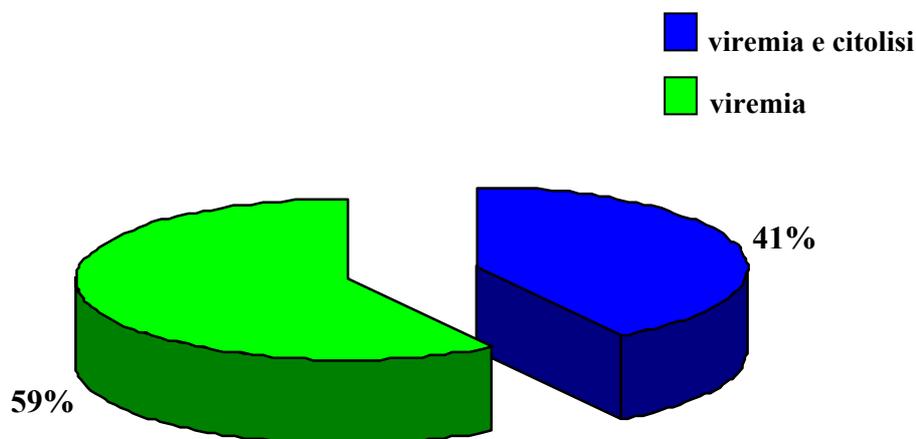


Figura 8 . Caratteristiche cliniche e virologiche dei pazienti HCV-Ab positivi sottoposti a biopsia epatica.

Solo una biopsia ecoguidata sulle 63 effettuate (1.6%) fu complicata da un emoperitoneo. Tale complicanza si produsse in un paziente in dialisi peritoneale ed ebbe

scarsa rilevanza clinica, condizionando solamente un tempo di osservazione post-bioptico di 24 ore.

#### 4.2 Esito dell'esame istologico

L'esito dell'esame istologico è riassunto nella figura 9. Un quadro istologico di normalità fu riscontrato in 3 pazienti (4.7%), siderosi secondaria in 2 casi (3%), epatite reattiva aspecifica in 11 (17.5%), epatite cronica persistente in 6 (9.5%), epatite cronica attiva (ECA) minima/lieve in 39 casi (62%) ed ECA moderata in 2 casi (3%). In nessun paziente furono riscontrati quadri di ECA severa né cirrosi. In tutte le biopsie il grado di fibrosi era lieve od assente. Epatocarcinoma nell'ambito di un'ECA lieve fu riscontrato in 1 caso.

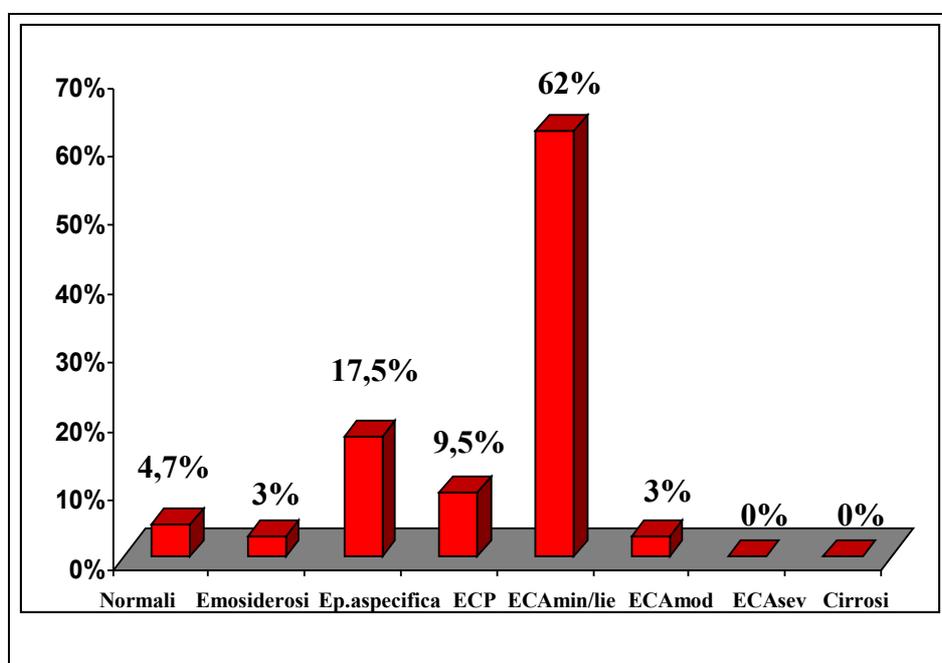


Figura 9. Prevalenza delle lesioni istologiche in tutte le biopsie eseguite. **ECP**: epatite cronica persistente; **ECAmo**: epatite cronica aggressiva minima/lieve; **ECAsv**: epatite

*cronica aggressiva moderata; ECAs<sub>sev</sub>: epatite cronica aggressiva severa.*

#### 4.2.1 Citolisi e quadro istologico

Pazienti senza citolisi. Sono 37 pazienti tutti viremici. L'esame istologico in questo gruppo di pazienti (tabella IV) ha mostrato quadri di normalità e di epatite aspecifica o comunque non aggressiva in 15 casi (40.5%), ed ECA minima/lieve in 22 (59.5%) tra cui un caso con associato epatocarcinoma per il quale era stato posto un sospetto ecografico. Non vennero riscontrati casi di ECA moderata o severa né ad evoluzione cirrogena (Figura 10).

Pazienti con citolisi. Si tratta di 26 pazienti con riscontro persistente o occasionale di ipertransaminasemia. I quadri istologici riscontrati in questi pazienti risultarono molto variabili (Figura 10 e Tabella IV). Diciannove su 26 pazienti (73.1%) presentavano un quadro istologico di ECA, ma nella maggior parte dei casi l'attività necroinfiammatoria era minima/lieve e solo in 2 casi (7.7%) risultò moderata. Anche in questo gruppo di pazienti non si riscontrarono quadri di ECA severa o ad evoluzione cirrogena. La distribuzione dei vari gradi di epatopatia non differisce in modo statisticamente significativo tra i pazienti con e senza citolisi.

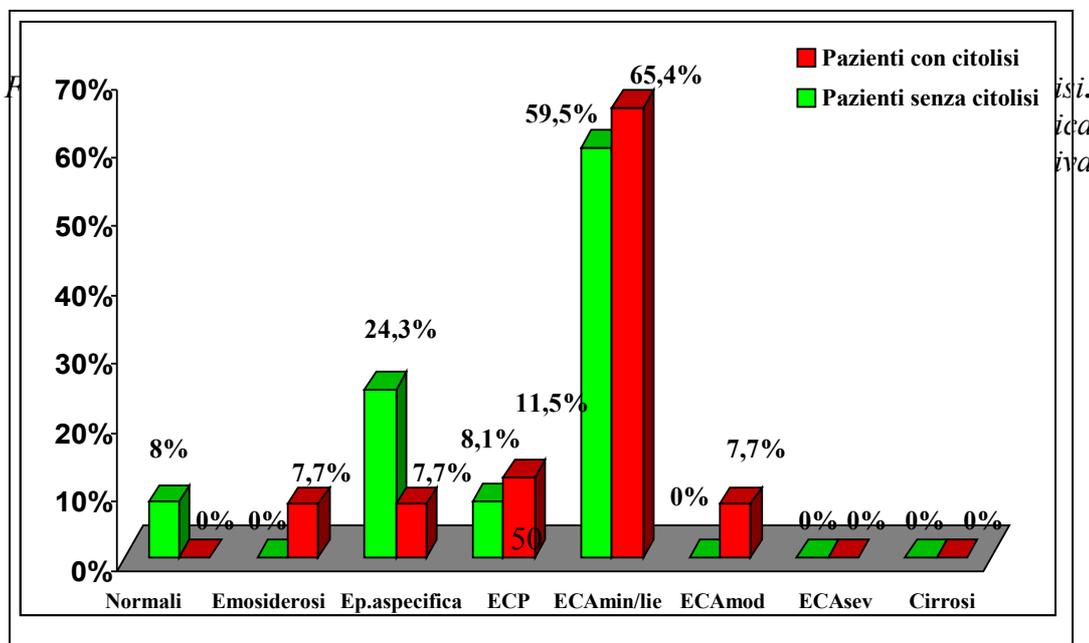


Tabella IV. Alterazioni istopatologiche in 63 pazienti

	<i>No citolisi (37)</i>	<i>Citolisi (26)</i>
Normalità	3 (8.1%)	0
Epatosidereosi	0	2 (7.7%)
Epatite aspecifica reattiva	9 (24.3%)	2 (7.7%)
Epatite cronica persistente	3 (8.1%)	3 (11.5%)
Epatite cronica attiva lieve	22* (59.5%)	17 (65.4%)
Epatite cronica attiva moderata	0	2 (7.7%)
Epatite cronica attiva severa	0	0

\* un paziente con HCC

#### 4.2.2 Confronto tra pazienti con ECA e quelli senza ECA

I pazienti con diagnosi istologica di epatite cronica aggressiva, con qualsiasi grado di attività, sono stati confrontati con i pazienti con quadro istologico aspecifico o di normalità. Da tale confronto non è emerso alcun tipo di correlazione né di tipo clinico-anamnestico né di tipo virologico (Tabella V).

*Tabella V. Confronto tra pazienti con ECA e quelli con lesioni epatiche aspecifiche, emosiderosi o quadro di normalità.*

	<i>Pazienti con ECA</i>	<i>Pazienti senza ECA</i>	<i>p</i>
N° pazienti	41	22	
Età media (anni)	44±10	44±13.6	NS
Durata dialisi (mesi)	50±44	71±66	NS
Citolisi N°(%)	46.4%	31.8%	NS
Tipo di dialisi (%HD)	90%	100%	NS
Genotipi:			
1a	10%	0	
1b	53%	50%	NS
2a/2c	30%	50%	NS
altri	6.6%	0	

### **5. Idoneità al trapianto di rene dopo biopsia epatica**

Su 63 pazienti studiati con biopsia epatica, solamente 2 presentavano un quadro di epatite cronica attiva di gravità sufficiente a porre controindicazione al trapianto di rene. Si trattava dei 2 pazienti con ECA moderata. Entrambi presentavano una storia di epatocitolisi. In entrambi fu posta indicazione al trattamento con Interferone.

In nessun paziente senza citolisi epatica la biopsia rivelava forme di epatite di grado ed evoluzione tali da controindicare il trapianto.

## DISCUSSIONE

L'infezione da HCV rappresenta ancor oggi un problema di grande rilevanza clinica ed epidemiologica per i pazienti con insufficienza renale cronica terminale, in virtù della sua alta prevalenza e delle sue potenziali implicazioni nel post-trapianto renale. L'infezione da virus C, infatti, è la principale causa di malattia epatica cronica e la quarta causa di morte tra i riceventi di trapianto renale (77). La prevalenza di sieropositività anti-HCV nella popolazione di uremici dei centri dialisi in Italia alla fine degli anni '90 si aggirava intorno al 20-30%. Dopo il 1990, con l'introduzione dei test di screening per la ricerca dell'infezione da virus C e la successiva stesura e applicazione delle precauzioni standard e speciali per evitare la diffusione dell'infezione in ambito sanitario, l'incidenza e la prevalenza dell'HCV-Ab positività nella popolazione dialitica si è progressivamente ridotta. Un contributo fondamentale a tale processo è stato dato anche dalla maggior sicurezza delle trasfusioni di emoderivati e dalla drastica riduzione dell'impiego di emotrasfusioni nel paziente dializzato, resa possibile dall'introduzione dell'eritropoietina ricombinante nella pratica comune.

### *EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO*

I dati che emergono dal nostro studio confermano una significativa e progressiva riduzione di incidenza di epatite C nella popolazione dializzata che accede alla lista di trapianto di rene. Nel centro di Brescia, la prevalenza tra i possibili candidati al trapianto renale è passata da valori oscillanti tra il 20% ed il 50% nei primi anni '90 all'attuale 10%, in linea con i dati americani (110, 111). Rimane comunque una percentuale elevata rispetto a quella della popolazione generale (2-3%) (11, 112). Tuttavia, l'elevatissima percentuale riscontrata nei primi anni '90 è da mettere in relazione anche ad un effetto cumulativo legato alla rivalutazione, in quegli anni, di pazienti già in lista da tempo, che non potevano essere sottoposti ai test di screening per HCV in occasione della visita avvenuta prima del 1990.

Come già ampiamente evidenziato in letteratura (13, 49, 50), anche dall'analisi epidemiologica della nostra popolazione è emerso che la presenza del virus C è più frequente nei pazienti politrasfusi, in quelli con durata di dialisi maggiore e con precedenti trapianti, in particolare se eseguiti prima del 1990, e nei pazienti in terapia

sostitutiva extracorporea, piuttosto che in dialisi peritoneale. Sono tutti evidenti e riconosciuti fattori di rischio di trasmissione parenterale dell'infezione.

Il principale obiettivo di questo lavoro è, però, quello di verificare se la biopsia epatica debba essere sempre considerata indispensabile per valutare l'idoneità al trapianto di rene dei pazienti dializzati con infezione da virus C. Per questo scopo abbiamo studiato le caratteristiche cliniche, bioumorali e virologiche di 156 soggetti uremici in trattamento dialitico cronico, che presentavano HCV-Ab positività, e tra questi abbiamo selezionato 63 pazienti con documentata viremia, testimonianza di infezione da virus C sicuramente attiva, i quali sono stati sottoposti a biopsia epatica. Questo ci ha consentito di confrontare i quadri istologici con i segni bioumorali di attività dell'epatite (ipertransaminasemia).

#### *CARATTERISTICHE CLINICHE, BIOUMORALI E VIROLOGICHE DELLA POPOLAZIONE STUDIATA*

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche dei 156 pazienti valutati, la prima osservazione da fare è che la prevalenza di cirrosi evoluta con segni di scompenso epatico è risultata molto bassa nella nostra popolazione: è stata rilevata solo in un caso (0.6%). Una possibile spiegazione, è che la popolazione da noi studiata, sia stata in qualche modo selezionata dai medici dei centri dialisi, che potrebbero non aver prospettato la possibilità di un trapianto di rene a quei pazienti con malattia epatica più avanzata. Di fatto, rimangono infrequenti i casi di scompenso epatico nel dializzato, probabilmente a causa dell'elevata mortalità cardiovascolare che impedisce di avere a disposizione periodi di osservazione sufficienti al realizzarsi della naturale progressione della malattia.

Tuttavia, la progressione dell'epatopatia nel paziente uremico in dialisi è ancora oggi una questione dibattuta. I primi studi osservazionali, evidenziando una bassa incidenza sia di alterati indici di epatocitolisi, sia di cirrosi tra i pazienti in dialisi, sembravano suggerire, che nel paziente uremico in trattamento dialitico, la malattia avesse un decorso più mite (34). In realtà, lavori più recenti e con follow-up più prolungato, smentiscono questa ipotesi e documentano nel dializzato un'attività e progressione istologica della malattia epatica simile a quella vista nella popolazione generale, accompagnandosi peraltro, ad una aumentata morbilità e mortalità (39, 53, 56-

59). Inoltre, la bassa frequenza di epatocitolisi sembra essere legata semplicemente ai criteri di definizione. Oggi è ampiamente documentato che nel paziente con insufficienza renale i livelli di transaminasi sono nettamente ridotti, probabilmente dimezzati rispetto ai range della popolazione sana (51). Le cause della riduzione dell'attività delle aminotrasferasi è solo parzialmente conosciuta ed è stata posta in relazione con un deficit di un coenzima delle transaminasi (piridossina -5'-fosfato) (113), con alti livelli di tossine uremiche, con ridotta sintesi e ridotto rilascio delle transaminasi da parte degli epatociti e con un'accelerata clearance delle stesse (51). Alcuni autori propongono come cutoff (limite) delle transaminasi nel soggetto in dialisi il valore di 20 UI/L (114). Nel nostro lavoro abbiamo considerato come indice significativo di epatocitolisi, un qualsiasi incremento delle transaminasi oltre il range di normalità del laboratorio in cui era stato eseguito l'esame, che poteva essere tra 40 e 50 UI/L. Basandoci su questa definizione la nostra indagine osservazionale ha rivelato la presenza di segni clinici di attività dell'epatite in circa il 26% del totale dei pazienti HCV-Ab positivi. La prevalenza di ipertransaminasemia aumenta al 29% quando cercata nel gruppo selezionato di pazienti viremici. Questi valori sono sovrapponibili a quanto sinora documentato in letteratura (26-30%) (115, 116), pur considerando l'eterogeneità dei criteri, usati nei diversi studi, per definire l'incremento delle transaminasi: livelli sierici di ALT ed AST superiori di 2 volte rispetto al normale (50), 1,5 volte rispetto al normale (117) o semplicemente superiori al normale (118-120), come nel nostro caso.

In questo studio, sono stati valutati 156 pazienti con riscontro di HCV-Ab positività, nei quali, l'evidenza di replicazione virale, quando cercata, è stata dimostrata nel 79% dei casi. Anche questo dato concorda con quanto già precedentemente segnalato (80). L'assenza di HCV-RNA in una percentuale di pazienti HCV-Ab positivi potrebbe essere il risultato di livelli di HCV-RNA al di sotto del limite di determinazione, di viremia intermittente o della persistenza di anticorpi anche dopo l'eliminazione del virus (evenienza rara). La distribuzione dei genotipi è risultata sovrapponibile a quella della popolazione generale della nostra area geografica, con prevalenza assoluta dei genotipi 1b e 2a/2c. Sebbene sia stato evidenziato che nei soggetti immunocompetenti, il genotipo 1b si associ ad una più alta carica virale e più severe lesioni istologiche epatiche, non abbiamo osservato alcuna correlazione tra

genotipo virale ed aggressività clinica espressa come epatocitolisi, in accordo con le osservazioni di molti altri autori (105).

### *ESAME ISTOLOGICO*

In questo studio abbiamo sottoposto a biopsia epatica 63 pazienti con infezione da virus C e documentata replicazione virale. L'esame istologico ha mostrato la presenza di epatite cronica attiva in un numero elevato di pazienti (65%), ma, nella quasi totalità, il grado di aggressività dell'epatite è risultato minimo. Solo in due casi (3%) è stata documentata un'ECA di grado moderato e non sono mai stati osservati stadi avanzati di epatopatia: in tutti i pazienti la fibrosi era assente o focale e non è mai stata osservata fibrosi a ponte. Inoltre, non è stato rilevato alcun tipo di correlazione tra i quadri clinico-anamnestici e virologici ed i quadri istologici di epatite cronica attiva (ECA).

I nostri dati concordano solo in parte con quelli della letteratura, che comunque appaiono molto eterogenei. In effetti, nei pazienti dializzati o in lista di trapianto di rene, l'ECA è stata descritta in percentuali variabili dal 18% all' 82%, (56, 115, 121-123) e la cirrosi è stata osservata in percentuali variabili dal 2.5% al 12% (56, 115, 121, 123, 124). Nella nostra popolazione, a fronte di un'elevata percentuale di ECA (65%), non abbiamo mai osservato quadri istologici di cirrosi. La discordanza di questi dati è almeno in parte attribuibile all'eterogeneità delle popolazioni studiate nei diversi lavori. In alcuni casi si tratta di popolazioni di soggetti epatopatici in dialisi cronica non selezionati, in altri casi di pazienti dializzati inseriti in lista di attesa per trapianto di rene, in altri ancora di gruppi eterogenei di pazienti epatopatici con insufficienza renale cronica avanzata, non necessariamente in trattamento dialitico, ma valutati per idoneità al trapianto di rene o al trapianto combinato di rene-fegato (121). Di fatto, la popolazione da noi studiata è stata "selezionata", avendo escluso dall'esame biotico tutti i pazienti con malattia epatica clinicamente evoluta, con segni e sintomi di ipertensione portale o gravi alterazioni dei parametri biochimici di funzione epatica. Questo spiega l'assenza, nella nostra casistica, di diagnosi istologiche di cirrosi. Un'altra possibile causa di eterogeneità dei dati è attribuibile alla diversa indicazione alla biopsia epatica. In alcuni casi tutti i pazienti HCV-Ab positivi erano sottoposti all'esame istologico (121, 124), in altri solo i pazienti con documentata viremia. Nel

nostro studio abbiamo sottoposto a biopsia epatica solo i pazienti viremici, in quanto sicuramente portatori di un'infezione attiva.

In questi pazienti, per quanto a tutt'oggi non siamo ancora in grado di predire con certezza quali avranno un'evoluzione più "tranquilla" dell'epatopatia e quali altri più "burrascosa" una volta trapiantati, il fattore prognostico più importante è costituito dall'entità del danno istologico di base (cioè, al momento del trapianto). Già nei primi anni '90 uno studio bioptico aveva chiaramente mostrato che pazienti trapiantati con epatite cronica istologicamente più avanzata avevano una progressione dell'epatopatia più rapida ed un rischio di morte per insufficienza epatica più elevato di quelli con lesioni istologiche di partenza meno gravi, che potevano invece rimanere stabili, nonostante anni di immunosoppressione (35). Ma mentre è certo che i pazienti con quadro istologico epatico normale possono accedere al trapianto e quelli con quadro cirrotico (e probabilmente anche quelli con fibrosi a ponte porto-portale) devono essere invece sospesi dall'intervento, più controverso è il comportamento da tenere nei confronti dei pazienti con ECA di vario grado, che sono i più numerosi. Questo tipo di valutazione non deve prescindere dalla considerazione che comunque la prognosi del paziente uremico HCV-Ab positivo migliora dopo il trapianto. I pochi lavori che hanno cercato di confrontare, in termini di morbilità e mortalità i pazienti HCV positivi trapiantati, rispetto agli HCV positivi rimasti in trattamento dialitico, hanno sempre dimostrato un effetto positivo del trapianto sulla sopravvivenza (39, 106, 125). Quindi, eccetto che per le forme avanzate di epatite, per quanto i pazienti trapiantati HCV positivi possano avere a lungo termine una sopravvivenza peggiore rispetto ai trapiantati HCV negativi, la loro prognosi migliora rispetto a quanto non avverrebbe se rimanessero in trattamento dialitico. Sulla base di questa considerazione, i più considerano come spartiacque per decidere l'idoneità o meno al trapianto, l'epatite aggressiva con grado di attività almeno moderato e/o con presenza di fibrosi portoportale (71).

A questo punto, nel tentativo di capire se i livelli elevati di transaminasi potessero rappresentare degli indici predittivi di epatite attiva di grado moderato o severo, abbiamo analizzato i quadri istologici dei 63 pazienti sottoposti a biopsia epatica suddividendoli nei 2 gruppi con e senza citolisi.

I pazienti biopsiati senza citolisi sono 37. Di questi, 22 (59%) hanno un'ECA. Ma in tutti i casi il grado di attività è lieve ed in nessun caso è presente fibrosi significativa. In 3 casi l'esame istologico ha documentato un quadro di assoluta normalità. Questo dato induce a pensare che in assenza di citolisi si avrebbe un'alta probabilità di trovare un'ECA (59%), ma sempre di grado lieve. In minor misura, in questi pazienti sarebbe possibile riscontrare forme di epatiti aspecifiche, persistenti o addirittura quadri di normalità. In definitiva, in assenza di una storia, anche solo breve e transitoria di epatocitolisi, le probabilità di riscontrare una epatite cronica di grado e/o stadio tale da controindicare il trapianto di rene sono risultate praticamente nulle.

Di contro, nei 29 pazienti che avevano presentato nell'ultimo anno epatocitolisi, l'esame istologico ha documentato in ben 19 casi (72%) un'ECA, ed in nessun caso sono stati osservati quadri di normalità. Benché anche in questo gruppo, il quadro istologico più frequentemente riscontrato fosse quello di una forma lieve di ECA (65%), sono stati documentati anche 2 casi di ECA di grado moderato (8%), che impongono l'esclusione almeno temporanea dal trapianto di rene.

Questi dati suggeriscono che, solo in presenza di una storia di epatocitolisi, è possibile riscontrare quadri istologici che possono mettere in discussione l'adeguatezza al trapianto di rene. Ne segue che se l'obiettivo che ci poniamo è unicamente quello di definire l'idoneità al trapianto di rene di un paziente portatore di epatite C, l'accertamento bioptico debba essere ritenuto indispensabile solo in presenza di una storia clinica caratterizzata da epatocitolisi.

Altre considerazioni devono essere tenute presenti nel caso si voglia attuare una politica che preveda una terapia antivirale prima del trapianto. Questo approccio è giustificato dal fatto che nel post-trapianto un trattamento con interferone è controindicato per l'elevato rischio di rigetto acuto (126, 127). Inoltre, la terapia antivirale con INF, nel dializzato sembra avere un'efficacia superiore rispetto a quella vista nel paziente con normofunzione renale, e soprattutto, la risposta biochimica e viremica, quando ottenuta, sembra persistere anche nel post-trapianto (128, 129, 130). Per questo motivo alcuni autori consigliano di trattare tutti i pazienti con ECA indipendentemente dal grado e dallo stadio della malattia (77, 87), ma su questo punto non c'è comune accordo.

Per comprendere la complessità del problema dobbiamo considerare che se da un lato, l'infezione da HCV è oggi riconosciuta come la più importante causa di epatopatia nel post-trapianto di rene (77) e si associa ad una peggior sopravvivenza sia del graft che del paziente stesso (59), dall'altro questi dati si palesano solo nel lungo termine (in genere dopo 10 anni di trapianto) ed emergono da studi che hanno un limite significativo nella assenza di informazioni inerenti la valutazione istologica dell'epatopatia al momento del trapianto (41, 58, 75, 90, 92, 94, 98, 99, 131). In altri termini, in molti di questi lavori è mancata la selezione del candidato al momento della valutazione di idoneità. Altri studiosi non confermano la correlazione tra HCV-Ab positività e risultati del trapianto di rene, anche dopo un follow-up superiore a 10-15 anni. Per esempio, Forman et al. hanno dimostrato che le differenze di sopravvivenza (paziente e trapianto) tra riceventi HCV-Ab positivi ed HCV-Ab negativi scompaiono se sono considerati fattori di rischio quali, 2° trapianto, iperimmunità, durata della dialisi e trapianto da cadavere (132), condizioni che si riscontrano più frequentemente nel ricevente HCV-Ab positivo. Inoltre, Kamar et. al. hanno recentemente rilevato che la progressione della fibrosi epatica è più lenta nel trapiantato di rene HCV-Ab positivo, rispetto al paziente HCV-Ab positivo immunocompetente (133) ed in una elevata percentuale (50%) di trapiantati di rene HCV-Ab positivi in terapia con ciclosporina, hanno osservato l'assenza di progressione o addirittura la regressione della fibrosi epatica (134). Questo supporterebbe l'ipotesi che la ciclosporina possa avere anche in vivo un'azione inibente la replicazione del virus C così come è già stato dimostrato in vitro (135, 136). Infine, il trattamento con interferone, sebbene discretamente efficace, risulta particolarmente impegnativo e maltollerato nel paziente dializzato, e non sono noti ad oggi i suoi effetti benefici a lungo termine nel post-trapianto.

Non c'è dubbio che nel porre un'indicazione al trattamento antivirale pre-trapianto, bisogna tener conto di tutte queste considerazioni, oltre che di vari aspetti riguardanti il singolo paziente, quali l'età, le sue condizioni generali, le prospettive di vita, la tollerabilità del trattamento e la probabilità di risposta.

A questo punto, se si ritiene utile trattare tutte le forme di ECA, anche quelle lievi, allora l'esame istologico epatico deve essere sicuramente considerato necessario per la valutazione di tutti i pazienti HCV-RNA positivi.

## CONCLUSIONI

Il quadro istologico epatico più frequentemente riscontrato tra i pazienti uremici HCV-RNA positivi in trattamento dialitico, che accedono ad una valutazione di idoneità al trapianto di rene, è l'epatite cronica attiva (65%), ma nella stragrande maggioranza dei casi, le lesioni istologiche sono di grado lieve.

Escludendo dalla valutazione i pazienti con cirrosi clinicamente conclamata, la probabilità di riscontrare all'esame istologico un quadro di ECA non è correlata con le caratteristiche cliniche e bioumorali dei pazienti. Tuttavia, la condizione di ipertransaminasemia è un indice predittivo del grado di ECA. Infatti, solo i pazienti con ipertransaminasemia possono avere forme di epatite di grado moderato. In tutti gli altri casi l'esame istologico mostra quadri aspecifici o di ECA lieve.

Considerando che la prognosi dei pazienti uremici HVC-Ab positivi con ECA migliora dopo il trapianto di rene, e gli effetti negativi dell'epatopatia sulla sopravvivenza dei pazienti si manifestano solo a lungo termine (dopo 10-20 anni di trapianto), non c'è dubbio che essi debbano accedere direttamente al programma di trapianto. Ne segue, che in assenza di alterazioni delle transaminasi, la biopsia epatica non è necessaria per stabilire l'idoneità al trapianto. L'accertamento istologico deve invece essere sempre richiesto in presenza di segni di epatocitolisi transitoria o persistente. In questi casi è possibile riscontrare quadri di ECA di grado moderato, che potrebbero evolvere più rapidamente dopo trapianto, e per i quali è necessario sospendere il giudizio di idoneità e proporre un trattamento antivirale.

Tuttavia, per quanto ancora controverso, alcuni autori ritengono utile eseguire un trattamento antivirale a tutti i pazienti con ECA, anche se di grado lieve. Se si vuole sposare questa tesi, allora l'obiettivo che ci si pone non è solo stabilire l'idoneità al trapianto di rene del soggetto con epatite C, ma individuare tutti i pazienti con ECA. In quest'ottica la biopsia epatica diventa uno strumento irrinunciabile da proporre a tutti i pazienti HCV-RNA positivi indipendentemente dalla presenza o meno di ipertransaminasemia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Di Bisceglie A. *Hepatitis C*. Lancet 1998; 351: 351-55.
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome*. Science 1989; 244: 359-62.
3. Kaito M, Watanabe S, tsukiyama-Kohara K, et al. *Hepatitis C particle detected by immunoelectron microscopy study*. J Gen Virol 1994; 75: 1755-60.
4. Zignego A.L, de Carli M, Monti M et al. *Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from periferl blood and liver infiltrates in chronically infected patients*. J Med Virol 1995; 47: 58-64.
5. Lauer GM, Walzer BD. *Hepatitis C virus infection*. N Engl Med 2001; 345: 41-52.
6. 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: 2231-35.
7. Mc Quillan GM, Alter MJ, Moier LA, Lambert SB, Margolis HS. *A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States*. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and liver disease*, edizioni Minerva medica, Turin, 1997: 267-70.
8. Polish LB, Tong MJ, Co RL, Coleman PJ, Alter MJ. *Risk fators for hepatitis C virus infection among health care personell in a community hospital*. Am J Infect Control 1993; 21: 196-200.
9. Wyld R, Robertson JR, Brettle RP, et al. *Absence of hepatitis C virus transmission but frequent transmission of HIV-1 from sexual contact with doubly-infected individuals*. J Infect 1997; 35: 163-66.
10. Lin HH, Kao JH, Hsu HJ, et al. *Absence of infction in breast fed infants borne to hepatitis C virus infected mothers*. J Pediatr 1995; 126: 589-91.
11. Morelli C, Mosconi G. *Infezione HCV nella popolazione generale*. In *epatiti virali in nefrologia e dialisi*. Science Adv MI. 1998: 38-44.
12. Dolan M, *The hepatitis C handbook*. Catalyst Press London 1997.
13. CDC. *Recommendations for prevention and onrol of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease*. MMWR 1998; 47 (RR-19): 1-39.
14. Schvarcz R, Johansson B, Nyström B, Sonnenbörg A. *Nosocomial transmission of hepatitis C virus*. Infection 1997; 25: 74-77.

15. Mele A, Marzolini A, tosti ME, et al. *Seieva. Sistema epidemiologico integrato dell'epatite virale acuta. Rapporto 1995-96. Rapporti ISTISAN: Istituto Superiore di Sanità, 1997; 36: 1-57.*
16. Alter MJ. *The detection, transmission, and outcome of hepatitis C virus infection. Infect Agents Dis 1993; 2 (39): 155-66.*
17. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. *Randomised trial of interferon Alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. Lancet 1998; 352: 1426-32.*
18. Vrieling H, Reesink HW, Van Der Burg PJ, et al. *Performance of three generation of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. Transfusion 1997; 37: 845-49.*
19. Cribier B, Rey D, Schmitt C, et al. *High hepatitis C viremia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. AIDS 1995; 9: 1131-36.*
20. Agnello V, Chung RT, Kaplan RM. *A role for hepatitis C infection in type II crioglobulinemia. N Engl J Med 1992; 327: 1490-95.*
21. Beld M, Habibuw MR, Rebers SP, et al. *Evaluation of automated RNA-Extraction technology and a qualitative HCV assay for sensitivity and detection of HCV RNA in pool-screening system. Transfusion 2000; 40: 575-79.*
22. Pawlotsky JM. *Diagnostic tests for hepatitis C. J Hepatol 1999; 31: suppl 1: 71-79.*
23. Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. *Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 1999; 285: 110-13.*
24. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. *Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science 2000; 290: 1972-74.*
25. National Institutes of Health Consensus *Development Conference Panel. Statement: management of hepatitis C. Hepatology 1997; 26 suppl 1: 2S-10S.*
26. Farci P, Alter HJ, Schimoda A, et al. *Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. N Engl J Med 1996; 335: 631-34.*
27. Hoofnagle JH. *Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. Hepatology 1997; 26 suppl 15S-20S.*
28. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. *The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N Engl J Med 1999; 341: 556-62.*
29. Conry-Cantilena C, Van Raden M, Gibble J, et al. *Routes of infection viremia and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. N Engl J Med 1996; 334: 1691-96.*

30. Yano M, Kumada H, Kage M et al. *The long term pathological evolution of chronic hepatitis C*. Hepatology 1996; 23: 1334-40.
31. Seeff LB, Miller RN, Radkin CS, et al. *45- Year follow-up of hepatitis C virus oinfection in healty young adults*. Ann Intern Med 2000; 132: 105-11.
32. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C*. Lancet 1997; 349: 825-32.
33. Kenny-Walsh E. *Cinical outcome after hepatitis C infection from contaminated anti-D immunoglobulin*. N Engl J med 1999; 340: 1228-33.
34. Boletis J, Deladetsima J, Psimenou E, Unfiadi I, Tzala E, Katsoulidou A, Kostakis A, Hatzakis A, Vosnides G. *Liver biopsy is essential in anti-HCV positive renal transplant patients irrespective of liver function tests and serology for HCV*. Transplant Proc 1995; 27: 945-47.
35. Rao KV, Anderson WR, Kasiske BL, Dahl DC. *Value of liver biopsy in the evaluation and management of chronic liver disease in renal transplant recipients*. Am J Med 1993; 94: 214-50.
36. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. *Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis*. Hepatology 1981; 1: 431-435. Rew. J Hepatol. 2003 Apr; 38(4): 382-86.
37. Ishak KG. *Chronic hepatitis: morphology and nomenclature*. Mod Pathol 1994 Aug; 7(6): 690-713.
38. Co Stheman-Breen, Emerson S, Gretch D, RJ-Johnson. *Risk of death among chronic dialisys patients infected with hepatitis C virus*. Am J Kidney Dis 1998; 32: 629.
39. Pereira BJ, Natov SN, Bouthot BA, et al. *Effect of hepatitis C infection and renal transplantation on survival in end-stage renal disease*. Kidney Int 1998; 53: 1374-81.
40. Morales JM, Campistol JM. *Transplantation in the patient with hepatitis C*. J Am Soc Nephrol 1998; 9: 2344-48.
41. Bouthot BA, Murphy BVR, Schimd CH, et al. *Long-term follow-up of hepatitis C virus infection among organ transplant recipient*. Transplantation 1997; 63: 849-54.
42. Younossi ZM, Braun VE, Protiva DA, et al. *Chronic viral hepatitis in renal transplant recipients with allografts funtioning for more than 20 years*. Transplantation 1999; 67: 272-78.
43. Schena A, Dipolo S, Stallone G, Infante B, grandaliano G, Schena FP. *Infezione da HCV e trapianto renale*. GIN 18; 6: 735-44.

44. Hwang SJ. *Hepatitis C virus infection: an other view*. J Microbiol Immunol Infect 2001 Dec; 34 (4): 227-34.
45. Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, et al. *Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. N Engl J Med 1989; 321: 1506-10.
46. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, et al. *Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha : a multicenter randomized, controlled trial*. N Engl J Med 1989; 321: 1501-06.
47. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C Paris 26-28 february 1999, Consensus Statement. J Hepatology 1999; 30: 95-61.
48. Serfaty L, Aumatre H, Chzaouilleres O, et al. *Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis*. Hepatology 1998; 27: 1435-40.
49. Petrosillo N, Puro V, Ippolito G. *Prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus among dialysis patients*. Nephron 1993; 64: 636-39.
50. Fabrizi F, Lunghi G, Guarnori G, et al. *Virological characteristics of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients: a cross-sectional study*. Clin Nephrol 1995; 44: 49-55.
51. Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi, S et al. *Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis*. Am J Kidney Dis 2001; 38 (5): 1009-15.
52. Simon N, Courouce AM, Lemarrec N, Trepo C, Ducamp S. *A twelve year natural history of hepatitis C virus infection in hemodialyzed patients*. Kidney Int. 1994; 46 (2): 504-11.
53. Fabrizi F, Martin P, Lunghi G, Ponticelli C. *Storia naturale dell'infezione da virus dell'epatite C in dialisi*. GIN 2003; 5: 470-77.
54. Gilli P, Cavazzini L, Stabellini N, Malacarne F, Soffritti S, Storari A. *Histological features of non-A, non-B hepatitis in hemodialysis patients*. Nephron. 1992; 61 (3): 296-97.
55. Marcelli D, Fabrizi F, Lunghi G, Marai P, Guarnori I, Raffaele L, Erba G, Pagano A, Locatelli F. *Virological and histological features of hepatitis C virus (HCV) infection in kidney transplant recipients*. Nephrol Dial Transplant 1996; 11 (1): 159-64.

56. Caramelo C, Ortiz A, Aguilera B, Porres JC, Navas S, Marriott E, Alberola ML, Alamo C, Galera A, Garron MP, et al. *Liver disease patterns in hemodialysis patients with antibodies to hepatitis C virus*. Am J Kidney Dis. 1993; 22 (6): 822-28.
57. Stehman-Breen CO, Emerson S, Gretch D, Johnson RJ. *Risk of death among chronic dialysis patients infected with hepatitis C virus*. Am J Kidney Dis. 1998; 32 (4): 629-34.
58. Fabrizi F, Martin P, Ponticelli C. *Hepatitis C virus infection and renal transplantation*. AJKD 2001; 38 (5): 919-34.
59. Martin P, Friedman LS. *Chronic viral hepatitis and the management of chronic renal failure*. Kidney Int. 1995; 47 (5): 1231-41.
60. Chan TM, Lok ASF, Chang IKP. *Hepatitis C in renal transplant recipients*. Transplantation 1991; 52: 810-13.
61. Nampoory MR, Gupta RK, Johny KV, Costandi JN, Samhan M, Ninan VT, al-Muzairai IM, Mousawi M. *Organ-transmitted HCV infection in kidney transplant recipients from an anti-HCV negative donor*. Transplant Proc. 1999; 31 (8): 3207-08.
62. Rubin HH. *Infectious disease complications of renal transplantation*. Kidney Int 1993; 44: 221-36.
63. Pereira BJ et al. *Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation*. New Engl J Med 1991; 325: 454-60.
64. Natov SN et al. *Transmission of viral hepatitis by kidney transplantation: donor evaluation and transplant policies*. Transpl Infect Dis 2002; 4: 124-31.
65. Pereira BJ et al. *Prevalence of HCV RNA in Transmission of hepatitis C antibody positive cadaver organ donors and their recipients*. New Engl J Med 1991; 327: 910-15.
66. Tesi RJ et al. *Transmission of hepatitis C by kidney transplantation: the risks*. Transplantation 1994; 57: 826-31.
67. Roth D. *Hepatitis C virus infection and renal allograft recipient*. Nephron 1995; 71: 249-53.
68. Vincenti F et al. *Non transmission of hepatitis C from cadaver kidney donors to transplant recipients*. Transplantation 1993; 55: 674-75.
69. Roth D et al. *Detection of hepatitis C infection among organ donors: evidence for low transmission of disease*. Ann Intern Med 1992; 117: 470-75.
70. Morales JM et al. *Policies concerning the use of kidneys from donors infected with hepatitis C virus*. Nephrol Dial Transplant 2000; 15(suppl8): 71-73.

71. Gane E, Pilmore H. *Management of chronic viral hepatitis before and after renal transplantation*. Transplantation. 2002; 27 (4):427-37.
72. Pereira B, Levey A. *Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation*. Kidney Int 1997; 51: 981-99.
73. Morales JM, Campistol JM et al. *Hepatitis C virus and renal transplantation*. Curr Opin Nephrol Hypertens 1998; 7: 177-83.
74. Legendre et al. *Harmful long term impact of hepatitis C virus infection in kidney transplant recipients*. Transplantation 1998; 65: 667-70.
75. Meier-Kriesche HU et al. *Hepatitis C antibody status and outcomes in renal transplant recipients*. Transplantation 2001; 72: 241-44.
76. Snides GG. *Nephrology forum: hepatitis C in renal transplantation*. Kidney Int 1997; 52: 843-61.
77. Campistol JM, Esforzado N, Martinez J, Rosello L, Veciana L, Modol J, Casellas J, Pons M, de Las Cuevas X, Piera J, Oliva JA, Costa J, Barrera JM, Bruguera M. *Efficacy and tolerance of interferon- $\alpha$ (2b) in the treatment of chronic hepatitis C virus infection in haemodialysis patients : Pre- and post-renal transplantation assessment*. Nephrol Dial Transplant 1999; 14 :2704 –09.
78. Pol S, Debure A, Degott C, Carnot F, Legendre C, Brechot C, Kreis H. *Chronic hepatitis in kidney allograft recipients*. Lancet 335: 878-80, 1990.
79. Zylberberg F, Carnot F, Mamzer MF, Blanco G, Legendre C, Pol S. *Hepatitis C virus-related fibrosing cholestatic hepatitis after renal transplantation*. Transplantation 1997; 63:158-60.
80. Vosnides GG. *Nephrology forum: Hepatitis C in renal transplantation*. Kidney Int 1997; 52: 843-61.
81. Glicklich D, Kapoian T. *Should the hepatitis C positive end stage renal disease patient be transplanted ?* Semin Dial 1996; 9: 5-8.
82. Sandrini S, Chiappini R, Setti G, Carli O, Matricardi L, Puoti M, Callea F, Favret M, Maiorca R. *Hepatitis C virus infection after renal transplantation: Prevalence and course of morphologic lesions*. Transplant Proc 1998; 30: 2100-01.
83. Toth C. M, Pascual M, Chung R, Grame-Cook F, Dienstang J. L, Bhn A, Cosimi B. *Hepatitis C virus-associated fibrosing cholestatic hepatitis after renal transplantation*. Transplantation 1998; 66: 1254-58.
84. Cruzado JM, Carrera M, Torras J, Grinyo JM. *Hepatitis C virus infection and de novo glomerular lesions in renal allografts*. Am J Transplant 2001; 1: 171-78.

85. Mathurin P, Mouquet C, Poynard T, Sylla C, Benalia H, Fretz C, Thibault V, Cadranet JF, Bernard P, Opolon P, Coriat P, Bitker MO. *Impact of hepatitis B and C virus on kidney transplantation outcome*. Hepatology 1999; 29: 257-63.
86. Hestin D, Guillemin F, Castin N, Le Faou A, Champignulles J, Kessler M. *Pretransplant hepatitis C virus infection. A predictor of proteinuria after renal transplantation*. Transplantation 1998; 65: 741-44.
87. Morales JM, et al. *Transplantation in the patient with hepatitis C*. J Am Soc Nephrol. 2000 Jul;11 (7):1343-53.
88. Ynares et al. *Impact of pretransplant hepatitis C antibody status upon long-term patient and renal allograft survival a 5 and 10 year follow-up*. Transplant Proc 1993; 25: 1466-68.
89. Pol S et al. *Hepatitis C virus in kidney recipients. Epidemiology and impact on renal transplantation*. J Hepatol 1992; 15: 202-06.
90. Mosconi G, Scolari MP, Morelli C, Nardo B, Bertuzzi V, De Pascalis A, Donati G, Zambiaschi L, Buscaroli A, Stefoni S. *Renal transplantation and HCV hepatitis: a longitudinal study*. Transplant Proc 2001; 33: 1185.
91. Hanafusa T, Ichikawa Y, Kishikawa H, Kyo M, Fukunishi T, Kokado Y, Okuyama A, Shinji Y, Nagano S. *Retrospective study on the impact of hepatitis C virus infection on kidney transplant patients over 20 years*. Transplantation 1998; 66: 471-76.
92. Roth D, Zucker K, Cirocco R, et al. *Impact of hepatitis C virus infection on renal allograft recipients*. Kidney Int 1994; 45: 238-44.
93. Fritsche C, Brandes JC, Delaney SR, et al. *Hepatitis C is a poor prognostic indicator in black kidney transplant recipients*. Transplantation 1993; 55: 1283-87.
94. Stempel CA, Lake J, Kuo G, Vincenti F. *Hepatitis C- its prevalence in end-stage renal failure patients and clinical course after kidney transplantation*. Transplantation 1993; 55: 273-76.
95. Aroldi A, Elli A, Tarantino A, Lampertico P, et al. *Worse outcome in younger adult renal graft recipients with HCV infection. An 8-year prospective study*. Transplant Int 2000; 13(Suppl. 1): S90-S91.
96. Gentil MA, Lopez M, Gonzalez-Roncero F, et al. *Hepatitis C and the incidence of diabetes mellitus after renal transplant: influence of new immunosuppression protocols*. Transplant Proc 2003; 35: 1748-50.
97. Lee WC, Shu KC, Cheng CH, Wu MJ, Chen CH, Lian JD. *Long-term impact of hepatitis B, C virus infection on renal transplantation*. Am J Nephrol 2001; 21: 300-06.

98. Batty DS, Swanson SJ, Kirk AD, Agodoa LY, Abbott KC. *Hepatitis C virus seropositivity at the time of renal transplantation in the United States: associated factors and patient survival*. Am J Transplant 2001; 1: 179-84.
99. Bruchfeld A, Wilkczek H, Elinder CG. *Hepatitis C infection, time in renal replacement therapy and outcome after kidney transplantation*. Thesis dissertation, Karolinska Institute Press, November 2003.
100. Zucker K, Cirocco R, Roth D, Olson L, Burke GW, Nery J, Esquenazi V, Miller J. *Depletion of hepatitis C virus from procured kidneys using pulsatile preservation*. Transplantation 1994; 57: 832-40.
101. Bloom RD, Rao V, Weng F, Grossman RA, Cohen D, Mange KC. *Association of hepatitis C with posttransplant diabetes in renal transplant patients on tacrolimus*. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 1374-80.
102. Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, Martin P. *Transplantation of kidneys from HCV-positive donors: a safe strategy?* J Nephrol. 2003; 16 (5): 617-25.
103. Corell A, Morales JM, Mandrono A, Munoz MA, Andres A, Fuertes A, Arnaiz-Villena A. *Immunosuppression induced by hepatitis C virus infection reduces acute renal transplant rejection*. Lancet 1995; 346: 1497-98.
104. Mas V, Alvarellos T, Chiurciu C, Camps D, Massari P, De Boccardo G. *Hepatitis C virus infection after renal transplantation: viral load and outcome*. Transplantation Proceedings 2001; 33: 1791-93.
105. Rostaing L, Izopet J, Cisterne JM, Arnaud C, Duffaut M, Rumeau JL, Puel J, Durand P. *Impact of hepatitis C virus duration and hepatitis C virus genotypes on renal transplant patients*. Transplantation 1998; 65:930-36.
106. Bloom RD et al. *Outcome of hepatitis C virus-infected kidney transplant candidates who remain on the waiting list*. Am J Transplant 2005; 5: 139-44.
107. Zylberberg H et al. *Severe evolution of chronic hepatitis C in renal transplantation: A case control study*. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 129-33.
108. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy*. Science 1998; 282: 103-07.
109. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, et al. *A proposed system for nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology 1994; 19: 1321-24.
110. Tokars JJ et al. *National surveillance of dialysis associated diseases in the United States-1994*. ASAIO J 1997; 43: 108-19.

111. Schreiber GB et al. *The risk of transfusion-transmitted viral infections: The retrovirus Epidemiology Donor Study.* NEJM 1996; 334: 1685-90.
112. Stroffolini T, Menchinelli M, Taliani G. *High prevalence of hepatitis C virus infection in small central Italian town: lack of evidence of parenteral exposure.* Ital J gastroenterol 1995; 27: 235-38.
113. Ono K, Ono T, Matsumata T: *The pathogenesis of decreased aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activity in the plasma of hemodialysis patients: the role of vitamin B6 deficiency.* Clin Nephrol 1995; 43: 405-08.
114. Yasuda K, Okuda K, Endo N et al. *Hypoaminotransferasemia in patients undergoing long-term hemodialysis: Clinical and biochemical appraisal.* Gastroenterology 1995; 109: 1295-300.
115. Pol S, Romeo R, Zins B. *Hepatitis C virus RNA in anti-HCV positive hemodialysed patients: significance and therapeutic implications.* Kidney Int 1995; 47: 1412-08.
116. Alberti A, Morsica G et al. *Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV.* Lancet 1992; 340: 697-98.
117. 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.
118. Caramelo C, Bartolomè J et al. *Undiagnosed hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: Value of HCV RNA and liver enzyme levels.* Kidney Int 1996; 50: 2017-31.
119. Picciotto A, Varagona G et al. *Anti-hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus viraemia in hemodialysis patients.* Nephrol Dial Transplant 1993; 8: 1115-17.
120. Dussol B, De Lamballerie X et al. *Is hepatitis C virus RNA detection by nested polymerase chain reaction clinically relevant in hemodialysis patients?* Clin Nephrol 1996; 44: 49-55.
121. Martin P, Carter D et al. *Histopathological features of hepatitis C in renal transplant candidates.* Transplantation 2000; 69: 1479-84.
122. Ozdogan M, Ozgur O et al. *Histopathological impact of hepatitis virus infection in hemodialysis patients: should liver biopsy be performed before renal transplantation?* Artif Organs 1997; 21: 355.
123. Al Wakeel J, Malik GH et al. *Liver disease in dialysis patients with antibodies to hepatitis C virus.* Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 2265.

124. Toz H, Ok E, Yilmaz F et al. *Clinicopathological features of hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation.* J Nephrol 2002; 15: 308-12.
125. Abbott K, Lentine L et al. *The impact of transplantation with deceased donor hepatitis C-positive kidneys on survival in wait-listed long-term dialysis patients.* American Journal of Transplantation 2004; 4: 2032-37.
126. Rostaing L, Modesto A, Baron E et al. *Acute renal failure in kidney transplant patients treated with interferon alpha 2b for chronic hepatitis C.* Nephron 1996; 74: 512-16.
127. Fabrizi F, Bunnapradist S et al. *Treatment of HCV-related liver diseases after renal transplantation: modern views.* Int J Artif Organs 2003; 26: 373-82.
128. Kamar N, Toupance O et al. *Evidence that clearance of hepatitis C virus RNA after interferon therapy in dialysis patients is sustained after renal transplantation.* J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2092-98.
129. Bunnapradist S, Fabrizi F et al. *Hepatitis C therapy with long term remission after renal transplantation.* Int J Artif Organs 2002; 25: 1189-93.
130. Gonzalez-Roncero F, Gentil MA et al. *Outcome of kidney transplant in chronic hepatitis C virus patients: effect of pretransplantation interferon-alpha 2b monotherapy.* Transplant Proc 2003; 35: 1745-47.
131. Ponz E, Campistol JM et al. *Hepatitis C virus infection among kidney transplant recipients.* Kidney Int 1991; 40: 748-51.
132. Forman J, Tolckoff-Rubin N et al. *Hepatitis C, acute humoral rejection and renal allograft survival.* J Am Soc Nephrol 2004; 15: 3249-55.
133. Alric L, Di-Martino V et al. *Long-term impact of renal transplantation on liver fibrosis during hepatitis C virus infection.* Gastroenterology 2002; 123: 1494-99.
134. Kamar N, Rostaing L et al. *Natural history of hepatitis C virus-related liver fibrosis after renal transplantation.* American Journal of Transplantation 2005; 5: 1704-12.
135. Watashi K, Hijikata M et al. *Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes.* Hepatology 2003; 38: 1282-88.
136. Nakagawa M, Sakamoto N et al. *Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A.* Biochem Biophys Res Commun 2004; 313: 42-47.

