



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e
Gastroenterologiche - DISCOG**

Direttore: Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

UOC di Gastroenterologia

Direttore Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

TESI DI LAUREA

**Utilizzo del test rapido salivare per lo screening
dell'infezione da virus dell'epatite C nella
popolazione generale**

Relatore: Prof. Francesco Paolo Russo

Correlatore: Dott. Simionato Filippo

Laureanda: Aiša Bećović

Anno Accademico 2022/2023



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e
Gastroenterologiche - DISCOG**

Direttore: Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

UOC di Gastroenterologia

Direttore Chiar.mo Prof. Fabio Farinati

TESI DI LAUREA

**Utilizzo del test rapido salivare per lo screening
dell'infezione da virus dell'epatite C nella
popolazione generale**

Relatore: Prof. Francesco Paolo Russo

Correlatore: Dott. Simionato Filippo

Laureanda: Aiša Bećović

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	5
1 HCV	5
1.1 Storia	5
1.2 Epidemiologia	6
1.3 Modalità di trasmissione	9
1.4 Biologia virale	11
1.5 Ciclo virale	16
1.6 Storia naturale	20
1.7 Strumenti diagnostici e di monitoraggio	30
1.8 Iter diagnostico	33
1.9 Stadiazione dell'epatopatia da HCV	34
1.10 Trattamenti antivirali pre-DAAs	38
2 ANTIVIRALI AD AZIONE DIRETTA (DAAs)	40
2.1 Meccanismo d'azione	40
2.2 Goal terapeutico	41
2.3 Indicazioni al trattamento	42
2.4 Controindicazioni alla terapia	45
2.5 Farmaci attualmente disponibili	45
2.6 Follow up post-trattamento	48
3 SCREENING DELL'HCV	49
3.1 Obiettivo globale di eliminazione dell'HCV	49
3.2 Ruolo e scopo dello screening	50

3.3 Le principali raccomandazioni	50
3.4 Strategie di screening	52
3.5 Impatto della pandemia Covid-19	56
3.6 Situazione in Italia	57
SCOPO DELLO STUDIO	58
MATERIALI E METODI	59
RISULTATI	61
DISCUSSIONE	76
CONCLUSIONI	81
BIBLIOGRAFIA	83
ALLEGATO 1	91

ABSTRACT

Background and aim: a national screening program for the hepatitis C virus is ongoing in Italy, dedicated to individuals born between 1969 and 1989, who are estimated to have a high prevalence of undiagnosed cases, and to that population considered to be at high risk of infection, such as drug addicts and prisoners. The aim of the study was to extend the screening program to the general population, in order to increase the number of diagnosed cases and above all to reach the subjects unaware of the infection, that represent the main reservoir for the transmission of the hepatitis C virus (HCV), and to allow them to access to therapy with new direct acting antiviral drugs (DAAs).

Materials and Methods: The screening was carried out using a rapid salivary test (OraQuick® HCV Rapid Antibody Test), characterized by a sensitivity of 98.1% (CI 96.9-99.0%) and a specificity of 99.6% (99.2-99.9% CI). It is a manual immunological test lasting 20 minutes, with visual reading, for the qualitative detection of anti-HCV antibodies present in saliva. Before taking the test, all study participants were given a questionnaire that, not only allowed us to collect demographic data, but also to investigate the possible exposure to one or more of these specific HCV infection risk factors.

Results: The screening took place in Padua between January 2020 and October 2022, involved 1498 subjects, of which 638 participants were males (43%) and 823 (55%) females. Most of the people who participated in the study were Italian 1289 (86%), 42 were from the European Union (3%) and 56 were originally from outside of European Union (4%). The subjects were divided in three cohorts: 55% of them were born before 1968 (823 individuals), 29% of the sample (434) were born between 1969 and 1989, while those born after 1990 represent only 16% (241).

Considering some of the risk factors, only 30 of the 1498 had used drugs in the previous 6 months (2%); Most people were not regular users of alcohol (465, 31%), while 372 consumed alcohols in moderation (less than 3 units of alcohol/week (25%). Co-infections with HBV and HIV were

present in 1% of the population (18 people with HBV, 14 with HIV, but none of them resulted having HCV infection). Of 1498 subjects tested, 17 were positive for anti-HCV antibodies. However, only 3 of these patients were confirmed to be HCV-RNA positive, i.e., having an active infection. This screening program allowed us to obtain a prevalence of viremic infections of 0.2%.

Conclusions: Thanks to the collaboration between the Department of Gastroenterology of the Hospital-University of Padua with the General Practitioners, the Italian Red Cross of Padua and all the local administrations, it has been possible to promote and successfully conduct a screening campaign for HCV infection in the general population. The study demonstrated the applicability of a non-invasive test, using a saliva sample for the search of anti-HCV antibodies, which can be performed quickly (in about 20 minutes), in any context outside the hospital and without requiring special specialist training.

This type of screening program has allowed us to have an update of the prevalence of HCV which, according to our data, is decreasing compared to past years (0.2% vs 0.74-1.7%). In addition, it also confirmed that the peak of the prevalence of HCV infection is still among the individuals born before 1968 (0.13%).

RIASSUNTO

Contesto: Attualmente è in corso in Italia uno screening nazionale per il virus dell'epatite C dedicato alle persone nate tra il 1969 e il 1989, che si stima abbiano alta prevalenza di casi non diagnosticati, e ad alcune popolazioni a rischio come tossicodipendenti e detenuti nelle carceri.

Scopo dello studio: estendere il programma di screening alla popolazione generale al fine di aumentare il numero di casi diagnosticati e soprattutto per raggiungere i soggetti inconsapevoli dell'infezione che rappresentano il serbatoio per la trasmissione del virus, offrendo a tutti i cittadini (indiscriminatamente dall'età, nazionalità e presenza di fattori di rischio particolari) la possibilità di verificare il loro stato di infezione e, in caso di positività, accesso alla terapia con i nuovi farmaci antivirali.

Materiali e metodi: Lo screening è stato realizzato mediante l'utilizzo di test salivare rapido (OraQuick® HCV Rapid Antibody Test), caratterizzato da una sensibilità del 98.1% (IC 96.9-99.0%) e da una specificità del 99.6% (IC 99.2-99.9%). Si tratta di un test immunologico manuale della durata di 20 minuti, a lettura visiva, per la rilevazione qualitativa di anticorpi anti-HCV presenti nella saliva. Prima di eseguire il test, a tutti i partecipanti dello studio è stato somministrato un questionario che oltre a permetterci di raccogliere i dati demografici, indagava l'eventuale esposizione di questi soggetti a fattori di rischio specifici per l'infezione da HCV.

Risultati: Lo screening, condotto a Padova tra il gennaio 2020 e ottobre 2022, ha coinvolto 1498 soggetti, di cui 638 (43%) maschi e 823 (55%) femmine. La maggior parte delle persone che hanno partecipato allo studio erano Italiane 1289 (86%), 42 provenivano dall'Unione Europea (3%), 56 erano originarie al di fuori dell'Europa (4%). Le classi di età sono state utilizzate per individuare tre coorti: la maggioranza è data dai nati prima del 1968 (823, 55%), poi i nati tra 1969 e 1989 che rappresentano 29% del campione (434), mentre i nati dopo il 1990 solo il 16% (241). Per quanto riguarda alcuni fattori di rischio, solo 30 dei 1498 avevano fatto uso di sostanze stupefacenti nei 6 mesi precedenti (2%); la maggior parte

delle persone non erano consumatori abituali di alcol (465, 31%), mentre 372 ne assumeva con moderazione (meno di 3 unità alcoliche/settimana (25%)). Co-infezioni con HBV e HIV erano presenti in 1% degli indagati (18 persone con HBV, 14 con HIV). infine, dei 1498 soggetti sottoposti al test salivare, 17 sono risultati positivi. Tuttavia, in solo 3 di questi è stata confermata la positività, attraverso la successiva ricerca del HCV RNA. Questo ha permesso di ottenere una prevalenza di infezioni viremiche del 0,2%.

Conclusioni: Grazie alla collaborazione tra il reparto di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedale-Università di Padova con i Medici di Medicina Generale, la Croce Rossa Italiana di Padova e tutte le amministrazioni locali, si è riusciti a promuovere e condurre con successo una campagna di screening per l'infezione da HCV nella popolazione generale.

Lo studio ha dimostrato l'applicabilità di un test non invasivo, utilizzando un campione di saliva per la ricerca degli anticorpi anti-HCV, eseguibile in tempi rapidi (circa 20 minuti), in qualsiasi contesto al di fuori dall'ospedale e senza richiedere una formazione specialistica particolare. Questo tipo di programma di screening ha permesso di avere un aggiornamento della prevalenza dell'HCV che, secondo i nostri dati, risulta essere in calo rispetto agli anni passati (0,2% vs 0,74-1,7%). Inoltre, ha confermato che il picco di prevalenza è ancora nella popolazione nata prima del 1968 (0,13%).

INTRODUZIONE

1 HCV

1.1 Storia

Il virus dell'epatite C (HCV) è un virus a RNA appartenente al genere *Hepacivirus* della famiglia di *Flaviridae*.

L'inizio della sua storia risale agli anni '70 del secolo scorso, quando i medici ripetutamente documentavano i casi di epatite associata a trasfusioni, che spesso presentavano un decorso cronico e progressivo e non potevano essere attribuiti né al virus dell'epatite A (HAV), al virus dell'epatite B (HBV) né a qualsiasi altra causa nota (es. Citomegalovirus o Epstein-Barr virus). (1) Questo fenomeno era particolarmente diffuso nei pazienti con emofilia e nei pazienti che venivano trattati con immunoglobuline per via endovenosa, il che faceva pensare ad una malattia legata esclusivamente alle trasfusioni. Successivamente, per ricercarne la causa, furono condotti degli studi in una coorte di pazienti con epatite post-trasfusionale: Attraverso l'inoculazione del plasma/siero prelevato dai pazienti stessi negli scimpanzè sani, osservarono che questi ultimi sviluppavano un'epatite clinicamente apparente e fu così dimostrata, per la prima volta nel 1978, la presenza di un nuovo agente infettivo, considerato all'epoca responsabile del 90% di queste epatiti post-trasfusionali. (2)

L'isolamento dell'agente infettivo avvenne nel 1989 quando, per la prima volta, fu sequenziato il suo genoma. (3) Questo permise lo sviluppo del primo test diagnostico, basato sulla ricerca degli anticorpi anti-HCV (4) e successivamente anche l'introduzione di test basati sulla PCR in grado di identificare il virus stesso, ovvero l'HCV RNA, in soggetti che non avevano ancora sviluppato gli anticorpi. (5) La disponibilità dei test diagnostici ha reso possibile lo screening del sangue e dei suoi derivati che ha portato ad una riduzione della trasmissione iatrogena del virus.

Di pari passo alla ricerca traslazionale avveniva la ricerca clinica: attraverso i follow up di pazienti a lungo termine si iniziarono a comprendere il decorso e le conseguenze dell'infezione cronica da HCV – la cirrosi epatica e epatocarcinoma cellulare (HCC). (6)

Nel corso degli anni c'è stato un continuo progresso anche per quanto riguarda il trattamento dell'infezione. Si è passati dall'utilizzo di terapie aspecifiche, prima dell'IFN alfa in monoterapia (SVR<40%) e poi della terapia combinata che comprendeva (Peg) Interferone e Ribavirina (SVR>40%), all'utilizzo di cosiddetti antivirali ad azione diretta (DAAs), ovvero di farmaci che vanno ad interferire direttamente e in modo specifico con certe proteine virali necessarie per la replicazione del virus. I primi DAAs approvati nel 2011, inibitori delle proteasi NS3/4A boceprevir e telaprevir, venivano usati solo per il genotipo 1 e in combinazione con Peg-IFN-RBV in quanto in monoterapia portavano a sviluppo di resistenze. La triplice terapia portava alla SVR in circa 70% dei casi. Solo nel 2014, con l'introduzione di inibitori di NS5B polimerasi (sofosbuvir) è stato possibile passare al regime interferon-free e raggiungere una SVR superiore a 90%. (1)

1.2 Epidemiologia

All'inizio del 2020, è stato stimato che 56,8 milioni di persone nel mondo siano HCV RNA positive, con una prevalenza delle infezioni viremiche stimata allo 0.7-0.9%. (7) Questi dati suggeriscono una riduzione di infezioni viremiche e della prevalenza globale stimata l'ultima volta nel 2015 a 71.1 milioni di infezioni, con una prevalenza dell'1%. (8)

Tuttavia, lo sviluppo di una stima globale accurata rimane un problema a causa della scarsità e della bassa qualità di dati. Quello che si sa con certezza è che la prevalenza dell'infezione da HCV è fortemente variabile a seconda della regione geografica: La prevalenza dell'HCV è più alta in Africa e Medio Oriente, dove Egitto, Cameroon, Arabia Saudita, Iraq e Siria rappresentano la maggior parte dei casi, con una prevalenza che varia dal 2% al 15%. Nord America, Australia, Giappone ed Europa

settentrionale e occidentale riportano una minore prevalenza di infezione da HCV, con nessun paese che mostra un tasso > 2,5%. Cina, India, Egitto, Pakistan e Indonesia rappresentano circa la metà dei soggetti globali con infezione da HCV. (9)

La situazione in Europa è eterogenea: storicamente, i paesi dell'Europa settentrionale e occidentale presentano tassi di prevalenza molto bassi (< 1%), mentre i paesi meridionali e alcuni paesi orientali hanno tassi di prevalenza da intermedi ad alti (> 2,5%). In generale, le differenze osservate riflettono le modalità di trasmissione predominanti, che variano tra i paesi. (10)

Per il 2021, 29 Stati membri dell'UE/EEA hanno segnalato 14 560 nuovi casi di infezione da HCV, che corrispondono ad un'incidenza di 4,1 casi per 100 000 abitanti. I tassi specifici per paese variavano da <0,5 casi per 100.000 abitanti in Bulgaria, Grecia e Italia, a 58 casi per 100 000 abitanti in Lussemburgo. Complessivamente, i tassi più alti risultano essere nei paesi dell'Europa settentrionale e occidentale rispetto ai paesi dell'Europa meridionale. (11)

Figure 2. Distribution of newly diagnosed hepatitis C cases per 100 000 population by country*, EU/EEA, 2021

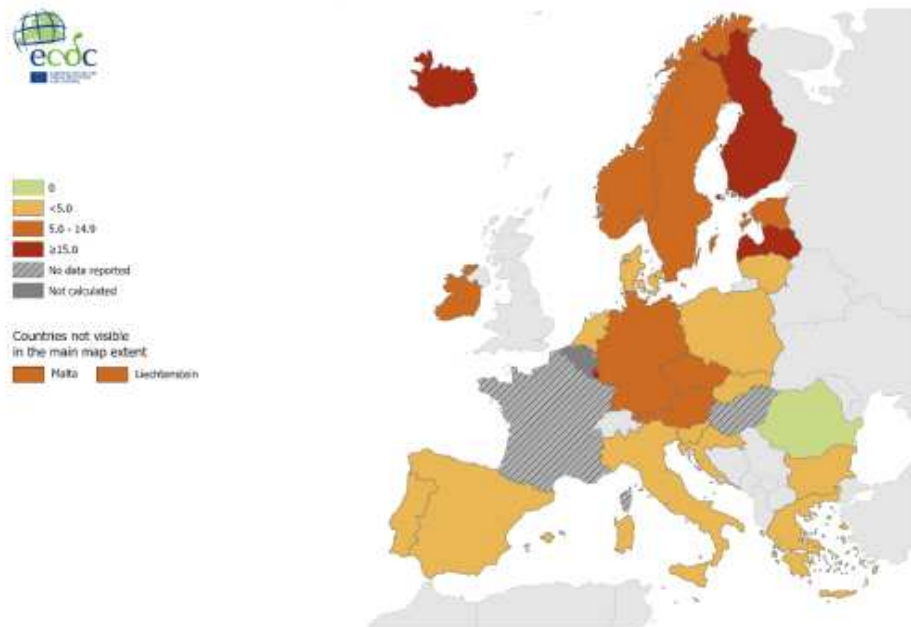


Figura 1 Fonte (11)

La distribuzione bimodale per età dell'infezione da HCV nella popolazione mondiale riflette la prevalenza dell'infezione che è alta sia negli individui

più anziani (di età >50 anni) che in quelli più giovani (di età compresa tra 20 e 40 anni). Questa distribuzione può variare da paese a paese ed è principalmente correlata alla fonte primaria di infezione; i paesi con alta prevalenza di soggetti che fanno uso di droghe per via endovenosa (PWID), avranno il picco di infezione tra i soggetti nella terza decade, mentre la popolazione infetta sarà più anziana (50-60 anni) nei paesi in cui la modalità dominante di trasmissione era (o lo è ancora) per via iatrogena. (11)

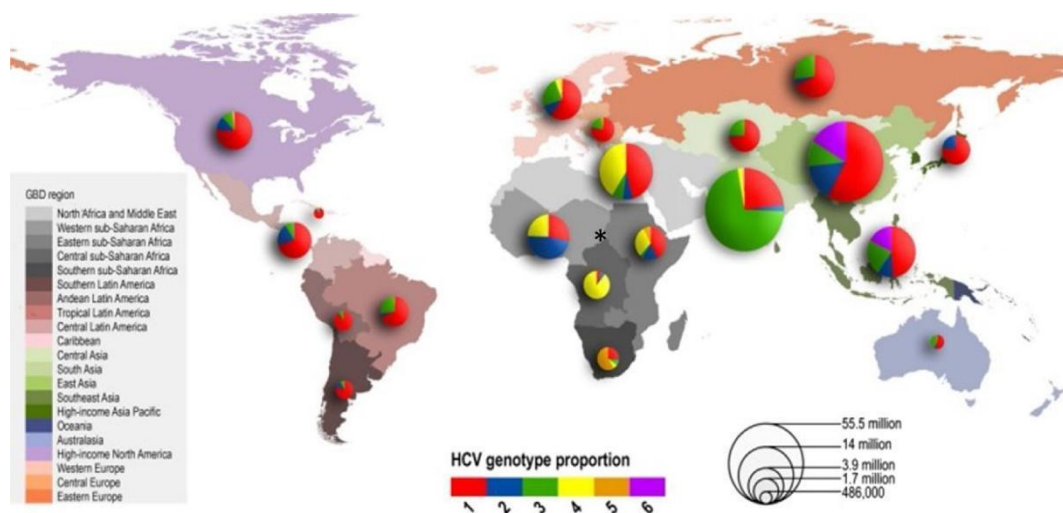


Figura 2

Un'altra caratteristica del HCV è l'estrema variabilità genomica che ha portato alla distinzione di almeno 6 genotipi diversi e all'interno di questi si possono identificare diversi sottotipi (nominati con a, b, c, etc.), distribuiti diversamente nel mondo. In particolare:

- Il genotipo 1, considerato anche il genotipo dominante a livello globale in quanto responsabile del 46% di tutte le infezioni, è diffuso soprattutto nei paesi a reddito alto o medio-alto: Nord America (1a), America Latina, Australia ed Europa (1b) dove costituisce 62-71% delle infezioni;
- Il genotipo 3, il secondo più comune a livello mondiale (25%), è prevalente in Asia centrale (soprattutto in India);

- Il genotipo 2 (13%) è più diffuso in estremo Oriente (Giappone, Taiwan, Cina);
- Il genotipo 4 invece è responsabile del 71% delle infezioni nei paesi a basso reddito come Nord Africa, in particolare in Egitto e nel Medio Oriente;
- I genotipi 5 (1%) e 6 (2%) sono più presenti in Africa meridionale e in Asia sudorientale, rispettivamente. (12,13)

In Italia, l'infezione con genotipi 1 (soprattutto 1b che rappresenta il 51%), 2 e 3 copre oltre il 90% dei casi di infezione da HCV, mentre sta diventando sempre più frequente il riscontro del genotipo 4 a causa dell'elevato flusso di immigrazione. (14)

Per quanto riguarda la mortalità, HCV è la causa di circa 400.000 decessi annuali, di cui due terzi sono attribuibili alla cirrosi scompensata e un terzo al carcinoma epatocellulare (HCC). (15)

1.3 Modalità di trasmissione

L'infezione da virus dell'epatite C è una malattia trasmessa per via ematica (parenterale), attraverso il contatto diretto con sangue infetto oppure indiretto attraverso i dispositivi contaminati (medici e non medici).

Prima dell'inizio dello screening del sangue dei donatori nel 1990, la trasfusione di sangue e di emoderivati è stata una delle principali vie di trasmissione nella maggior parte dei paesi del mondo, insieme ad altre procedure a rischio come il riutilizzo di siringhe di vetro per iniezioni mediche ed emodialisi a lungo termine. L'importanza di questi fattori di rischio nell'acquisizione dell'infezione, però, varia da paese a paese. Oggigiorno, nella maggior parte dei paesi industrializzati che hanno messo in pratica le misure di prevenzione necessarie, il rischio è sceso drasticamente. Tuttavia, l'adeguata sterilizzazione delle apparecchiature mediche (siringhe e aghi) o anche l'uso di attrezzature monouso non è la

regola in molti paesi in via di sviluppo, dove il rischio di infezioni iatrogene rimane ancora alto. (16)

L'uso promiscuo di droghe per via endovenosa rappresenta oggi il principale fattore di rischio per l'acquisizione del HCV, soprattutto nella popolazione più giovane. È la più comune modalità di trasmissione nei paesi industrializzati e in particolare negli Stati Uniti, dove rappresenta il 50-60% delle infezioni acute. Infatti, la prevalenza dell'HCV nella popolazione di tossicodipendenti che si iniettano le droghe è molto alta e si stima essere del 70-95% nei paesi ad alto reddito. (17)

Altre modalità possibili, ma molto meno comuni, sono la trasmissione verticale dalla madre al bambino, che può verificarsi durante il parto con un rischio stimato intorno a 6%, e la trasmissione sessuale nel caso di uomini con infezione da HIV che hanno rapporti sessuali non protetti con gli uomini (MSM). (18)

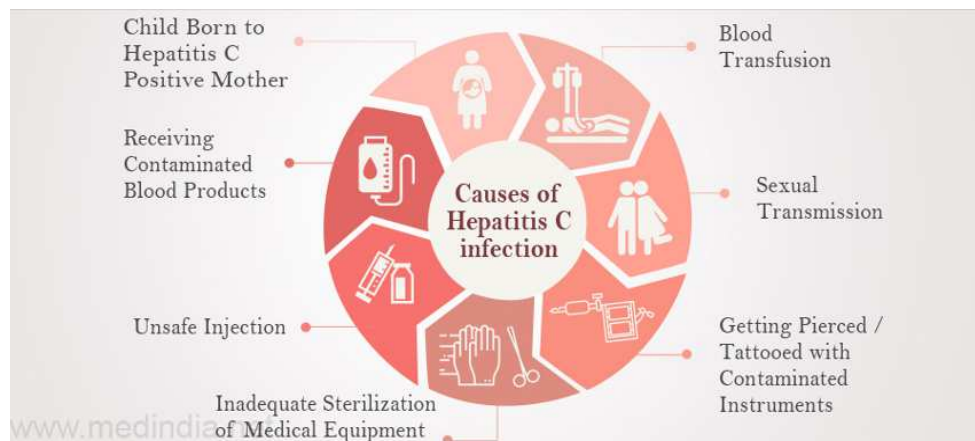


Figura 3

Nonostante oggi giorno non siano le modalità predominanti, le ferite da aghi tra gli operatori sanitari e la trasmissione da paziente a paziente rimangono ancora fattori di rischio per la trasmissione dell'HCV, così come l'esecuzione di tatuaggi o piercing in un ambiente non regolamentato. Tuttavia, in una percentuale considerevole (fino al 40% nel mondo occidentale) di pazienti con infezione da HCV nessun fattore di rischio può essere identificato (19)

1.4 Biologia virale

Virus dell'epatite C è l'unico membro del genere Hepacivirus della famiglia Flaviridae che comprende anche altri virus umani del genere Flavivirus trasmessi da artropodi, come il virus della febbre gialla, il virus del West Nile e il virus della febbre dengue. (20)

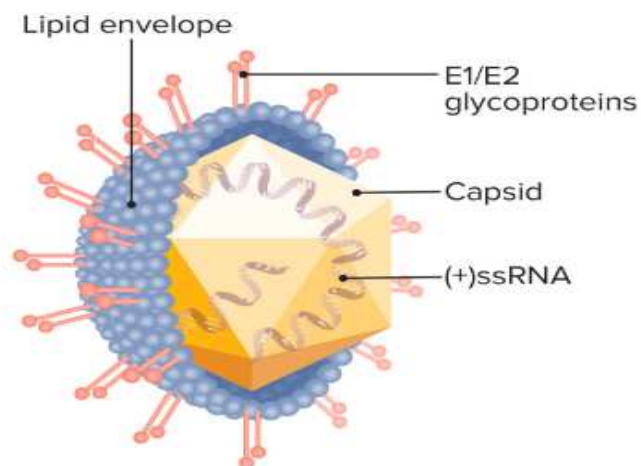


Figura 4

I virioni HCV hanno un diametro di 45-65 nm e sono avvolti in un doppio strato lipidico in cui sono ancorate le due glicoproteine dell'involucro, E1 ed E2. L'involucro circonda il nucleocapside non icosaedrico, che è composto da copie multiple della piccola proteina C del core basica, e contiene il genoma. Quest'ultimo è un RNA a filamento positivo di circa 9,6 kb, con un *Open Reading Frame* (ORF) che codifica per una singola poliproteina di circa 3.000 amminoacidi. Le proteine strutturali (core, E1 ed E2) sono codificate dalla parte aminoterminale del frame di lettura aperto, mentre la porzione rimanente codifica per le proteine non strutturali (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). (21) I virioni HCV sono associati alle lipoproteine a bassa densità dell'ospite (LDL) e alle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), formando le cosiddette *lipoviriparticles*. Le particelle lipovirali contengono anche l'apolipoproteina B (ApoB) e altre apolipoproteine scambiabili, come ApoC e ApoE.(22) L'esatta natura delle interazioni coinvolte tra i componenti del virione dell'HCV e le lipoproteine rimane ancora indeterminata, ma questa potrebbe contribuire al mascheramento delle glicoproteine E1 ed E2 dalla

risposta immunitaria dell'ospite e spiegare la scarsa rilevazione o disponibilità di glicoproteine HCV sulla superficie del virione. (20)

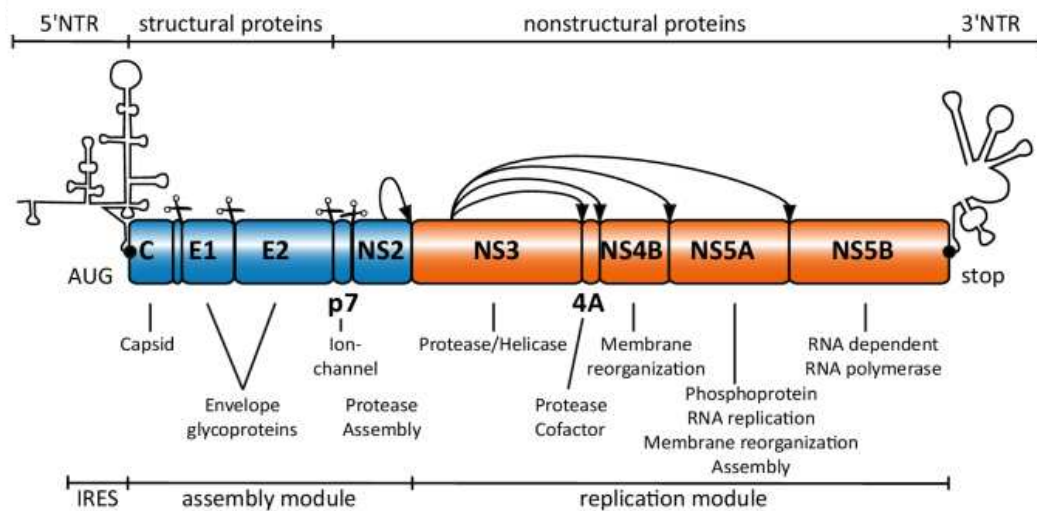


Figura 5 Fonte (23)

Le due estremità sono delle regioni non codificanti a funzione regolatrice. L'estremità 5' UTR dell'HCV RNA, di 341 basi, è la porzione più conservata del genoma e contiene quattro domini altamente strutturati, numerati da I a IV, caratterizzati da numerosi stem-loop e uno pseudoknot. I domini II, III e IV insieme ai primi 12-30 nt della regione codificante il core costituiscono l'IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), che ha la capacità di formare un complesso di pre-inizio stabile, legando direttamente la subunità ribosomiale 40S, un evento che costituisce il primo passo della traduzione poliproteica dell'HCV. (24)

L'estremità 3' UTR, di circa 27 basi, invece, è organizzata in tre regioni tra cui: una regione variabile di circa 30-40 nt, un lungo tratto poli(U)-poli(U/UC) e un tratto 3'-terminale (3' X regione) altamente conservato di 98 nt che comprende tre strutture ad anello: SL1, SL2 e SL3. Il 3'UTR interagisce con l'NS5B RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) e risulta essenziale per la replicazione dell'RNA virale. (24)

L'ORF dell'HCV contiene da 9024 a 9111 nt a seconda del genotipo e come già accennato, codifica per una poliproteina di circa 3000 amminoacidi, che dopo essere stata clivata dalla parte di proteasi sia virali che umane, genera 10 proteine virali mature, distinte in:

- o strutturali (*proteina C del core o capside e le glicoproteine E1 ed E2*)
- o non strutturali (*viroporina p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B*), implicate nell'assemblaggio del virus e nella replicazione dell'RNA. (25)

Proteina C del core è una RNA-binding protein di 191 amminoacidi e di dimensioni che variano tra 17 e 23 kDa. Al suo interno si distinguono tre domini funzionali: un dominio N-terminale idrofilo di 120 aa (dominio D1), un dominio C-terminale idrofobico di circa 50 aa (dominio D2) e gli ultimi 20 circa aa che fungono da peptide segnale per la glicoproteina E1 dell'involucro. Il dominio D1 è principalmente coinvolto nel legame all'RNA e nella localizzazione nucleare; dominio D2 invece è responsabile dell'associazione delle proteine del core con le membrane del reticolo endoplasmatico (ER), le membrane dei mitocondri esterni e con le goccioline lipidiche. (22) Oltre a partecipare alla formazione del nucleocapside virale, questa proteina ha tante altre funzioni: può essere pro e anti-apoptotica (26), stimola la crescita degli epatociti nella linea cellulare Huh-7 e sembra essere implicata nel danno tissutale e nella progressione della fibrosi. (27)

Le due glicoproteine dell'envelope, E1 ed E2, di dimensioni 35kDa e 70kDa, rispettivamente, sono i principali determinanti virali dell'ingresso dell'HCV nelle cellule bersaglio. Ogni proteina è costituita da un grande ectodominio N-terminale, responsabile dell'attaccamento del virus ai suoi recettori, e da un dominio transmembrana C-terminale, che ancora ogni glicoproteina in un doppio strato lipidico. Queste proteine formano un eterodimero non covalente all'interno delle cellule infette, mentre si assemblano come grandi complessi covalenti stabilizzati da legami disolfuro sulla particella virale. (28)

Le regioni E1 ed E2 del genoma dell'HCV mostrano il più alto tasso di mutazione a livello nucleotidico e a livello di aminoacidi. (29) La glicoproteina E2 contiene regioni ipervariabili con sequenze aminoacidiche che differiscono fino all'80% tra genotipi e tra sottotipi dello stesso genotipo. Nello specifico, la regione ipervariabile 1 (HVR1) contiene 27 aa ed è un importante (ma non l'unico) epitopo neutralizzante dell'HCV. Difatti, la presenza di questa regione in rapida evoluzione può rappresentare un meccanismo attraverso il quale l'HCV elude la sorveglianza immunitaria dell'ospite, stabilisce e mantiene l'infezione persistente.(20) Mentre E2 svolge un ruolo cruciale nelle prime fasi dell'infezione, ovvero ha un ruolo nel riconoscimento e attaccamento delle cellule ospiti tramite l'interazione con uno o più componenti del complesso recettoriale (es. CD81, eparan-solfato), si pensa che E1 sia coinvolto nella fase successiva di fusione virus-membrana intracitoplasmatica.

p7 è una piccola proteina, formata da 63 aa. Presenta due domini transmembrana, organizzati in alfa eliche e connessi da un loop citoplasmatico. Gli studi in vitro suggeriscono che la proteina p7 appartiene alla famiglia delle viroporine e potrebbe agire come un canale ionico del calcio implicato nel rilascio delle particelle virali. (24,30) Tuttavia, le sue funzioni non sono ancora del tutto comprese e sono da verificare in vivo.

NS2 è una proteina transmembrana non glicosilata di 21–23 kDa che, insieme al dominio N-terminale della proteina NS3 costituisce una metalloproteasi zinco-dipendente che taglia il sito tra NS2 e NS3. Ha una vita di breve durata in quanto, dopo aver svolto la sua attività proteolitica, viene degradata dal proteasoma. (24)

NS3 è una proteina multifunzionale contenente un dominio serin-proteasico nel suo terzo N-terminale e un dominio elicastico / NTPasico nei suoi due terzi C-terminali, la cui funzione principale è di permettere l'RNA-binding durante la replicazione virale.

La proteina NS4A, e in particolare la sua regione centrale (aa 21-30) agisce da cofattore nell'attività del dominio serin-proteasico della NS3, permettendone la stabilizzazione, la localizzazione sulla membrana ER e l'attivazione cleavage-dependent.(31)

Il complesso NS3-NS4A catalizza la scissione della poliproteina HCV nelle giunzioni NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B. È un elemento essenziale per il ciclo vitale dell'HCV e non sorprende il fatto che rappresenta uno dei principali bersagli dei nuovi farmaci antivirali. NS3-4A ha anche proprietà aggiuntive attraverso la sua interazione con le vie e le proteine delle cellule ospiti. Infatti, si pensa che l'HCV potrebbe utilizzare la proteasi NS3-4A per aggirare la risposta immunitaria innata nelle prime fasi dell'infezione. (24)

NS4B è una proteina integrale di membrana di 261 aa con una localizzazione reticolo endoplasmatica. Tra le numerose funzioni di NS4B abbiamo: quella di fungere da ancoraggio alla membrana per il complesso di replicazione (32), l'inibizione delle sintesi cellulari, la modulazione dell'attività di HCV NS5B polimerasi e l'induzione dell'interleuchina 8. (24)

NS5A è una zinco-metalloproteina fosforilata di 56-58 kDa che svolge un ruolo importante nella replicazione del virus. I meccanismi con cui regola la replicazione dell'HCV non sono del tutto chiari ma si è visto che NS5A si associa a zattere lipidiche derivate da membrane intracellulari attraverso il suo legame alla regione C-terminale di una proteina associata alla membrana delle vescicole di 33 kDa (hVAP-33). (33) Questa interazione sembra essere cruciale per la formazione del complesso di replicazione dell'HCV. Inoltre, NS5A sembra svolgere un ruolo nella resistenza all'interferone legandosi e inibendo PKR, un effettore antivirale dell'interferone- α . (34)

NS5B o RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), è l'enzima centrale della replicazione dell'HCV ed è responsabile dell'amplificazione dell'RNA virale. Si trova al C-terminale della poliproteina precursore, è lunga 66 kb e mostra una tipica forma "right handed" caratterizzata da tre domini definiti: dominio delle dita, del palmo e del pollice. Questa struttura di

NS5B RdRp è altamente conservata in tutti i genotipi di HCV, rendendo i farmaci che mirano ad inibirla ugualmente efficaci contro ciascuno di essi.
(35)

1.5 Ciclo virale

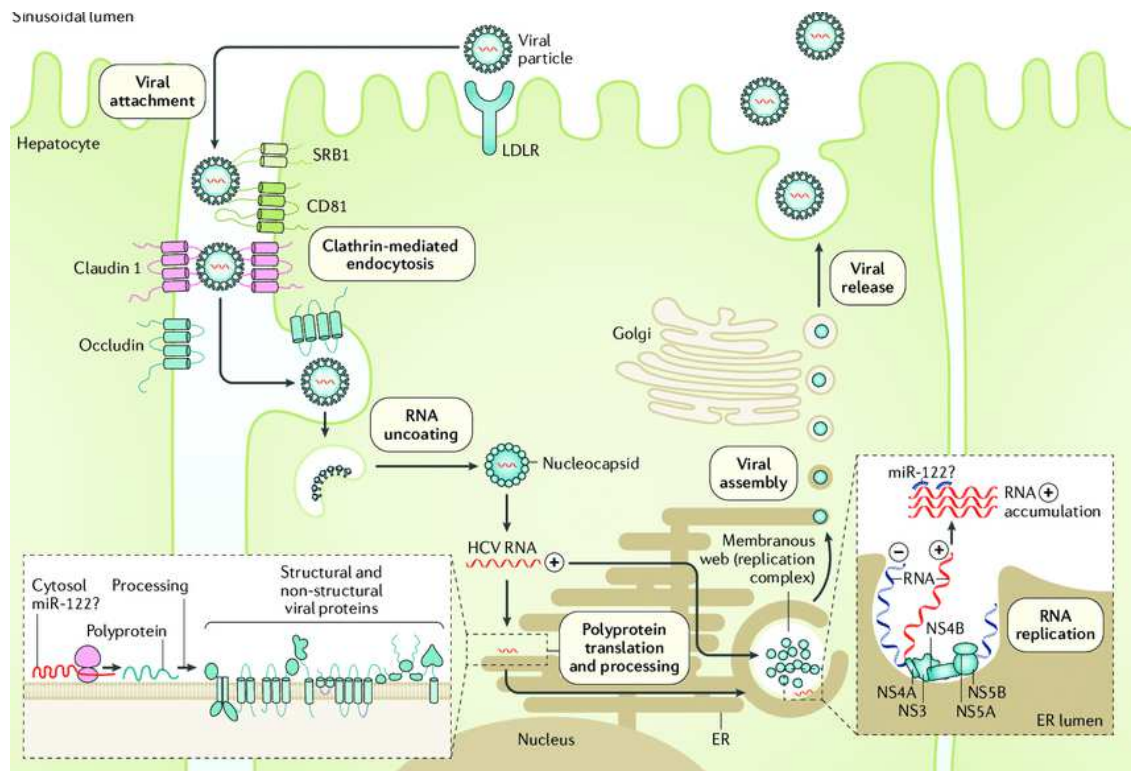


Figura 6 Rappresentazione schematica del ciclo vitale del virus dell'epatite C. Fonte (19)

Il ciclo vitale dell'HCV inizia con l'adesione delle particelle virali alla membrana baso-laterale dell'epatocita a contatto con il flusso ematico. L'HCV è un virus pH-dipendente, il che implica che i suoi componenti recettoriali mediano l'internalizzazione del virione mediante endocitosi. Il meccanismo di ingresso dell'HCV è un processo multi-step che si basa su diversi fattori dell'ospite, tra cui:

- o CD81 – una proteina della famiglia delle tetraspanine (TSPAN28); si trova sulla superficie di numerosi tipi cellulari, tra cui epatociti e linfociti B, dove forma omo- e/o eterodimeri, per mezzo di un'interfaccia idrofobica conservata. CD81 contiene quattro domini transmembrana idrofobici (da TM1 a TM4) e due domini

extracellulari: *small extracellular loop* (SEL) e il *large extracellular loop* (LEL). Il SEL è necessario per avere un'espressione superficiale ottimale del LEL, mentre il LEL è la porzione del CD81 che interagisce con la glicoproteina E2 dell'HCV, permettendo la sua adesione alla cellula bersaglio. (36)

- o Recettore LDL – è un recettore endocitico che trasporta le lipoproteine a bassa densità nelle cellule attraverso l'endocitosi mediata dal recettore. È stato dimostrato che l'endocitosi dell'HCV mediata dal recettore LDL è mediata dal complessamento del virus con le VLDL o LDL. Anche se sembrava che HCV potesse associarsi con le HDL presenti nel siero, non è stato possibile dimostrare un'endocitosi HDL-mediata. (37)

Negli studi condotti in vitro, utilizzando gli anticorpi anti-LDLR si otteneva una completa inibizione di endocitosi dell'HCV mediata da questo recettore, il che suggerisce che il recettore LDL potrebbe essere il meccanismo principale per l'ingresso dell'HCV in cellule. Tuttavia, il rilevamento di piccole quantità di HCV intracellulare nei fibroblasti LDL-carenti precedentemente inoculati con HCV suggerisce che ci siano altre molecole che mediano l'ingresso del virus in queste cellule (non essendo espresso il recettore, non poteva essere inibito dall'anticorpo anti-recettore LDL). (37)

- o Scavenger Receptor class B type 1 (SR-B1) – è una glicoproteina di 509 aminoacidi composta da un grande loop extracellulare ancorato alla membrana plasmatica attraverso le sue due estremità N- e C-terminale. Questa proteina è espressa ad alti livelli negli epatociti e nelle cellule steroideogene; Infatti, il ligando naturale del SR-B1 sono le lipoproteine ad alta densità (HDL), che vengono internalizzate tramite un processo di endocitosi non dipendente da clatrina che media l'uptake di colesterolo e il riciclo delle HDL. (35) È stato dimostrato che il recettore SR-B1 è necessario per l'infezione anche delle cellule epatiche che esprimono CD81 e LDLR. In più, si è visto che è la regione iper-variabile 1 (HVR1) della glicoproteina E2 il determinante critico che media l'ingresso del virus nelle cellule esprimenti SR-B1. (38)

- o Glicosaminoglicani (GAG) – è stato dimostrato che i proteoglicani dell'eparan-solfato (HSPG) espressi sulla superficie cellulare svolgono un ruolo importante nel mediare l'interazione HCV-cellula bersaglio. La glicoproteina E2 del virus, in particolare la sua regione ipervariabile HVR-1, stabilisce un legame ad alta affinità con i proteoglicani dell'eparan-solfato (HSPG). Questa interazione è stata confermata dalla degradazione dell'eparan solfato dalla superficie cellulare, attraverso l'utilizzo dell'eparinasi, che ha determinato una marcata riduzione della formazione del legame E2-HSPG. Si pensa che HSPG possa servire come un iniziale sito di attacco per la particella virale che successivamente viene trasferita ad un altro recettore (o un complesso recettoriale) che innesca il suo ingresso nella cellula. (39)
- o Claudina-1 (Cldn1) e occludina (OCLN) – sono entrambe proteine integrali di membrana di 60 e 22.7 kDa, rispettivamente, che contribuiscono alla formazione delle giunzioni occludenti (*tight junctions*) tra le cellule adiacenti. Sono espresse da molti organi, incluso il fegato, dove normalmente partecipano alla formazione della barriera emato-biliare. CLDN1 e OCLN svolgono un ruolo importante nel mediare l'ingresso dell'HCV nell'epatocita umano. La CLDN1 è stata descritta come un fattore d'ingresso tardivo dell'HCV, al contrario di HSPG, LDLR, SR-BI e CD81 che invece hanno un ruolo nell'attaccamento precoce del virus sulla superficie cellulare. L'interazione fisica di CD81 e dell'eterodimero gp E1-E2 con CLDN1, è un prerequisito per l'instaurazione dell'infezione. (40) Vista la loro importanza nell'instaurarsi dell'infezione, queste molecole rappresentano i target dei cosiddetti *Host-Targeting Agents (HTA)* che sono al centro delle attuali ricerche volte a offrire approcci terapeutici alternativi o complementari per i pazienti con infezione da HCV. (41)

L'attuale modello accettato di infezione da HCV è che le particelle virali associate alle lipoproteine, che circolano nel sangue, usano glicosaminoglicani e / o il recettore LDL sulle cellule ospiti come fattori di attaccamento iniziali. Dopo il legame, la particella HCV interagisce con

SR-BI e CD81 e viene successivamente rilocalizzata nella proteina della giunzione stretta (TJ) claudina-1 (CLDN1) (6). Successivamente, la particella HCV viene internalizzata tramite endocitosi mediata da clatrina, seguita dalla fusione virale, che si verifica negli endosomi precoci (Rab5a). Dopo la fusione, il genoma dell'HCV viene rilasciato nel citosol, dove viene direttamente tradotto per produrre proteine virali e avviare la replicazione virale.

L'IRES nel 5'UTR media l'inizio della traduzione del genoma dell'HCV che genera una grande poliproteina di 3000 amminoacidi. Questa poi viene clivata da diverse proteasi virali (autoproteasi NS2-3 zinco-dipendente) e cellulari (SPP), generando le proteine strutturali e non strutturali dell'HCV. (24)

Dopo la traduzione, le proteine HCV sono associate a membrane derivate dal reticolo endoplasmatico. Insieme, le proteine virali non strutturali, NS3/4A, NS4B, NS5A e NS5B costituiscono il complesso di replicazione, che replica il genoma dell'RNA di senso positivo attraverso un filamento intermedio negativo. La RNA polimerasi RNA-dipendente virale NS5B è l'enzima chiave della sintesi dell'RNA. I genomi dell'RNA nascente vengono tradotti per produrre nuove proteine virali, servono da stampo per la replicazione di nuovi filamenti di RNA e vengono progressivamente assemblati per formare virioni infettivi. (20)

La replicazione dell'HCV dipende dal microRNA 122 (miR-122), un microRNA specifico del fegato che recluta Argonaute 2 all'estremità 5' del genoma virale, stabilizzandolo e rallentandone la degradazione da parte dell'esonucleasi 5' Xrn1. Poiché è essenziale per la replicazione dell'HCV, è stato identificato come un potenziale bersaglio antivirale. (42)

Infine, l'assemblaggio virale non è ancora stato completamente descritto. Il fatto che le glicoproteine dell'involucro HCV E1 ed E2 si associano alle membrane del reticolo endoplasmatico attraverso il loro dominio transmembrana, suggerisce che l'assemblaggio del virus avviene qui. (42)

1.6 Storia naturale

L'HCV è un virus che infetta principalmente gli epatociti, ma non solo, causando inizialmente un'infezione acuta che, nella stragrande maggioranza dei casi (75-85%) evolve in un quadro di epatite cronica. Solo un 10-20% dei casi ottiene una clearance spontanea con immunità naturale.

Sia la risposta immunitaria innata, attraverso le cellule Natural Killer (NK) che quella adattativa giocano un ruolo importante nella clearance virale dell'HCV. (19)

Le cellule Natural Killer (NK) sembrano essere coinvolte nella risoluzione dell'infezione da HCV, mentre la produzione di anticorpi neutralizzanti e le cellule T dell'immunità adattativa (T CD4+ e T CD8+) sono solitamente coinvolte nel controllo dell'infezione. Data l'elevata variabilità genetica dell'HCV, gli anticorpi neutralizzanti possono essere però protettivi solo contro alcuni epitopi e una rapida induzione della loro produzione è stata associata al controllo dell'infezione. (43,44)

La persistenza dell'infezione può essere attribuita ad una insufficiente oppure precoce perdita della risposta delle cellule T.

Infatti, diversi studi hanno dimostrato una riduzione della frequenza e della proporzione di sottopopolazioni di cellule T circolanti quando l'infezione da HCV inizia a cronicizzare. (45)

Uno studio condotto su scimpanzé ha dimostrato che la perdita dell'attività delle cellule T-helper (T CD4+) permette l'evasione delle cellule citotossiche (T CD8+) e la persistenza virale. (46)

HCV ha sviluppato anche diversi meccanismi di evasione della risposta immunitaria innata. Ad esempio, la proteasi virale NS3/4A è in grado di inattivare in modo efficiente due molecole importanti nel riconoscimento dei PAMPs dell'HCV e implicate nelle vie di segnale dell'ospite che portano all'attivazione della via di IFN α . Nonostante ciò, l'espressione dei geni stimolati dall'IFN avviene durante la fase acuta e si mantiene elevata nella maggior parte dei soggetti in cui l'infezione cronicizza e questo si associa ad una scarsa risposta ai trattamenti basati sull'Interferone. (45)

Il decorso naturale, e quindi l'esito clinico dell'infezione acuta e cronica da HCV, è come in ogni malattia infettiva: il risultato dell'interazione tra l'agente infettivo e l'ospite, in particolare, il sistema immunitario geneticamente determinato del paziente.

Il livello di replicazione virale (misurato come livelli di HCV nel sangue) non predice il decorso naturale e l'esito della malattia, ma è stato ed è ancora un predittore della risposta al trattamento, in particolare, nella (PEG) IFN più ribavirina era; è di minore importanza per il trattamento DAA. Tuttavia, i genotipi virali differiscono nel decorso clinico e nella risposta al trattamento. (19)

- **Epatite acuta**

Con l'infezione acuta da HCV si intende la persistenza dell'HCV-RNA rilevabile per meno di 6 mesi dopo l'esposizione al virus. Epatite acuta ha un andamento abbastanza dinamico con livelli di transaminasi e HCV-RNA fluttuanti nel tempo.(47) Il primo segno rilevabile di infezione è la viremia. Tuttavia, immediatamente dopo l'esposizione, il carico virale è molto basso e può anche essere sotto la soglia di rilevamento nel sangue. Questo periodo è chiamato "fase pre ramp-up" e di solito dura 7-21 giorni, anche se la viremia intermittente di basso livello può persistere fino a 2 mesi. Dopo questo periodo, si osserva un aumento esponenziale dei livelli di HCV RNA, definito "ramp-up". Questa fase può durare 8-10 giorni, seguita da una fase di "plateau" in cui i livelli di HCV RNA si stabilizzano. Di solito dura 40-60 giorni ed è seguita da una clearance spontanea o dalla progressione verso l'infezione cronica con stabilizzazione dei titoli di HCV RNA a lungo termine. (48)

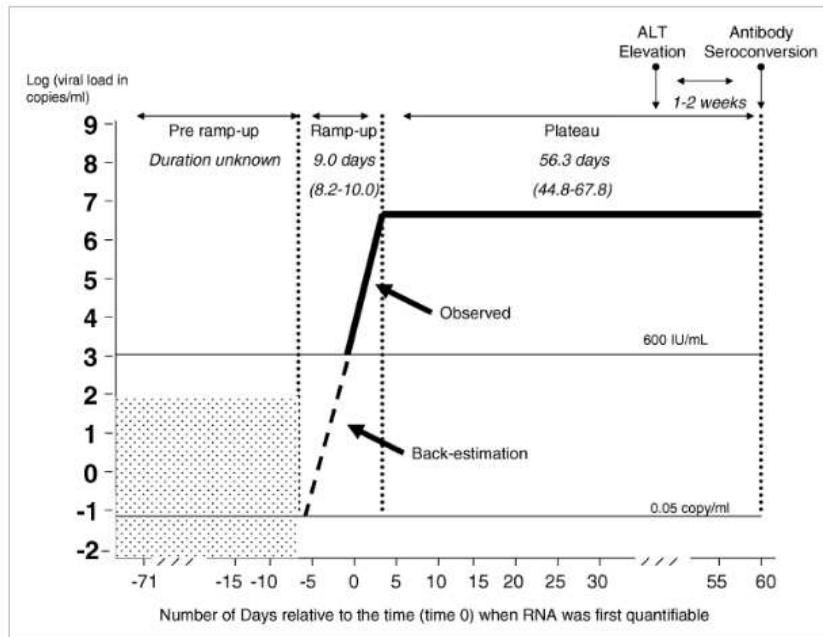


Figura 7 Andamento temporale della rilevazione del HCV-RNA dopo l'esposizione. Fonte (48)

La fase di plateau dell'infezione è accompagnata da un aumento delle transaminasi. Questo può essere il primo segno rilevabile di infezione acuta da HCV, soprattutto in pazienti con una storia di esposizione poco chiara. I livelli di ALT di solito raggiungono il picco a 500 UI/ml, anche se in molti soggetti si possono osservare livelli più elevati. Il tempo mediano necessario ad osservare un aumento delle ALT è di circa 46 giorni (range 6-112 giorni) ed è solitamente accompagnato da un calo della carica virale. I livelli di ALT tornano alla normalità nei pazienti che eliminano l'HCV, ma di solito rimangono elevati nei pazienti che progrediscono verso l'infezione cronica. (49) La sierconversione segue l'aumento dei livelli di ALT e di solito si verifica durante l'ultima parte della fase di plateau con anticorpi anti-HCV che compaiono per la prima volta 7-12 settimane dopo l'esposizione. La comparsa di anticorpi anti-HCV è anche accompagnata da un calo dei livelli di HCV RNA. (47)

Clinicamente, la maggior parte dei casi di epatite C acuta passano inosservati. Infatti, i sintomi sono evidenti solo in una minoranza di pazienti (20-33%) e di solito compaiono in concomitanza con l'aumento delle

transaminasi. Il tempo medio di presentazione sintomatica è di 9 settimane (intervallo 2-12 settimane) dall'esposizione al virus. (50)

I sintomi comunemente riportati sono simil-influenzali, aspecifici e includono: affaticamento, nausea, dolore addominale nel quadrante superiore destro, perdita di appetito, febbre lieve, prurito, mialgia o artralgia. Il segno più specifico è l'ittero che si sviluppa nel 50-84% dei pazienti sintomatici. (50).

Sono stati descritti casi di epatite fulminante e insufficienza epatica acuta, ma sono estremamente rari. (51)

Sebbene la maggior parte degli studi abbia rilevato che l'infezione acuta in genere si risolve tra 3 e 6 mesi dopo l'esposizione, la clearance virale può essere ritardata in modo significativo in alcuni individui, anche fino a 3 anni dopo l'esposizione. (52)

Il tasso di eliminazione spontanea varia ampiamente da 26 a 40% di infezioni acute ed è influenzato da una serie di fattori, sia dell'ospite che del virus. Fattori come il sesso femminile e una presentazione sintomatica dell'infezione con comparsa dell'ittero, si associano ad una maggior probabilità di clearance virale e quindi minor rischio di cronicizzazione.(51)

Diversi fattori genetici, tra cui l'ereditarietà di un polimorfismo del gene dell'interleuchina-28 (*IL28B*) che codifica per l'interferone di tipo III IFN- λ 3, e l'allele *DQB1*0301* del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II si associano allo sviluppo di una robusta risposta immunitaria all'infezione acuta, che alla fine porta a una maggiore probabilità di clearance spontanea.(53)

È interessante notare come l'associazione dei sintomi e genere con la clearance spontanea differiscono significativamente a seconda del genotipo di *IL28B*. Per quanto riguarda l'associazione genotipo-sintomi, i pazienti con *IL28B* CC (genotipo favorevole) hanno maggiori probabilità di sviluppare sintomi, ma hanno un alto tasso di clearance indipendentemente dal fatto che fossero sintomatici o meno (con ittero: 56% vs. senza ittero: 61%). Al contrario, tra i pazienti con alleli *IL28B* sfavorevoli, la presenza di sintomi ha avuto un effetto significativo sui tassi di clearance (sintomatico: 43% vs. asintomatico: 14%). Invece, studiando l'associazione genotipo-genere, si è visto che le donne con genotipo

favorevole avevano una probabilità molto elevata di clearance spontanea (62% a 2 anni), rispetto agli uomini con genotipo favorevole (32%) o membri di entrambi i sessi con un genotipo sfavorevole (uomini non-CC 20%, donne non-CC 35%). (54)

Considerando i fattori intrinseci del virus, il livello di HCV-RNA è un importante predittore della clearance. In particolare, esiste una relazione inversa tra il titolo di HCV RNA alla diagnosi e la probabilità di clearance spontanea: i pazienti con livelli di RNA superiori a 6 log al basale avevano una clearance spontanea del solo 7%, mentre quelli con RNA inferiore a 4 log avevano un tasso di clearance significativamente più alto (24%). (55) Secondo alcuni studi, il genotipo 1 può essere associato ad una maggiore probabilità di clearance spontanea. (54) Tuttavia, è ancora controverso se il tipo di genotipo dell'HCV potesse condizionare la clearance spontanea in maniera significativa.

La risoluzione in acuto dell'HCV generalmente non si associa ad una malattia epatica significativa ma sono state osservate delle lesioni istologiche minori in individui anti-HCV positivi, HCV RNA negativi.(13) Il rischio di reinfezione rimane sempre una possibilità dopo la clearance dell'epatite C acuta, e tale rischio è particolarmente alto in coloro che continuano a fare uso di droghe per via endovenosa (PWID) e in uomini HIV positivi che fanno sesso con gli uomini (MSM). (13) Tuttavia, l'impatto clinico dell'epatite C acuta è principalmente dato dall'alto rischio di cronicità e le sue conseguenze.

- **Epatite cronica**

L'epatite cronica è l'esito più comune dell'infezione acuta da virus dell'epatite C e si verifica nel 75-85% dei casi. Per definizione, l'epatite cronica è definita come persistenza dell'HCV RNA nel sangue per più di sei mesi dopo un'infezione acuta ed è caratterizzata dalla presenza simultanea di anticorpi anti-HCV e del HCV RNA rilevabile.(19)

La transizione dall'epatite C acuta a quella cronica è di solito sub-clinica.(13)

La maggior parte dei pazienti che sviluppano un'infezione cronica da HCV sono asintomatici; il 60-80% dei pazienti hanno un'epatite caratterizzata da livelli elevati di transaminasi, mentre circa il 30% mantiene le transaminasi persistentemente normali nonostante abbia HCV RNA rilevabile nel siero. (56) Infatti, non è raro che i pazienti rimangano non diagnosticati fino a quando non presentano le complicanze della malattia epatica allo stadio terminale. Prima di sviluppare i sintomi conclamati dello scompenso, questi pazienti possono riferire l'affaticamento, perdita di peso, dolori muscolari e articolari, dolore o fastidio addominale superiore destro, prurito.

Epatite C cronica è generalmente una malattia a lenta progressione caratterizzata da un'inflammatione epatica persistente che, in circa 10-20% dei pazienti con una lunga storia di malattia (20-30 anni), porta allo sviluppo di lesioni epatiche progressive, quali fibrosi e cirrosi.

La fibrosi epatica è definita dall'eccessivo accumulo di proteine della matrice extracellulare (ECM) come collagene, laminina, elastina, fibronectina ed è considerata come una risposta di guarigione del tessuto in seguito ad un danno epatico cronico. L'infezione da HCV è in grado di promuovere il processo della fibrogenesi epatica sia direttamente, modulando la segnalazione intracellulare e le vie metaboliche attraverso le proteine virali, che indirettamente, inducendo risposte immunitarie antivirali dell'ospite che portano all'inflammatione cronica. La cellula stellata epatica (HSC) di Ito, una cellula che immagazzina la vitamina A (retinoide) e che risiede nello spazio perisinusoidale di Disse, è l'elemento fibrogenetico chiave. Sebbene quiescenti in assenza di stimoli infiammatori, le HSC si attivano in risposta al danno epatico e subiscono la trasformazione in miofibroblasti proliferativi e contrattili. Le HSC attivate da vari stimoli (ad es. proteina C del core, citochine infiammatorie, fattori di crescita come PDGF, TGF-beta) costituiscono una fonte prevalente di produzione della matrice extracellulare e quindi perturbano l'equilibrio tra la deposizione e la dissoluzione delle proteine costituenti la matrice,

portando alla formazione di cicatrici fibrotiche e infine allo sviluppo della cirrosi epatica.(56)

Una volta stabilita la cirrosi, la progressione della malattia rimane imprevedibile: la cirrosi può rimanere indolente per molti anni in alcuni pazienti, mentre progredisce in altri verso lo scompenso epatico (caratterizzato da ascite, sanguinamento gastrointestinale superiore, sindrome epatorenale ed encefalopatia epatica), carcinoma epatocellulare (HCC) e morte. La progressione non è necessariamente un processo lineare e può essere accelerata da numerosi fattori, tra cui: l'età del paziente (in particolare l'infezione acquisita dopo i 40 anni), il sesso maschile, il consumo eccessivo di alcol (oltre 50g/die), la coinfezione con il virus dell'epatite B (HBV) e/o l'HIV, l'obesità, la steatosi, presenza di insulino-resistenza o del diabete mellito di tipo 2 e lo stato di immunosoppressione.(13,56)

Nel complesso, una volta che la cirrosi si è sviluppata, c'è un rischio annuale di HCC dell'1-5% e un rischio annuale del 3-6% di scompenso epatico. A seguito di un episodio di scompenso il rischio di morte nell'anno successivo è compreso tra il 15% e il 20%.(13)

- **Manifestazioni extraepatiche**

L'infezione da HCV non è solo un'infezione epatica ma una malattia sistemica, le cui conseguenze sono meno legate ad una tossicità diretta del virus che a meccanismi immunomediati.

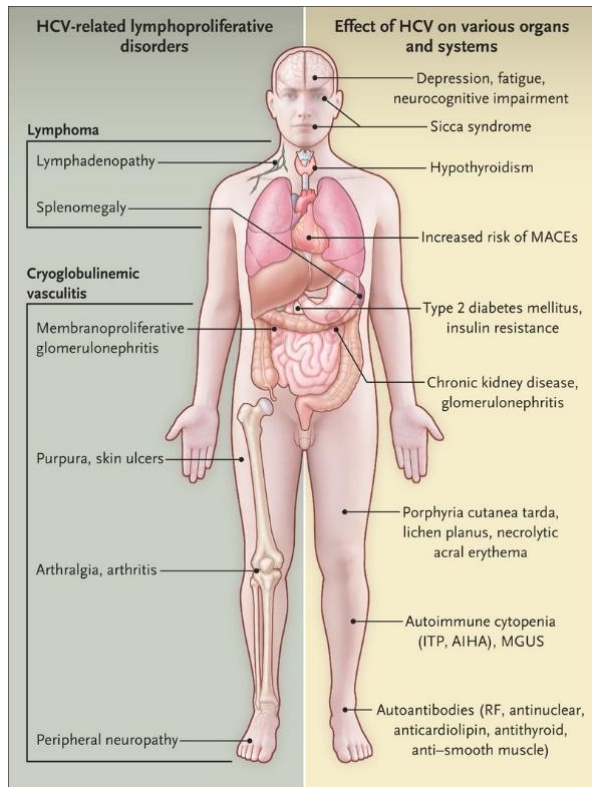


Figura 8 Fonte (57)

L'infezione cronica da virus dell'epatite C è nota per causare diverse manifestazioni extraepatiche. Nel corso dell'infezione, circa il 70% dei pazienti ha una o più di queste manifestazioni.(58)

Le più frequenti e meglio caratterizzate sono:

- La crioglobulinemia mista (MC)
- Linfomi non-Hodgkin (NHL)
- Malattie cardiovascolari
- Nefropatia
- L'insulino-resistenza (IR) e il diabete mellito di tipo 2 (T2DM)
- Disturbi neurologici e psichiatrici
- Malattie reumatologiche (psoriasi, sindrome di Sjogren)

- Porfiria cutanea tarda (58)

HCV quindi non è solo un virus epatotropo ma anche linfotropo. Il linfotropismo è caratterizzato dalla replicazione del virus all'interno delle cellule B, che spiega il rilevamento della crioglobulinemia in una percentuale significativa di pazienti. Complessivamente, il 15-35% dei pazienti con epatite cronica hanno crioglobuline circolanti. Di questi tra il 5% e il 25% svilupperà conseguenze cliniche.

La crioglobulinemia in questi pazienti è prevalentemente di tipo II (mista), con una componente monoclonale IgM e una policlonale IgG, e più raramente una crioglobulinemia di tipo III. È un complesso proteico che associa il virus con anticorpi antivirali e il fattore reumatoide che si depositerà nelle pareti dei vasi di piccolo e medio calibro causando vasculite crioglobulinemica responsabile del coinvolgimento cutaneo (porpora, vasculite necrotizzante), reumatologico (poliartrite delle piccole articolazioni), renale (glomerulonefrite membranoproliferativa) e neurologico con frequenti neuropatie periferiche.

L'infezione di linfociti B, a lungo andare, può portare alla selezione di un clone responsabile dello sviluppo di un linfoma.

È possibile identificare due categorie principali di neoplasie linfatiche correlate all'HCV: quelle che originano dalla crioglobulinemia mista (MC) e le forme idiopatiche. Per quanto riguarda la prima categoria, circa l'8-10% di MC-II evolve in un linfoma franco. Generalmente, questa evoluzione appare un lungo periodo dopo la diagnosi di MC-II e dopo un'infezione duratura, come dimostrato anche dall'età avanzata dei pazienti che sviluppano linfoma HCV-correlato.(59)

Da un punto di vista istopatologico, anche se virtualmente tutti i tipi istologici possono essere trovati, i linfomi non Hodgkin (NHL) delle cellule B rappresentano la grande maggioranza dei tumori maligni linfatici correlati all'HCV. In particolare, linfoma linfoplasmocitoide o immunocitoma (Lp-Ic) è il tipo istologico più frequente tra i linfomi correlati all'HCV. (56)

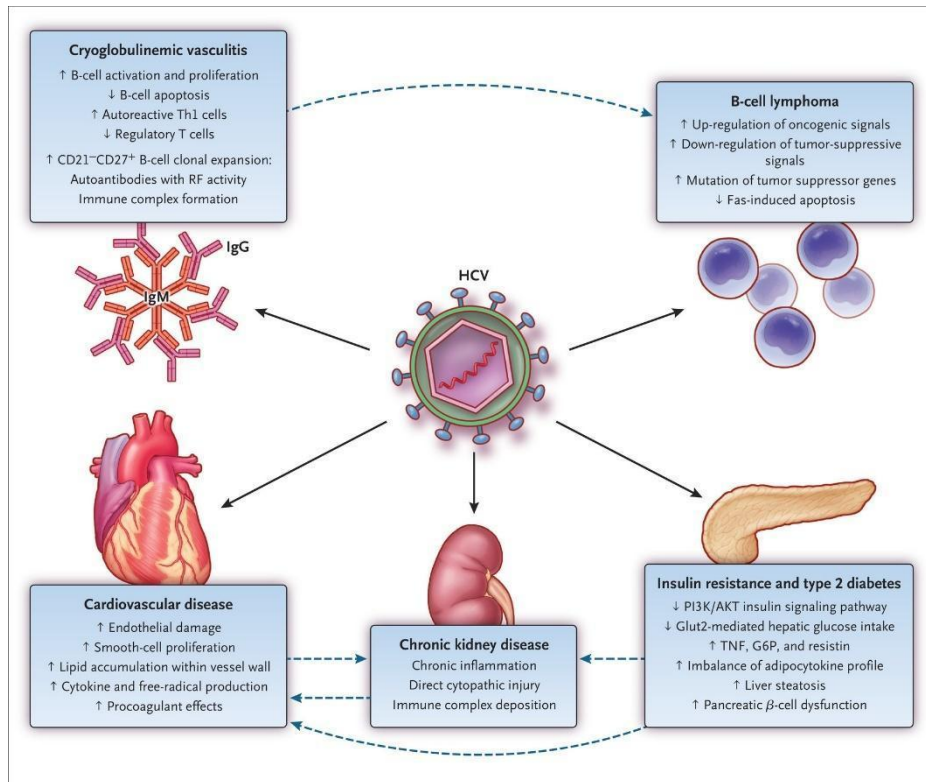


Figura 9 I principali meccanismi fisiopatologici implicati nelle manifestazioni extraepatiche dell'HCV. Fonte (57)

I pazienti con HCV hanno una prevalenza significativamente più elevata di aterosclerosi carotidea subclinica rispetto ai soggetti HCV-negativi. Il danno vascolare indotto dal virus è alla base dell'ipotesi di un coinvolgimento diretto dell'HCV nell'induzione dell'aterosclerosi: questo, infatti, altera la permeabilità endoteliale, provoca l'apoptosi cellulare e induce la disfunzione endoteliale, promuovendo la migrazione e la proliferazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media alla superficie intimale. Inoltre, anche meccanismi indiretti, come l'infiammazione sistemica cronica di basso grado indotta dal virus contribuisce allo sviluppo dell'aterosclerosi. (56)

La maggior parte degli studi e metanalisi supportano il ruolo dell'HCV come fattore di rischio per lo sviluppo della malattia coronarica (CAD) e dell'infarto miocardico (IM).(60)

Tutte le manifestazioni extraepatiche possono influenzare la morbilità, la qualità della vita e la mortalità di questi pazienti. (61)

Questi eventi epatici ed extraepatici rappresentano una mortalità dieci volte maggiore nei pazienti con anticorpi anti-HCV con RNA virale

rilevabile rispetto a quelli senza HCV-RNA rilevabile o in pazienti che non hanno mai incontrato HCV. (62)

Gli agenti antivirali ad azione diretta che curano l'infezione sottostante sono associati ad una ridotta incidenza della maggior parte di queste malattie.

I primi studi hanno mostrato uno stretto legame tra la risposta virale sostenuta (SVR) indotta dal trattamento e un basso rischio di manifestazioni extraepatiche nell'infezione da HCV.

Il rischio di sviluppare vasculite crioglobulinemica e linfoma non-Hodgkin a cellule B (B-NHL) era inferiore nei pazienti che hanno ottenuto una risposta virologica sostenuta rispetto a quelli che hanno fallito il trattamento. La SVR ha ridotto anche il rischio di malattie cardiovascolari, insulino-resistenza e diabete di tipo 2.(57)

1.7 Strumenti diagnostici e di monitoraggio

Esistono diversi tipi di test di laboratorio in grado di rilevare l'infezione da HCV, classificabili come:

- test indiretti – test sierologici classici in grado di rilevare anticorpi anti-HCV; questi sono stati inizialmente sviluppati per lo screening dei donatori di sangue e per prevenire la trasmissione.
- test diretti – saggi in grado di rilevare e quantificare componenti delle particelle HCV come l'HCV RNA o HCV Core Antigen (cAg)

Test indiretti

I test sierologici possono rilevare la presenza di anticorpi anti-HCV, antigeni dell'HCV o di entrambi contemporaneamente.

Gli anticorpi anti-HCV sono generalmente identificati utilizzando i test ELISA (saggio immunoassorbente enzimatico) o test CLIA (saggio immunoassorbente a chemiluminescenza). (63)

Oggigiorno i più utilizzati sono i test di terza generazione che incorporano

diversi epitopi di HCV dalle diverse regioni strutturali e non strutturali dell'HCV (C100-3, regione NS4 nei saggi di prima generazione e C22 (regione del capsido), C33 (regione NS3) e antigene NS5 nel test di terza generazione).

Durante l'infezione acuta c'è un periodo finestra in cui gli anticorpi anti-HCV non sono ancora rilevabili. Questo periodo finestra può variare da paziente a paziente e da test a test. Con i test di terza generazione è possibile rilevare la sieroconversione già dopo 4-8 settimane dall'inizio dell'infezione.

La sensibilità e la specificità dei test di terza generazione sono elevate (vicino a 99%). (64) Alcuni risultati falsi positivi sono descritti in varie condizioni patologiche e nei donatori di sangue. È stato dimostrato che i titoli alti di anticorpi anti-HCV sono più spesso veri positivi rispetto ai titoli bassi che sono più spesso falsi positivi (88-89). I test di terza generazione, in caso di soggetti con immunosoppressione grave o in pazienti emodializzati possono dare falsi negativi. (63) I test di quarta generazione, noti come test "combinazione antigene-anticorpo", sono in grado di rilevare entrambi gli anticorpi anti-HCV e HCV Ag allo stesso tempo. Questi test, perciò, riducono ulteriormente il periodo finestra e hanno un'elevata sensibilità. Il periodo finestra medio di questi test è di 26,8 giorni.(63)

Un'altra opzione sono i test sierologici rapidi. Questi test richiedono pochi minuti e i risultati possono essere letti visivamente, quindi, non dipendono da strumenti di laboratorio o alimentazione elettrica. Un ulteriore vantaggio è che possono utilizzare diverse matrici: non solo siero o plasma, ma anche il sangue intero (previa veno-puntura) oppure fluido orale (saliva). Si basano su uno dei seguenti principi di catturazione degli anticorpi su una superficie solida a cui sono attaccati gli antigeni complementari: agglutinazione, immunofiltrazione o immunocromatografia. Gli antigeni utilizzati nel test sono generalmente gli stessi di quelli incorporati nelle EIA di terza generazione. (65)

Inoltre, il test OraQuick® HCV Rapid Antibody Test, che abbiamo utilizzato per il nostro studio - oggetto di questa tesi, ha dimostrato prestazioni cliniche equivalenti all'attuale saggio immunoenzimatico di laboratorio.(66)

Test diretti

I test molecolari sono utilizzati per confermare l'infezione da HCV e come metodo utilizzano o la RT PCR o l'amplificazione mediata dalla trascrizione (TMA). Sono indicati per confermare la replicazione in soggetti risultati positivi agli anticorpi anti-HCV o per rilevare la viremia nell'infezione acuta durante il periodo finestra (quando i test anticorpali sono ancora negativi).

I test dell'HCV RNA commercializzati sono molto sensibili e in grado di rilevare e quantificare meno di 30 copie / ml (riferimento) o <15 UI / ml di HCV RNA. (67) Questo basso limite di rilevazione/quantificazione consente di definire con fiducia la risposta virologica sostenuta (SVR) 6 mesi dopo la fine del trattamento nei pazienti che mantengono un carico di HCV-RNA non rilevabile.(67)

HCV antigene del core, che è un marker surrogato della replicazione dell'HCV, può essere rilevato e quantificato nel sangue del paziente e pertanto, può essere utilizzato come un'alternativa meno costosa ai test di HCV RNA nella diagnosi dell'infezione e nel monitoraggio del trattamento antivirale. Il test, basato su ELISA o CLIA, ha una buona sensibilità ma comunque inferiore a quella della PCR in tempo reale. Il loro limite di rilevazione è equivalente a 500-3000 HCV RNA IU/ mL. (68)

1.8 Iter diagnostico

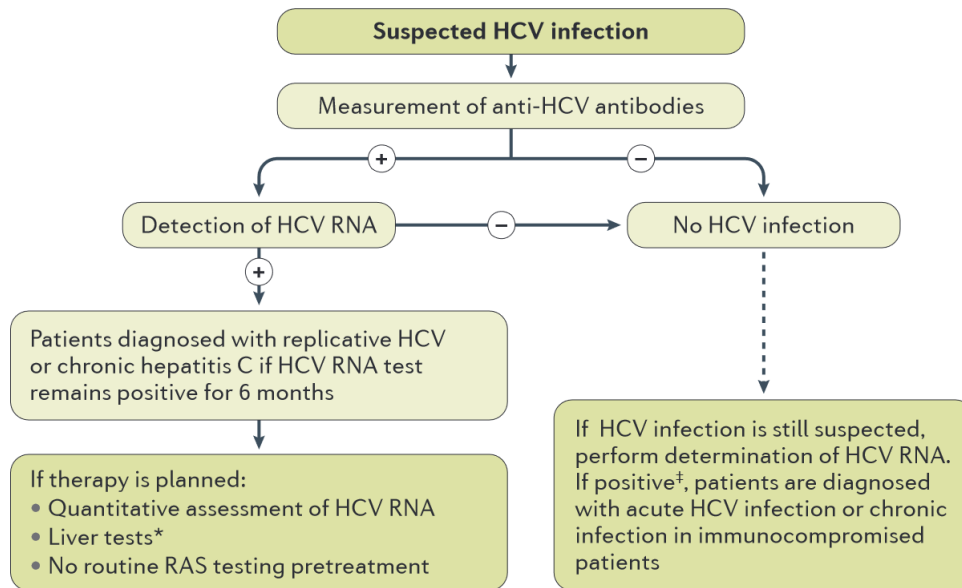


Figura 10 Algoritmo diagnostico per l'infezione da HCV. Fonte (19)

Data la frequente assenza di specifici sintomi e segni nel corso dell'infezione sia acuta che cronica, il riscontro dell'HCV è spesso occasionale. In alcuni casi la ricerca dell'HCV viene fatta insieme ad altri esami nel contesto di uno multi-screening che può essere eseguito per diversi motivi come la gravidanza, necessità di un intervento chirurgico etc. Altrimenti, HCV va sempre ricercato nel sospetto di un'epatopatia. I test diagnostici per HCV devono essere applicati a tutti i pazienti con un aumento dei livelli di transaminasi ALT e/o AST nel sangue, che sono espressione della morte degli epatociti e quindi del danno epatico. (19)

Il primo step è la determinazione degli anticorpi anti-HCV mediante un test immunoenzimatico o un test diagnostico rapido. In assenza di un'esposizione recente o di uno stato di immunosoppressione profonda (che potrebbero dare un falso negativo), un risultato negativo indica l'assenza di infezione. In caso di rilevazione di anticorpi anti-HCV, deve essere eseguita la rilevazione dell'HCV RNA o dell'antigene core dell'HCV per confermare l'infezione attiva.

La sola presenza di HCV RNA, ma non di anticorpi, indica un'infezione acuta da HCV; per dimostrare che si tratti di un'infezione acuta, un secondo test dovrebbe essere eseguito poche settimane dopo per mostrare la sierconversione.

Se invece sono presenti solo gli anticorpi anti-HCV, il paziente può aver già avuto e guarito l'infezione da HCV in passato oppure il risultato può essere un falso positivo.(19) È importante sottolineare che la presenza di anticorpi anti-HCV non protegge il paziente da una reinfezione in caso di una nuova esposizione.

La presenza simultanea di entrambi i marcatori dimostra l'infezione ma non differenzia l'infezione acuta da quella cronica.

Di solito l'infezione acuta è caratterizzata dalla presenza di viremia di basso livello (di solito $<10^5$ UI / ml), con grandi fluttuazioni della carica virale ($\log >1$) e ALT nel corso di settimane o mesi. Inoltre, i livelli di ALT sono generalmente più alti di quelli osservati nell'infezione cronica(>250 U/L).(69)

Al contrario, l'infezione cronica è caratterizzata da livelli più elevati di HCV RNA che tendono a fluttuare minimamente ($<0,5$ log), ma per molti anni durante il follow-up. I livelli di ALT sono in genere inferiori rispetto all'infezione acuta e possono essere addirittura all'interno dell'intervallo di normalità.(70)

1.9 Stadiazione dell'epatopatia da HCV

Essendo l'infezione da HCV responsabile di una serie di complicazioni a livello epatico che includono fibrosi, cirrosi e in ultima analisi sviluppo di carcinoma epatocellulare (HCC), è fondamentale una gestione appropriata del paziente e una valutazione completa della sua condizione prima di intraprendere decisioni terapeutiche, che oggi sono sempre più personalizzate. La valutazione prevede un'integrazione di dati della clinica del paziente, di diversi parametri bioumorali, indagini strumentali e in alcuni casi richiede anche un'analisi istologica.

La stadiazione della fibrosi epatica è il singolo fattore più importante che influisce sulla storia naturale dell'epatite C cronica. È fondamentale per la prognosi e l'inizio tempestivo del trattamento. (71)

Per valutare la gravità della malattia epatica si utilizzano quasi sempre metodi non invasivi al posto della biopsia epatica, che in passato era il gold standard per la stadiazione delle epatopatie. Essendo un esame invasivo e non esente di complicazioni (dolore e sanguinamento), il suo uso è stato limitato. Attualmente l'esecuzione della biopsia epatica può essere necessaria in caso di eziologie miste note o sospette (ad es. sindrome metabolica, alcolismo o autoimmunità). (72)

I metodi non invasivi possono essere suddivisi in due classi principali:

1. Dosaggio di biomarcatori sierici: tra questi si distinguono marcatori *indiretti* (APRI - AST/platelet ratio index, FibroTest, ELF), che riflettono la funzione epatica che peggiora con la progressione della fibrosi, e *diretti* (es. acido ialuronico, PIIINP-amina terminale del peptide sierico del procollagene III), che riflettono il turnover della matrice extracellulare che durante la fibrogenesi cambia la sua composizione. Questi marcatori funzionano bene nell'identificare la presenza o assenza di fibrosi/cirrosi ma lo stesso non si può dire per la distinzione di stadi intermedi.
2. Metodi basati sulla misurazione della stiffness (rigidità) epatica: il Fibroscan è uno strumento basato sul principio dell'elastometria che indirettamente valuta l'elasticità del fegato. È composto da una sonda con un trasduttore ad ultrasuoni montato sull'asse di un vibratore. Il trasduttore trasmette vibrazioni di lieve ampiezza e a bassa frequenza (50Hz), generando un'onda elastica, che si diffonde attraverso il tessuto epatico. La propagazione dell'onda è monitorata mediante l'acquisizione ecografica (pulse-echo) e la sua velocità è direttamente correlata all'elasticità del tessuto: più velocemente l'onda si propaga, più rigido è il tessuto. (14,71)

L'operatore deve acquisire 10 misurazioni valide, dopodiché il software calcola (in tempo reale) il valore medio espresso in kPa (kilopascal). La rigidità epatica può variare tra 2,5 e 75 kPa. I valori di cut-off tra

7-9,5 kPa sono coerenti con la fibrosi significativa, mentre i valori tra 12,5-17,6 kPa indicano la presenza di cirrosi. (73)

Questi strumenti consentono di valutare la fibrosi (F) su una scala METAVIR convenzionale che va da 0 a 4, dove F0 e F1 corrispondono ad una fibrosi assente o minima rispetto alla fibrosi F2 media, F3 estesa o F4 che indica presenza di cirrosi.

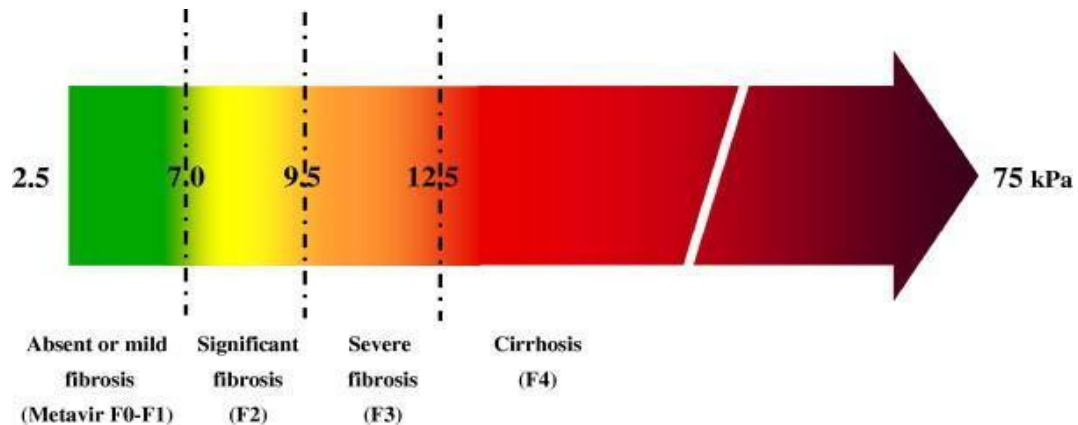


Figura 11 Fonte (73)

Uso combinato di metodi invasivi, che sia la combinazione Fibroscan + marcatori sierici oppure uso di due marcatori sierici (es. APRI e FibroTest) sembra aumentare l'accuratezza diagnostica nei pazienti con epatite C per la rilevazione sia di fibrosi significativa che di cirrosi. (73) Possono anche predire le complicanze correlate alla cirrosi e dire se procedere con lo screening specifico per varici esofagee (in presenza di ipertensione portale) e HCC o meno. Pertanto, possono essere utilizzati per stratificare i pazienti per classi di rischio e per dare priorità al trattamento antivirale e al trapianto di fegato. Infine, i metodi non invasivi possono essere utilizzati per monitorare la regressione della fibrosi epatica in risposta alla terapia antivirale. (71)

Nei pazienti che hanno sviluppato la cirrosi, la stadiazione della gravità della malattia e la stima dell'aspettativa di sopravvivenza di questi pazienti comunemente viene fatta utilizzando due score prognostici che combinano alcuni parametri biochimici e clinici:

- Child-Pugh score: combina tre parametri laboratoristici di funzionalità epatica (bilirubina, albumina e INR) con

presenza/assenza di due parametri clinici (ascite, encefalopatia epatica). Il punteggio ottenuto, che va da un minimo di 5 ad un massimo di 15 punti, permette di definire tre classi:

- o Child A (5-6 punti) – lieve; sopravvivenza ad 1 anno 100%
- o Child B (7-9) – moderata; 80%
- o Child C (10-15) – severa, scompensata; 45%

Tabella I Child-Pugh score

Parametro	1 punto	2 punti	3 punti
Bilirubina (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albumina (g/dl)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
INR (%)	<1.7	1.7-2.2	>2.2
Ascite	Assente	Lieve	Moderata
Encefalopatia	Assente	Grado 1°-2°	Grado 3°-4°

- MELD score (Model for End-Stage Liver Disease), basato su un calcolo che include i valori della creatinemia, bilirubinemia e INR:

$$9.57 \log (\text{creatinina}) + 3.78 \log (\text{bilirubina}) + 11.2 \log (\text{INR}) + 6.34$$

Permette di predire la mortalità a 3 mesi nei pazienti cirrotici. MELDNa aggiunge al calcolo anche il valore di sodiemia, in modo da prendere in considerazione il rischio aggiuntivo di iponatriemia.

1.10 Trattamenti antivirali pre-DAAs

Da oltre 20 anni, l'Interferone è stato utilizzato come trattamento principale per l'infezione cronica da HCV, grazie alle sue proprietà antivirali e immunostimolanti. Inizialmente usato in monoterapia aveva un'efficacia inferiore al 40%. L'aggiunta di Ribavirina, un analogo nucleosidico e un'antivirale non-HCV specifico, ha aumentato significativamente l'efficacia del trattamento. Inoltre, l'introduzione dell'interferone peghilato (Peg-IFN) nel 1997, dotato di una farmacocinetica più favorevole dell'interferone non peghilato in termini di durata d'azione, ha permesso di passare a iniezioni settimanali piuttosto che trisettimanali, migliorando notevolmente anche l'aderenza al trattamento. (1,74)

Il fatto che provocavano effetti collaterali significativi (sindrome simil-influenzale, mielosoppressione con neutropenia e trombocitopenia, infezioni, aggravano i disturbi neurocognitivi, anemia emolitica (RBV), il loro uso doveva essere limitato ad una popolazione di pazienti selezionati. Infatti, l'impiego dell'interferone è controindicato in pazienti con cirrosi epatica scompensata, disturbi psichiatrici severi, malattie autoimmuni attive, gravidanza in atto, scompenso cardiaco. (75) Nonostante ciò, il regime Peg-IFN-Ribavirina è rimasto "standard of care" fino all'introduzione di primi antivirali ad azione diretta (DAAs) nel 2011, con un tasso di SVR fino al 50% per genotipi 1 e 4, e del circa 75% per genotipi 2 e 3.(76)

Con lo sviluppo di primi inibitori delle proteasi (PI), telaprevir (NS3) e boceprevir (NS4A), è stata introdotta la "triplice terapia" ovvero la combinazione di Peg-IFN-RBV-PI in pazienti affetti da genotipo 1 che ha aumentato ulteriormente il tasso di SVR di circa 30%, soprattutto in pazienti non trattati precedentemente con Peg-IFN-RBV.(74). In particolare, nei pazienti naïve al trattamento, telaprevir ha determinato una risposta virologica sostenuta (SVR) nel 72%, boceprevir nel 68% mentre nei pazienti che hanno precedentemente fallito la terapia con Peg-IFN-RBV entrambi i farmaci inducevano una SVR fino al 66%. (77)

Tuttavia, non essendo un trattamento interferon-free, anche questo regime aveva le stesse limitazioni di sicurezza ed efficacia. I fattori che si

associavano ad una maggior incidenza di effetti avversi e di fallimento terapeutico erano la presenza di fibrosi estesa o malattia epatica avanzata (suggerito da un basso numero di piastrine, indicatore surrogato dell'epatopatia avanzata), co-infezione con HIV e genotipo 1.(78) Dal 2014, con l'introduzione del sofosbuvir (inibitore della polimerasi NS5B) è stato finalmente possibile abbandonare l'uso dell'interferone e trattare indiscriminatamente tutti i pazienti affetti dall'epatite C cronica.

2 ANTIVIRALI AD AZIONE DIRETTA (DAAs)

2.1 Meccanismo d'azione

La scoperta del ciclo vitale dell'HCV ha aperto la strada allo sviluppo di una generazione completamente nuova di composti antivirali per il trattamento dell'infezione da HCV. In contrasto con il trattamento piuttosto non specifico con Interferone e ribavirina, i DAA interferiscono direttamente e specificatamente con alcune proteine virali necessarie per la replicazione dell'HCV.

Esistono tre classi diverse di antivirali diretti contro l'HCV:

- Inibitori delle proteasi NS3-NS4A (sufisso *-previr*): il loro blocco interrompe il ciclo vitale intracellulare inibendo la maturazione della poliproteina virale. Sebbene i farmaci di prima generazione, telaprevir o boceprevir, portavano ad una rapida diminuzione della replicazione dell'HCV, non è stato possibile usarli in monoterapia, in quanto si è osservato che rapidamente portavano allo sviluppo di resistenze ("resistance-associated substitutions") e alla ricomparsa del HCV RNA nel sangue. Inoltre, erano efficaci solo contro il genotipo 1 e in associazione con Peg-IFN-RBV, caratterizzati da importanti limitazioni in termini di sicurezza. Oggi si utilizzano gli inibitori delle proteasi di seconda e terza generazione (grazoprevir) che hanno una barriera genetica più alta e un migliore profilo di sicurezza.(79)
- Inibitori della polimerasi NS5B (sufisso *-buvir*): interferiscono con la replicazione virale legandosi alla RNA polimerasi NS5B. Il sito attivo della NS5B è ben conservato tra i genotipi di HCV poiché le sostituzioni aminoacidiche in questa sede sono generalmente scarsamente tollerate e provocano una notevole perdita di fitness. (80)

Questi farmaci possono essere suddivisi in due categorie distinte:

- o analoghi nucleosidici (*Sofosbuvir*): funzionano da terminatori della catena di RNA dopo essere stati attivati nell'ambiente intracellulare da due cicli di fosforilazione. Mostrano una buona attività contro tutti i genotipi e hanno un'elevata barriera genetica alla resistenza. (19)
- o inibitori non nucleosidici (*Dasabuvir*): sono un gruppo eterogeneo di farmaci che hanno come target uno dei quattro siti allosterici sulla superficie dell'enzima e lo rendono non funzionante. La loro azione antivirale è limitata però al genotipo HCV 1. (81)
- Inibitori di NS5A (sufisso *-asvir*): alterano il ruolo regolatrice della proteina NS5A e sembrano disorganizzare il complesso di replicazione, inibendo così la replicazione dell'HCV; l'effetto è potenziato dalla loro capacità di inibire anche l'assemblaggio e il rilascio virale. (19) Questa classe di farmaci presenta un'ampia copertura genotipica ma una bassa barriera genetica alla resistenza, con i più alti livelli di resistenza conferiti dalle sostituzioni di singoli amminoacidi nel sottotipo 1a. (81)

2.2 Goal terapeutico

L'obiettivo primario della terapia è quello di curare l'infezione da HCV, ovvero ottenere la risposta virologica sostenuta (SVR), definita come HCV RNA non rilevabile nel siero o nel plasma 12 settimane (SVR12) o 24 settimane (SVR24) dopo la fine della terapia, valutato con un metodo molecolare sensibile con un limite inferiore di rilevazione <15 UI/ml. (72) Ottenere una SVR è importante in quanto:

- o è associata alla normalizzazione degli enzimi epatici e al miglioramento o alla regressione della necroinfiammazione epatica e della fibrosi.(82)

- o nei pazienti con fibrosi avanzata (F3) e cirrosi (F4) che eliminano l'HCV, riduce significativamente il tasso di scompenso e il rischio di HCC (anche se non lo azzerava) e di mortalità correlata al fegato, rispetto ai pazienti non trattati e ai responder che non raggiungono la SVR, specialmente in presenza di comorbidità come la sindrome metabolica, il consumo eccessivo di alcol, la concomitante infezione da virus dell'epatite B (HBV)(83)
- o riduce il rischio di comparsa e la mortalità di tutte le manifestazioni extraepatiche associate all'HCV (84)

Curando l'infezione da HCV si ottiene un miglioramento della qualità di vita di questi pazienti e si riesce a bloccare la trasmissione del virus ("treatment as prevention").(72)

2.3 Indicazioni al trattamento

Visti i numerosi benefici della terapia con i nuovi farmaci antivirali ad azione diretta (DAAs) tutti i pazienti, sia i naïve al trattamento sia quelli precedentemente trattati, con un'infezione da HCV acquisita di recente o cronica devono essere trattati.

Per garantire un'impiego clinico razionale dei DAAs ad oggi disponibili per l'erogazione tramite il SSN, l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) (80) ha approvato 12 criteri che riassumono tutte le indicazioni al trattamento in diverse categorie di soggetti affetti da epatite C cronica:

- o Criterio 1: Pazienti con cirrosi in classe di Child A o B e/o con HCC con risposta completa a terapie resettive chirurgiche o locoregionali non candidabili a trapianto epatico nei quali la malattia epatica sia determinante per la prognosi.
- o Criterio 2: Epatite ricorrente HCV RNA positiva del fegato trapiantato in paziente stabile clinicamente e con livelli ottimali di immunosoppressione.

- o Criterio 3: Epatite cronica con gravi manifestazioni extraepatiche HCV correlate (sindrome crioglobulinemica con danno d'organo, sindromi linfoproliferative a cellule B, insufficienza renale).
- o Criterio 4: Epatite cronica con fibrosi METAVIR F3 (o corrispondente Ishak).
- o Criterio 5: In lista per trapianto di fegato con cirrosi MELD 25 e/o HCC all'interno dei criteri di Milano con la possibilità di una attesa in lista di almeno 2 mesi.
- o Criterio 6: Epatite cronica dopo trapianto di organo solido (non fegato) o di midollo in paziente stabile clinicamente e con livelli ottimali di immunosoppressione.
- o Criterio 7: Epatite cronica con fibrosi METAVIR F2 (o corrispondente Ishak) e/o comorbilità a rischio di progressione del danno epatico [coinfezione HBV, coinfezione HIV, malattie croniche di fegato non virali, diabete mellito in trattamento farmacologico, obesità (body mass index ≥ 30 kg/m²), emoglobinopatie e coagulopatie congenite].
- o Criterio 8: Epatite cronica con fibrosi METAVIR F0-F1 (o corrispondente Ishak) e/o comorbilità a rischio di progressione del danno epatico [coinfezione HBV, coinfezione HIV, malattie croniche di fegato non virali, diabete mellito in trattamento farmacologico, obesità (body mass index ≥ 30 kg/m²), emoglobinopatie e coagulopatie congenite]
- o Criterio 9: Operatori sanitari infetti.
- o Criterio 10: Epatite cronica o cirrosi epatica in paziente con insufficienza renale cronica in trattamento dialitico.
- o Criterio 11: Epatite cronica nel paziente in lista d'attesa per trapianto di organo solido (non fegato) o di midollo.
- o Criterio 12: Epatite cronica o cirrosi epatica in pazienti che non possono accedere alla biopsia e/o al Fibroscan per motivi socio-assistenziali.

Prima di iniziare il trattamento con gli antivirali ad azione diretta è necessario fare una valutazione delle eventuali comorbidity del paziente

che possono influenzare non solo la storia naturale e la progressione della malattia epatica, ma anche influenzare la scelta del farmaco. Tutti i pazienti devono essere testati per l'infezione da HBV passata o attuale (ricerca dell'antigene HBs, anticorpi anti-HBc e anticorpi anti-HBs), per l'HIV (anticorpi anti-HIV) e per il virus dell'epatite A (anticorpi anti-HAV); Presenza di diabete mellito, l'obesità, consumo di alcol e abuso di sostanze dovrebbero essere valutati e trattati con i modi più appropriati. Inoltre, è necessaria una valutazione della funzionalità renale (essendo alcuni DAAs escreti per via renale) e la possibilità di epatotossicità indotta da farmaci. (72)

Deve essere presa un'anamnesi farmacologica completa e dettagliata (compresi tutti i farmaci prescritti, farmaci da banco, preparati a base di erbe e vitamine e qualsiasi uso di droghe illecite).

Genotipizzazione dell'HCV

In caso di un precedente fallimento del trattamento e in presenza di fibrosi grave, il genotipo HCV, incluso il sottotipo di genotipo 1, può ancora essere utile in alcuni casi per decidere il regime di trattamento e la durata, in particolare nei precedenti non-responder o nelle reinfezioni. Tuttavia, è possibile trattare individui con farmaci HCV pan-genotipici senza sapere il genotipo/sottotipo di HCV, in particolare nei paesi in cui i test molecolari non sono disponibili o sono troppo costosi. (65)

Generalmente, i metodi più raccomandati per determinare il genotipo HCV sono il sequenziamento delle regioni altamente conservate del genoma dell'HCV come NS5, core, E1 e 5' UTR. (85)

2.4 Controindicazioni alla terapia

A differenza di pregressi regimi terapeutici che presentavano numerose limitazioni al loro uso, le terapie basate sulla combinazione di due o più antivirali diretti hanno poche controindicazioni:

- o L'uso di alcuni agenti induttori del CYP/P-gp (come carbamazepina, fenitoina e fenobarbital) è controindicato in tutti i regimi attualmente disponibili, a causa del rischio di concentrazioni ridotte di DAA e quindi dell'elevato rischio di fallimento virologico.
- o I regimi di trattamento comprendenti un inibitore della proteasi NS3-4A, come grazoprevir, glecaprevir o voxilaprevir, sono controindicati nei pazienti con cirrosi scompensata (Child-Pugh B o C) e nei pazienti con precedenti episodi di scompenso, a causa del rischio di tossicità da questi farmaci.

2.5 Farmaci attualmente disponibili (72,77,86)

1. Sofosbuvir

Sofosbuvir, un analogo nucleosidico, inibitore della RNA polimerasi NS5B, va somministrato alla dose di 400 mg/die in una singola compressa da assumere con o senza cibo. È ben tollerato nell'arco di 12-24 settimane di somministrazione ed è escreto principalmente per via renale. Tutti i regimi contenenti sofosbuvir a piena dose si sono dimostrati sicuri anche nei pazienti con compromissione renale da moderata a grave (con eGFR <30 ml/min/1,73 m²) e in quelli con malattia renale allo stadio terminale che richiede emodialisi, con o senza scompenso epatico.

2. Sofosbuvir/velpatasvir (*Epclusa*®)

La combinazione di sofosbuvir, inibitore della polimerasi NS5B e velpatasvir, inibitore di NS5A, rappresenta un regime libero di inibitori delle proteasi (PI). Viene somministrato in dosaggio di 400/100mg/die in un'unica compressa, con o senza cibo, per 12 settimane.

Secondo le linee guida italiane è un'opzione terapeutica di prima scelta sia in termini di efficacia che di profilo di sicurezza. I tassi di SVR tra il 98% e il >99% raggiunti con questa combinazione indicano un'eccellente attività antivirale contro i genotipi più comuni (1,2 e 3). La combinazione SOF/VEL risulta vantaggiosa anche nei pazienti con cirrosi epatica scompensata (cirrosi Child-Pugh B) in cui gli inibitori delle proteasi sono controindicati ed è risultata sicura ed efficace anche nei pazienti co-infetti con HIV-1. Nei pazienti con infezione da genotipo 3 e cirrosi epatica (Child-Pugh B) l'aggiunta di Ribavirina può essere considerata. Inoltre, tutti i farmaci forti induttori del CYP/P-gp devono essere evitati a causa del rischio di perdita di efficacia antivirale.

Mal di testa, affaticamento e nausea sono gli eventi avversi più comunemente segnalati.

3. Glecaprevir/Pibrentasvir (*Maviret*®)

Il glecaprevir, un inibitore delle proteasi e pibrentasvir, l'inibitore di NS5A, formano un'altra associazione di DAA pangenotipica disponibile a dose fissa di 100/40mg da assumere in 3 compresse una volta al giorno con il cibo (ne migliora notevolmente la disponibilità plasmatica). La via prevalente di eliminazione di entrambe le molecole è biliare. Rappresenta anch'essa un'opzione terapeutica di prima scelta.

Un vantaggio di GLE/PIB è la ridotta durata del trattamento, che si traduce anche in un miglioramento dell'aderenza al trattamento: è possibile raggiungere SVR 98% in solo 8 settimane nei pazienti naive a regimi a base di IFN e con epatite cronica o cirrosi. Nei pazienti experienced, con cirrosi e infezione da genotipo 3 è necessario prolungare la terapia a 12 o 16 settimane. Lo svantaggio è che l'inclusione di un PI ne limita l'uso in pazienti con malattia epatica scompensata (Child-Pugh B o C).

4. *Grazoprevir/Elbasvir (Zepatier®)*

Grazoprevir ed elbasvir sono disponibili in una combinazione a dose fissa contenente 100/50 mg in una singola compressa, assunta per via orale una volta al giorno con o senza cibo. La principale via di eliminazione è biliare e fecale, con il <1% escreto nelle urine. Analogamente a GLE/PIB, grazoprevir/elbasvir non deve essere usato in pazienti con cirrosi epatica scompensata (Child-Pugh B o C) ed è limitato ai pazienti infetti da genotipo 1b e 4, nei quali raggiunge un tasso di SVR del 97%.

5. *Sofosbuvir/Velpatasvir/Voxilaprevir (Vosevi®)*

L'associazione di questi tre farmaci è disponibile a dose fissa di 400/100/100 mg in una singola compressa, da assumere per via orale una volta al giorno, con il cibo (aumenta la biodisponibilità del voxilaprevir). Voxilaprevir viene escreto principalmente attraverso la bile. Può essere utilizzato per tutti i genotipi e la durata di trattamento varia da 8 settimane, in caso di epatite cronica, fino a 12 settimane in caso di cirrosi epatica (Child-Pugh A). Invece, in pazienti con compromissione epatica moderata (Child-Pugh B) o grave (Child-Pugh C) questa associazione non deve essere usata.

Mal di testa, diarrea e nausea sono gli eventi avversi più comunemente riportati.

È suggerito non utilizzare lo schema SOF/VEL/VOX come trattamento di prima linea in quanto rappresenta l'unica opzione di ritrattamento rimborsabile dal SSN per i pazienti che hanno già fallito una terapia comprendente ≥ 2 DAA.

2.6 Follow up post-trattamento (86)

Le linee guida italiane (AISF) ed europee (EASL) pongono le seguenti raccomandazioni per la sorveglianza dei pazienti che ottengono una risposta virologica sostenuta con i nuovi farmaci antivirali:

- ❖ Pazienti con fibrosi assente o lieve-moderata (METAVIR F0-F2) che ottengono SVR:
 - o senza avere comorbidità pre-terapia non necessitano di un follow up epatologico.
 - o I pazienti con comorbidità pre-terapia (sindrome metabolica, autoimmunità, abuso di alcol, coinfezioni virali) hanno indicazione ad un controllo annuale a causa del rischio di progressione della fibrosi, che prevede: l'esecuzione di esami ematochimici di funzionalità epatica, ecografia addome superiore ed elastometria epatica (Fibroscan).
- ❖ Tutti i pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi (METAVIR F3-F4) che ottengono la SVR devono continuare il monitoraggio a causa del rischio di scompenso della cirrosi e di sviluppo dell'epatocarcinoma cellulare (HCC). In particolare:
 - o Pazienti con cirrosi clinicamente evidente e/o valori di Fibroscan >10kPa pre-terapia, vanno visti a cadenza semestrale con ecografia del fegato associata al dosaggio dell'alfa-fetoproteina (AFP).
 - o Pazienti con valori di Fibroscan >20 kPa e/o i valori di piastrine <150.000/mm³ al basale pre-terapia, hanno indicazione ad eseguire anche una esofago-gastroscopia per valutare la presenza di varici esofagee.
- ❖ In tutti i pazienti che presentano un incremento delle transaminasi dopo aver ottenuto la SVR è necessario verificare la presenza del HCV RNA al fine di escludere un'eventuale reinfezione (Si ricorda che gli anticorpi non sono protettivi). In caso di positività, il paziente va ritrattato con la combinazione di DAA appropriata.

3 SCREENING DELL'HCV

3.1 Obiettivo globale di eliminazione dell'HCV

Alla luce delle nuove eccellenti opzioni di trattamento, che si sono dimostrate efficaci nel curare l'infezione da HCV e con minimi effetti collaterali, nel 2016 la WHO ha sviluppato un'ambiziosa strategia globale di eliminazione del virus dell'epatite C: l'obiettivo prefissato è quello di ottenere una riduzione dell'90% di nuove infezioni e 65% della mortalità associata all'HCV entro l'anno 2030. Questo implica che almeno il 90% degli individui con infezione da HCV deve essere identificato e oltre l'80% deve essere trattato. (87)

Fino ad ora sono stati fatti dei buoni progressi, con oltre 10 milioni di persone con infezione cronica da HCV curate utilizzando un trattamento antivirale ad azione diretta. Tuttavia, secondo i dati del 2019, ci sono ancora 58 milioni di persone con l'infezione da HCV cronica, e 399.000 morti associate. (88)

Solo il 20% di soggetti infetti in tutto il mondo è stato diagnosticato e 13% trattato. Questi dati impongono che, per colmare questa lacuna e raggiungere gli obiettivi della WHO di eliminazione dell'HCV, i percorsi diagnostico-terapeutici devono essere semplificati e resi accessibili a tutti. (89)

Sebbene le sfide più grandi risiedano nei paesi a reddito medio-basso in cui, per ovvie ragioni economiche e logistiche, la possibilità di avere una diagnosi precoce e l'accesso tempestivo alle cure rimane ancora limitata, nemmeno in paesi ad alto reddito la situazione sembra essere ottimale. Secondo un'analisi del 2020, solo 11 dei 45 paesi ad alto reddito sembrano essere sulla buona strada verso gli obiettivi di eliminazione dell'HCV entro il 2030 (Australia, Canada, Francia, Germania, Islanda, Italia, Giappone, Spagna, Svezia, Svizzera e Regno Unito; altri cinque (Austria, Malta, Paesi Bassi, Nuova Zelanda e Corea del Sud) entro il 2040 e due (Arabia Saudita e Taiwan) entro il 2050. I restanti 27 paesi,

compresi gli Stati Uniti, non dovrebbero raggiungere l'eliminazione prima del 2050. (90)

3.2 Ruolo e scopo dello screening

In assenza di un vaccino efficace, l'eliminazione dell'HCV può essere ottenuta solo attraverso il trattamento con DAA combinato con le pratiche di prevenzione e interventi nell'ambito di sanità pubblica. (91) Non essendo disponibile un vaccino per l'HCV, le pratiche di prevenzione primaria attualmente disponibili mirano a impedire la trasmissione del virus limitando l'esposizione ai principali fattori di rischio, sia della popolazione generale (attraverso lo screening del sangue e di emoderivati, educazione all'uso sicuro di aghi nell'ambito sanitario e non), sia delle popolazioni a maggior rischio come tossicodipendenti, MSM HIV-positivi (attraverso i counseling appropriati).

Essendo numerose le persone infette che rimangono asintomatiche per molto tempo dopo l'infezione, fare uno screening per l'identificazione dell'HCV (attraverso il rilevamento di anticorpi anti-HCV) nell'ambito di prevenzione secondaria, è fondamentale. (88)

Un programma di screening efficace consente di arrivare ad una diagnosi precoce che, a sua volta, permette di migliorare l'outcome clinico di soggetti con infezione attiva, riducendo il rischio di cronicizzazione della malattia, caratterizzata dallo sviluppo di numerose complicanze epatiche ed extraepatiche.(19)

3.3 Le principali raccomandazioni

Un elemento fondamentale, che definisce poi l'efficacia e il successo di uno screening, è la scelta della popolazione da sottoporre al test. Questa si basa principalmente sui dati di prevalenza dell'HCV ed è giustificata dai comprovati benefici della cura e del trattamento nel ridurre il rischio di progressione della malattia epatica, del carcinoma epatocellulare (HCC) e

di mortalità per tutte le cause, nonché dal potenziale beneficio per la salute pubblica tramite la riduzione della trasmissione del virus. Nella maggior parte dei paesi (europei e non), lo screening del virus dell'epatite C (HCV) è raccomandato nelle seguenti popolazioni considerate ad aumentato rischio di esposizione/infezione: (19,86)

- Consumatori attuali o passati di droghe iniettabili (PWID)
- Coloro che hanno ricevuto sangue, componenti del sangue o trapianti di organi prima del 1990
- Soggetti attualmente o precedentemente in emodialisi a lungo termine e con livelli persistentemente anormali di transaminasi
- Individui con infezione da HIV
- Soggetti con tatuaggi e/o piercing
- Detenuti in carcere o strutture socio-sanitarie (orfanotrofi, case-famiglia)
- Operatori sanitari e di pubblica sicurezza dopo punture da aghi, lesioni da taglio o esposizione della mucosa al sangue HCV-positivo
- Bambini nati da madri HCV-positive
- Individui con più partner sessuali (soprattutto omosessuali maschi)
- Individui sottoposti a procedure mediche invasive in passato, come interventi chirurgici maggiori ed endoscopici
- Soggetti che appartengono alle determinate coorti di nascita (ad es. in Italia coorti 1969-1989; negli Stati Uniti coorti 1945-1965)

Tuttavia, per raggiungere l'obiettivo della WHO non basta diagnosticare e trattare solo le popolazioni che sappiamo essere ad alto rischio di acquisizione e di trasmissione dell'HCV. È necessario andare oltre ed estendere l'applicazione di tutte le pratiche diagnostico-terapeutiche anche alla popolazione generale, soprattutto nei paesi altamente endemici per il virus dell'epatite C. In particolare, è necessario andare a identificare tutti i soggetti inconsapevoli dell'infezione, che costituiscono il serbatoio dell'HCV. È stato stimato che questi soggetti possano rappresentare il 45-85% di tutti gli infetti. (92)

3.4 Strategie di screening

L'obiettivo di eliminazione dell'HCV richiede piani d'azione specifici per l'epatite C a livello nazionale che includano un approccio olistico alla consapevolezza della malattia, alla prevenzione e all'assistenza integrata, combinando la volontà e le risorse a disposizione in una risposta congiunta. (87)

L'Organizzazione mondiale della sanità ha stabilito le misure necessarie per raggiungere l'obiettivo finale e ha un ruolo importante nell'orientamento di tutti i paesi verso la sua realizzazione. Tuttavia, date le differenze nell'epidemiologia e nel carico di malattia nelle diverse regioni del mondo, ogni paese dovrebbe identificare al suo interno le popolazioni più colpite e adattare la sua risposta di conseguenza, agendo sempre in conformità con le misure stabilite dalla WHO.(91)

Un aspetto importante e che condiziona la definizione degli obiettivi a livello nazionale e l'implementazione di un piano di prevenzione, diagnosi e cura è l'aspetto economico.

Il costo di eliminazione dell'HCV comprende la sorveglianza, la valutazione dei piani d'azione nazionali, le campagne di sensibilizzazione e comunicazione, i programmi di prevenzione della trasmissione (educare le persone che praticano l'iniezione, garantire la sicurezza delle trasfusioni ecc.), i programmi di screening e trattamento.

La spesa per la prevenzione rimane bassa in molti paesi rispetto alle somme spese per il trattamento. È necessario combattere l'errata convinzione che a lungo termine la prevenzione, in questo caso l'implementazione di un programma di screening, possa costare più del trattamento. I costi iniziali sono elevati, ma a lungo termine questi si ripagano, in quanto si vanno a evitare tutte le complicanze della malattia che nel futuro peserebbero sul Sistema Sanitario Nazionale.(91)

Uno studio italiano pubblicato nel 2021 ha mostrato come, trattando 10.000 pazienti, tutti nuovi diagnosticati attraverso uno screening attivo per l'HCV, si riesce ad evitare la progressione della malattia in 7769

pazienti nell'arco di di 20 anni. Questo si traduce in un risparmio di 838,73 milioni di euro al SSN italiano e l'investimento iniziale nel trattamento, quindi, verrebbe recuperato in 4,3 anni in termini di costi evitati grazie alla prevenzione delle complicanze.(93)

Oltre a trovare una valida strategia di screening da applicare a livello nazionale, è necessario garantire a tutti i soggetti positivi un adeguato e tempestivo percorso verso la cura (Linkage-To-Care, LTC). Molti programmi nazionali di eliminazione devono ancora trovare una valida strategia che non faccia perdere troppi pazienti nel loro percorso verso l'assistenza clinica e inizio del trattamento.

Si rende necessario trovare una strategia di screening che possa garantire un migliore collegamento con l'assistenza alle persone con nuova diagnosi di HCV.

Alcune delle strategie proposte dalla ECDC (European Center for Disease prevention and Control) sono: (94)

- o Considerare particolari coorti di nascita o *universal one-time testing* tenendo conto dell'epidemiologia locale e l'accessibilità alle cure.
- o Screening geograficamente mirato: identificare le persone inconsapevoli dell'infezione in regioni ad alta prevalenza dell'HCV
- o Eseguire i test per l'HCV nell'ambito delle cure primarie può contribuire efficacemente ad aumentare il numero di casi rilevati. Sono accettabili sia i test rapidi su sangue o saliva che i test su DBS.
- o Testare tutti i pazienti con diagnosi di infezione da HIV e/o HBV.
- o L'autocampionamento e l'autotest sono opzioni aggiuntive che offrono alle persone la flessibilità e la privacy di eseguire un test iniziale per l'HCV nelle proprie case o in un luogo che ritengono conveniente. Tuttavia, ad oggi ci sono poche prove scientifiche sull'efficacia dell'autocampionamento per poter giungere a conclusioni definitive in merito alla sua inclusione in una strategia nazionale.

- o "Decentralizzare" l'assistenza e introdurre i cosiddetti Point-of-Care (POC), trasferendo le pratiche diagnostiche e terapeutiche al di fuori dall'ospedale, in strutture di assistenza sociale, carceri, centri per le dipendenze, centri di assistenza ai migranti, etc. I POC offrono quindi la possibilità di eseguire i test di screening in un ambiente accessibile anche alle popolazioni disagiate, semplificando l'intero percorso diagnostico-terapeutico e migliorando l'aderenza al trattamento.

Anche la WHO sta incoraggiando i paesi a prendere in considerazione l'inclusione dell'uso di test eseguiti nei vari POC nelle loro politiche nazionali sull'epatite C. Recentemente hanno pubblicato uno studio che ha confrontato l'utilizzo di test di carica virale per l'HCV nei vari POC con approcci standard centralizzati, laboratory-based. Lo studio ha dimostrato che, l'utilizzo di test direttamente nei POC riduce i tempi che trascorrono dall'esecuzione dello screening iniziale (che prevede la ricerca degli anticorpi anti-HCV) all'inizio del trattamento (19 giorni rispetto a 67 giorni) e migliora notevolmente l'aderenza al trattamento. Infatti, i migliori risultati sono stati osservati quando sia il test che il trattamento sono stati offerti nello stesso sito POC, consentendo di iniziare il trattamento il giorno stesso della diagnosi (concetto di *"one-stop, same-day diagnosis and treatment"*). Questo concetto è particolarmente utile per includere le popolazioni difficili da raggiungere come tossicodipendenti o homeless che altrimenti sarebbero facilmente persi al follow up. (89)

La pandemia di COVID-19 ha provocato una notevole espansione di questi POC in molti paesi, offrendo l'opportunità di condivisione degli stessi per effettuare lo screening dell'HCV, riducendo in questo modo anche i costi. Molti paesi, tra cui Australia, Cambogia, Malesia e Myanmar, hanno adottato questa strategia nei loro programmi nazionali.(89)

Un'altra strategia interessante, nata anche essa nei tempi della pandemia di COVID-19 e praticata anche in Italia, è di sfruttare i punti di vaccinazione per il SARS-CoV2 per la promozione ed esecuzione gratuita di test anti-HCV rapidi (generalmente durante il periodo di osservazione

post-vaccinazione). Tuttavia, questi programmi di screening opportunistico hanno delle limitazioni, soprattutto logistiche e organizzative e da un punto di vista economico risultano sub ottimali, soprattutto se confrontati con uno screening organizzato (come quello basato sulle determinate coorti di nascita) (95)

Di seguito, alcuni esempi di piani nazionali di screening:

- Egitto: un progetto nazionale su larga scala è stato recentemente condotto in questo paese, noto per avere la prevalenza più alta di infezione da HCV, come conseguenza del trattamento non sicuro della schistosomiasi negli anni 1950-1980. Lo scopo era di sottoporre allo screening entro 1 anno tutti i cittadini di età superiore ai 18 anni. Un totale di 50 milioni di persone è stato sottoposto allo screening entro 7 mesi. Le persone sono state testate per gli anticorpi anti-HCV con l'uso di un test diagnostico rapido finger-prick, con risultati disponibili entro 20 minuti. Ai pazienti sieropositivi è stato immediatamente programmato un'appuntamento a distanza di 2-15 giorni nel centro assegnato più vicino per la valutazione ed eventualmente per il trattamento. In questa sede, i pazienti hanno ricevuto una valutazione clinica, un'ecografia addominale e sono stati prelevati sangue per HCV RNA e test di funzionalità epatica. Dopo 5 giorni, i pazienti dovevano ritornare per i risultati. A tutti i soggetti viremici è stato prescritto un trattamento con i DAAs.

La sieroprevalenza complessiva dell'HCV tra i soggetti screenati è stata del 4,61% (2.2 milioni di persone). La viremia è stata rilevata in 1,1 milioni di cittadini, di cui il 92% ha iniziato il trattamento con DAA. (96)

- Islanda: lo screening nazionale in questo paese invece, è rivolto ai gruppi ad alto rischio ovvero ai PWID e vuole dimostrare l'importanza dello screening in questa categoria di soggetti, ancora oggi difficili da raggiungere e trattare. Sebbene le persone PWID HCV-positivo siano solo una minoranza di individui HCV-positivi a livello globale, i programmi in grado di ridurre la trasmissione delle PWID hanno un impatto globale sull'incidenza, in quanto questi sono la principale fonte

di infezioni de novo. Solo con l'espansione della copertura (in termini di diagnosi e trattamento) dei PWID al 95%, senza fare qualsiasi altro intervento, si potrebbe ridurre l'incidenza globale delle infezioni da HCV del 33% entro il 2030. (1,97)

3.5 Impatto della pandemia Covid-19

È evidente come la pandemia COVID-19 ha indubbiamente reso più impegnativa la lotta contro molte malattie, tra cui l'epatite C. Ha significativamente rallentato, se non bloccato, i programmi diagnostici e terapeutici nella maggior parte del mondo.

Per quanto riguarda specificamente il raggiungimento degli obiettivi della WHO di eliminazione dell'epatite C, il vero impatto della pandemia sugli sforzi fatti finora è ancora da definire.

Tutti i modelli analitici per valutare i progressi verso l'eliminazione dell'HCV entro il 2030 si basano sui dati di trattamento e screening fino al 2019, senza includere l'impatto della pandemia di COVID-19 sui servizi correlati all'epatite. (91)

In una recente valutazione effettuata utilizzando il modello della Polaris Observatory, adattato alla riduzione dell'inizio del trattamento causato dalla pandemia, è stato stimato che lo scenario di "ritardo di 1 anno" (a livello globale) avrebbe causato 44.800 (95% [UI]: 43.800-49.300) casi di carcinoma epatocellulare (HCC) in eccesso e 72.300 (95% UI: 70.600-79.400) morti correlate al fegato in eccesso, rispetto allo scenario "senza ritardo", nel periodo che va dal 2020 al 2030. La maggior parte dei trattamenti mancati sarebbe nei paesi a reddito medio-basso, mentre la maggior parte dei decessi correlati al carcinoma epatocellulare in eccesso e al fegato sarebbero nei i paesi ad alto reddito.(98)

3.6 Situazione in Italia

L'Italia è tra i Paesi europei con il maggior numero di persone esposte al virus dell'epatite C.

Nel 2017, l'Osservatorio Polaris ha stimato una prevalenza dell'1,1% di soggetti viremici in Italia rispetto allo 0,5% dell'Europa occidentale.

Oggi, in Italia la prevalenza di persone affette da epatite C si stima essere tra 0,74 e 1,7% (circa 297.000 – 670.000 soggetti). (86)

Il numero stimato dei portatori di HCV, non consapevoli della loro infezione, ammonta a più di 288 000 persone, una proiezione che rafforza la necessità di ampliare l'accesso della popolazione a programmi di screening efficaci.

Nel 2021, il Governo italiano ha promulgato un decreto specificamente finalizzato all'attuazione di strategie di screening dell'HCV, attraverso l'introduzione di un programma di screening gratuito focalizzato su popolazioni chiave, come le persone che si iniettano droghe (PWID), i detenuti nelle carceri e le coorti della popolazione generale nati tra il 1969 e il 1989. (99)

L'efficacia economica di tale modello di screening graduato è giustificata e supportata dai dati epidemiologici, secondo i quali vi è un'alta prevalenza di non diagnosticati ("sommersi") tra i soggetti nati tra il 1969 e il 1989. Queste sarebbero le persone con il rischio più elevato di trasmettere l'HCV, oltre alle PWID e ad altri gruppi a rischio. (100)

Dati provenienti da alcuni programmi di screening condotti dopo l'inizio dello screening nazionale, depongono al favore di una l'estensione dello screening alle persone nate prima del 1969. (101) Sebbene questa coorte può avere un minore potenziale di trasmissione del virus e il trattamento dell'infezione da HCV dei grandi anziani comporterebbe meno QALYs, la prevalenza sproporzionatamente elevata dell'infezione in questa coorte di nascita giustifica l'inclusione della coorte di nascita <1969 nel programma di screening.

SCOPO DELLO STUDIO

Questo progetto pilota, condotto nel territorio di Padova, ha lo scopo di offrire uno screening dell'HCV, rivolto alla popolazione generale e non solo ai gruppi di soggetti considerati a maggior rischio di infezione. In particolare, questo studio ha l'obiettivo di dimostrare l'applicabilità di un test salivare rapido, quindi un test non invasivo, in grado di identificare l'infezione da virus dell'Epatite C nella popolazione generale.

Come lo screening per l'Epatite C attivo nella regione del Veneto a partire dal 16 maggio 2022, destinato però solo alle persone nate tra il 1969 e 1989 (che si stima abbiano un'alta prevalenza di soggetti cosiddetti "sommersi"), anche questo ha tra i suoi obiettivi principali quello di:

- rilevare l'infezione da HCV in soggetti inconsapevoli, quindi non ancora diagnosticati e
- garantire un trattamento antivirale precoce, dimostratosi altamente efficace non solo nell'eradicazione virale, ma anche nel portare ad una riduzione significativa della progressione della malattia verso la cirrosi e le sue complicazioni, che poi impattano gravemente la qualità di vita del paziente.

MATERIALI E METODI

Lo screening è stato realizzato mediante l'utilizzo di test salivare rapido (OraQuick® HCV Rapid Antibody Test) caratterizzato da una sensibilità del 98.1% (IC 96.9-99.0%) e da una specificità del 99.6% (IC 99.2-99.9%). Si tratta di un test immunologico manuale della durata di 20 minuti, a lettura visiva, per la rilevazione qualitativa di anticorpi anti-HCV presenti nella saliva. Questo test è stato proposto gratuitamente e indistintamente a soggetti di ogni età, sesso e nazionalità, in assenza o presenza di fattori di rischio specifici per l'infezione da HCV. Trattandosi di un test di semplice esecuzione, adatto per l'utilizzo sia in contesto clinico che comunitario, il test poteva essere eseguito presso lo studio del proprio Medico di Medicina Generale oppure in giornate di screening di massa organizzate in piazze centrali comunali, realizzate in collaborazione con la Croce Rossa Italiana (Comitato di Padova), l'UOSD Trapianto Multiviscerale (TMV) e l'UOC Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova-Università di Padova e con le amministrazioni comunali coinvolte.

Prima di effettuare il test, ad ogni soggetto coinvolto è stato chiesto di compilare un questionario indagante i principali fattori di rischio per l'infezione da HCV (Allegato 1): sesso, età, anno di nascita, nazionalità, peso e altezza, utilizzo di sostanze stupefacenti negli ultimi 6 mesi, presenza di tatuaggi e/o piercing, unità alcoliche settimanali, esecuzione di cure dentarie all'estero, anamnesi positiva per HIV e/o HBV, rapporti sessuali non protetti negli ultimi 6 mesi, pregressa infezione da HCV.

Successivamente, si procedeva con l'esecuzione del test: come illustrato nell'immagine sottostante (Figura 1), i partecipanti dovevano aprire la confezione, estrarre il tampone e usare questo dispositivo per raccogliere il campione di saliva, tamponando una volta intorno al lato esterno delle gengive superiori e inferiori. Una volta completata la raccolta del campione, i pazienti dovevano inserire il tampone nel flaconcino contenente la soluzione e aspettare circa 20 minuti per avere il risultato.

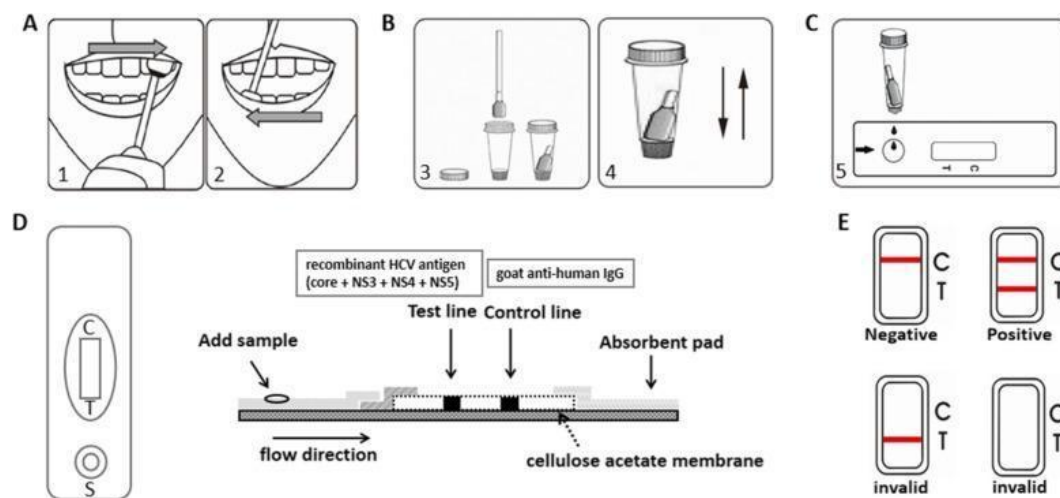


Figura 12

I dati sono stati raccolti dal 18/01/2020 al 02/10/2022.

L'età è stata suddivisa in sei classi: 18-25, 26-30, 31-40, 41-50, 51-65 e over 65.

In base all'anno di nascita la popolazione studiata è stata divisa in tre coorti: nati prima del 1969, nati tra il 1969 e il 1989 e nati dopo il 1989.

La nazionalità è stata espressa in: Italiana, Europea, Extraeuropea (intesa come al di fuori dell'Unione Europea).

Il Body Mass Index (BMI) è stato calcolato come peso (Kg)/altezza²(m) e successivamente ne è stata calcolata la media.

In alcuni punti del questionario i soggetti non hanno fornito una risposta; questi verranno riportati nei risultati come "ND".

I dati sono stati analizzati complessivamente in senso numerico e percentuale utilizzando il software Microsoft Excel.

RISULTATI

Lo studio ha coinvolto 1498 soggetti. Di questi, 17 sono risultati positivi. Tuttavia, in solo 3 soggetti è stata confermata la positività attraverso la successiva ricerca del HCV RNA. Questo ci ha permesso di ottenere la prevalenza dell'infezione da HCV nella popolazione generale che si stima essere intorno a 0.2%. (Le loro caratteristiche socio-demografiche sono rappresentate nella tabella 7, mostrata in seguito)

Sesso

I soggetti maschili che hanno aderito allo screening sono stati 638 (43%), mentre quelli di sesso femminile 823 (55%); per il 2% del campione questo dato è rimasto sconosciuto. (Figura 13)

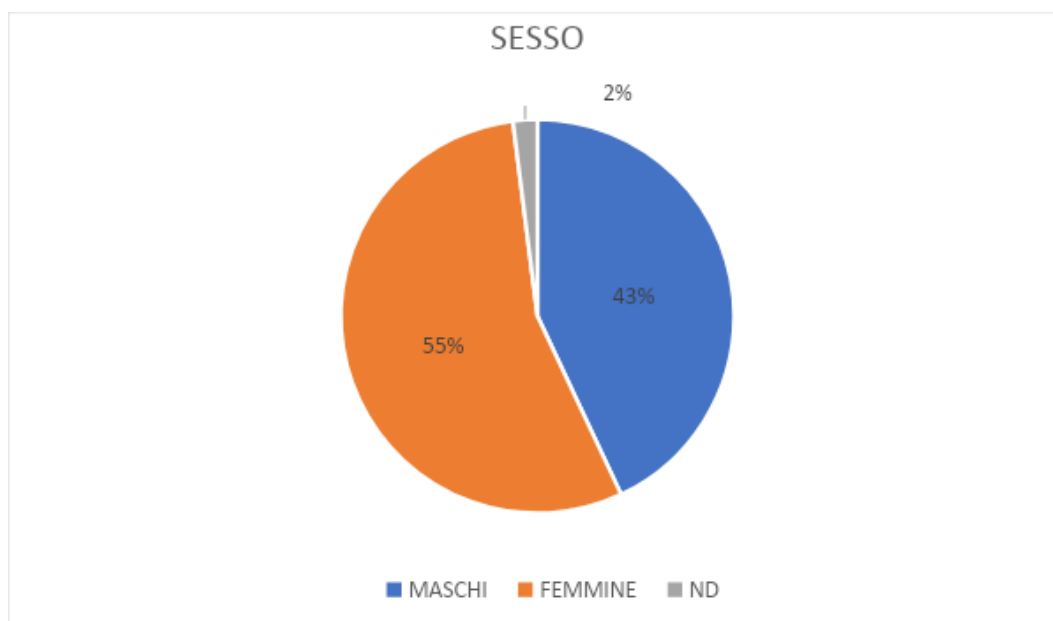


Figura 13 Distribuzione del sesso nella popolazione studiata

Nazionalità

La maggior parte delle persone che hanno partecipato allo studio erano Italiane 1289 (86%), 42 provenivano dall'Unione Europea (3%), 56 erano originarie al di fuori dell'Europa (4%) mentre 111 (7%) non hanno risposto al quesito. (Figura 14)



Figura 14 Distribuzione per nazionalità del campione studiato.

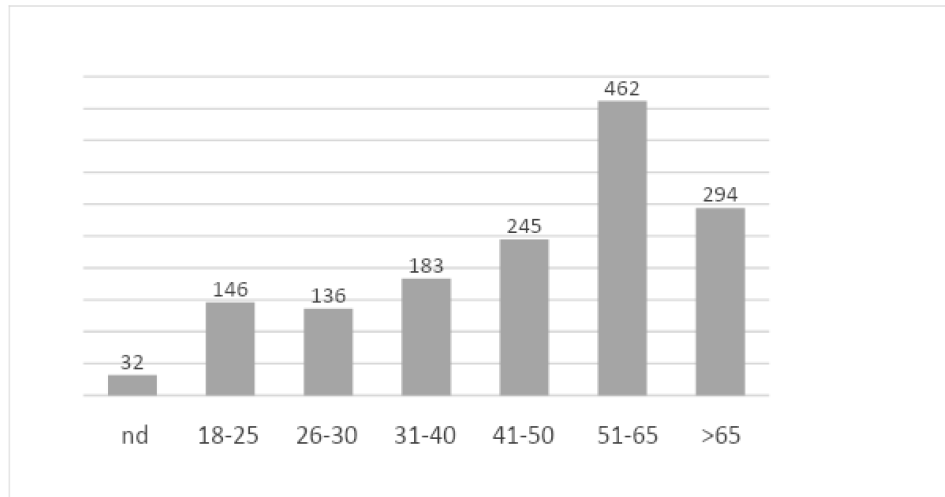
Età

Tabella II

CLASSE DI ETÀ	n	%
18-25	146	9.74
26-30	136	9.07
31-40	183	12.21
41-50	245	16.35
51-65	462	30.84
>65	294	19.62
ND	32	2.13

Considerando l'età, suddivisa in sei classi, osserviamo che 462 soggetti (30.84%) rientrano nella classe di età 51-65. Questa risulta la fascia di età più numerosa, rappresentando quasi un terzo della popolazione studiata.

Seguono poi, in senso decrescente: la classe di over 65, che rappresentano 19.62%, le classi che comprendono i soggetti di mezza età: 41-50 (16%) e 31-40 (12%) e infine, le classi che comprendono i soggetti più giovani: 26-30 (9%) e 18-25 (10%); 32 soggetti ("ND") non hanno inserito la classe di età a cui appartengono (2%). (Tabella 5)



Successivamente, in base all'anno di nascita che è stato chiesto di inserire nel questionario, sono state costruite tre coorti:

1. Nati prima del 1968
2. Nati tra il 1969 e 1989
3. Nati dopo il 1990

Possiamo notare che la maggior parte dei partecipanti risultano essere nati prima del 1968 (55%); le coorti di nati tra 1969 e 1989 rappresentano 29% del campione, mentre i nati dopo il 1990 16%. (Figura 16)

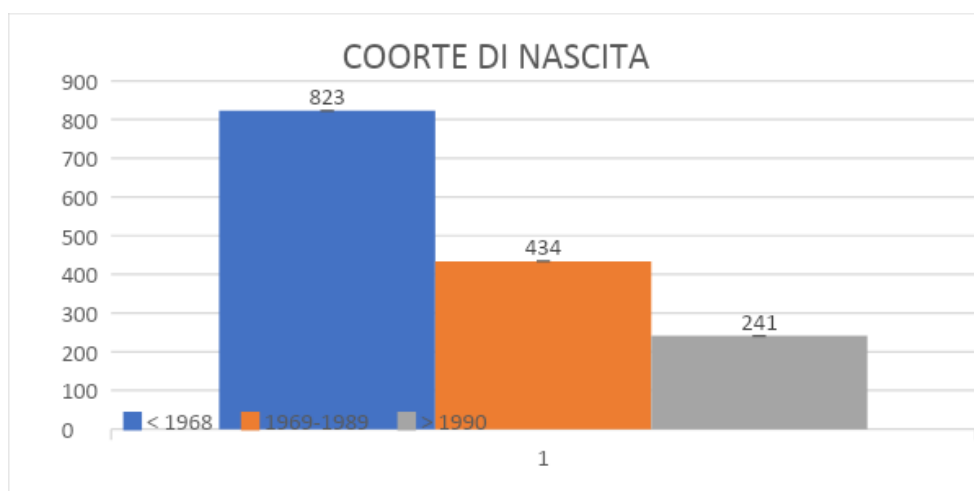


Figura 16 Distribuzione della popolazione studiata per coorte di nascita

Istruzione

Per quanto riguarda il livello di istruzione dei soggetti indagati, 45 di questi non ha alcun tipo di titolo di studio (3%), 426 soggetti hanno fatto scuola d'obbligo (28%), 603 hanno il diploma (40%), 309 hanno conseguito la laurea (21%) e 46 soggetti hanno un titolo post-universitario (3%); 69 soggetti ("ND") non hanno risposto al quesito (5%).

Tabella III

TITOLO DI STUDIO		
NESSUNO	45	3%
SCUOLA D'OBBLIGO	426	28%
DIPLOMA	603	40%
LAUREA	309	21%
POST-UNIVERSITARIO	3	3%
ND	69	5%

Professione

154 persone hanno dichiarato di essere studenti (10%), 92 casalinghe (6%), 317 sono pensionate (21%), 175 sono disoccupate (12%), 85 sono operai (6%), 260 sono dirigenti (17%), 91 impiegati (6%), 186 persone lavorano in libera professione (13%), 96 hanno dichiarato di fare altro (6%); 42 soggetti non hanno risposto (3%). (Tabella 4)

Tabella IV

PROFESSIONE		
STUDENTE	154	10%
CASALINGA	92	6%
PENSIONATO	317	21%
DISOCCUPATO	175	12%
OPERAIO	85	6%
DIRIGENTE	260	17%
IMPIEGATO	91	6%
LIBERO PROFESSIONISTA	186	13%
ALTRO	96	6%
ND	42	3%

BMI

Questo valore è sconosciuto per 551 soggetti per mancanza di dati quali peso e/o altezza, di conseguenza il Body Mass Index (BMI) è stato calcolato in un campione composto di 947 soggetti. Valore medio del campione è risultato essere 24,66 Kg/m².

Calcolando poi il valore medio di BMI in ciascuno dei sessi abbiamo ottenuto che la media nei maschi risulta essere 25,98 Kg/m², mentre la media nelle femmine è 23,71 Kg/m², come evidenziato nella Tabella 5.

Tabella V

	SESSO	BMI (Kg/m²)
MASCHI	374	25.98
FEMMINE	549	23.71
TOTALE	947	24.66

Tenendo conto dei criteri definiti dalla Organizzazione Mondiale della Sanità, che considerano come “normopeso” un BMI compreso tra 18.50 e 24.99, possiamo definire la nostra popolazione di femmine “normopeso”, mentre quella dei maschi leggermente in “sovrappeso” (BMI: 25.00-29.99).

Uso di sostanze

Delle persone che si sono sottoposte allo screening, 30 avevano fatto uso di sostanze stupefacenti nei 6 mesi precedenti (2%), 1434 non ne aveva fatto uso (96%) mentre 34 persone non hanno risposto al quesito (“ND”) (2%).

Per quanto riguarda la modalità di uso, delle 30 persone facenti uso di stupefacenti, tutte e 30 hanno dichiarato di fumare, 2 di farne uso per inalazione e 1 persona per via endovenosa.

Tabella VI

<i>SOSTANZE STUPEFACENTI</i>			
SI	NO		“ND”
30 (2%)	1434 (96%)		34 (2%)

<i>MODALITÀ DI USO</i>			
FUMO	30		
INALAZIONE	2		
ENDOVENA	1		

Consumo di alcol

Andando a vedere la quantità di alcol consumato a livello settimanale, 465 persone non assumevano alcol (31%), 372 assumeva meno di 3 unità alcoliche/settimana (25%), 67 ne assumevano meno di 6 unità/settimana e

25 persone ne assumevano più di 6 a settimana (2%); 569 soggetti non hanno risposto al quesito ("ND") (38%)

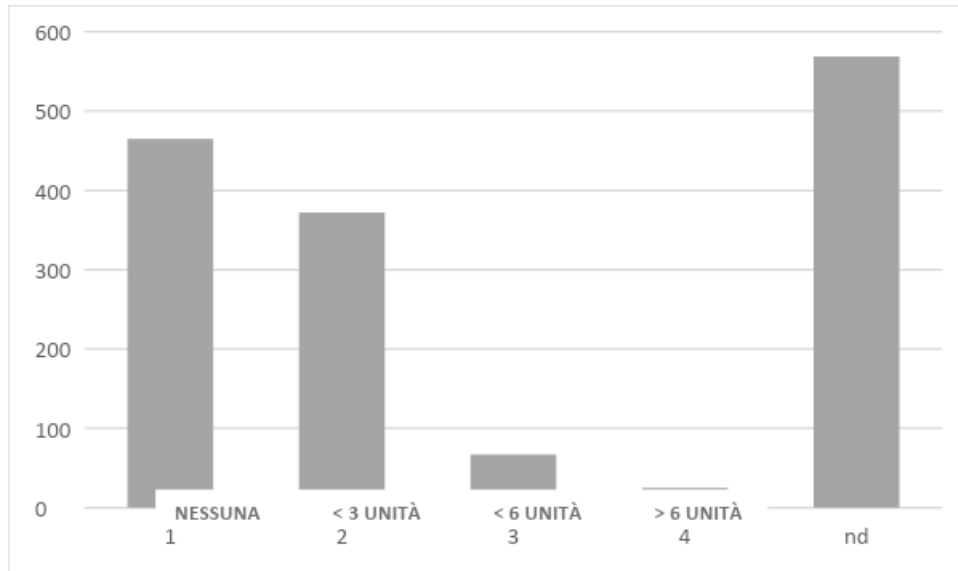


Figura 17 Distribuzione del consumo di unità alcoliche a settimana

Tatuaggi e/o piercing

123 soggetti avevano eseguito tatuaggi e/o piercing (8%), 843 soggetti non ne avevano mai eseguiti (56%); 532 soggetti non hanno dato alcuna risposta ("ND") (36%). (Figura 18)

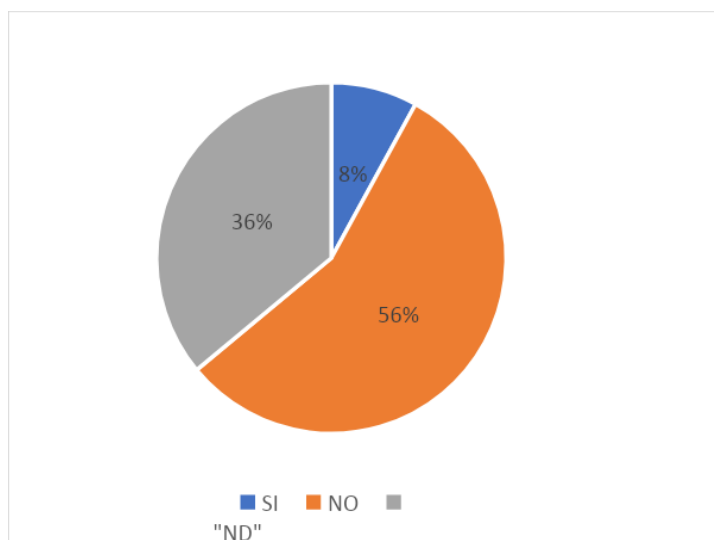


Figura 18 Distribuzione in base all'esecuzione di tatuaggi e/o piercing.

Cure dentarie all'estero

Alla domanda se avevano mai eseguito delle cure dentarie all'estero, 60 soggetti hanno risposto di sì (4%), 871 hanno detto di no (58%); 567 soggetti non hanno risposto al quesito ("ND") (38%). (Figura 19)

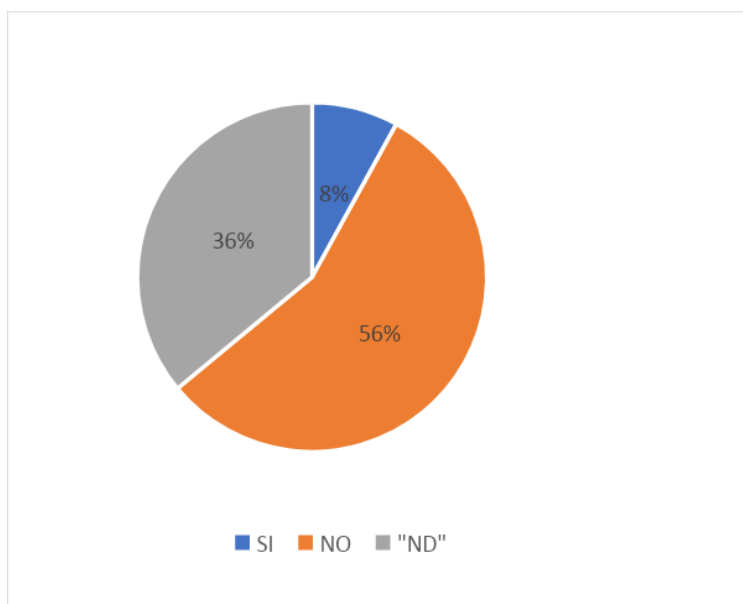


Figura 19 Distribuzione dell'esecuzione delle cure dentarie all'estero.

HIV

14 persone avevano anamnesi positiva per HIV (1%), 767 non ne erano affette (51%) mentre 133 persone hanno preferito non rispondere al quesito (9%); Invece 584 persone non hanno dato alcuna risposta ("ND") (39%). (Figura 20)

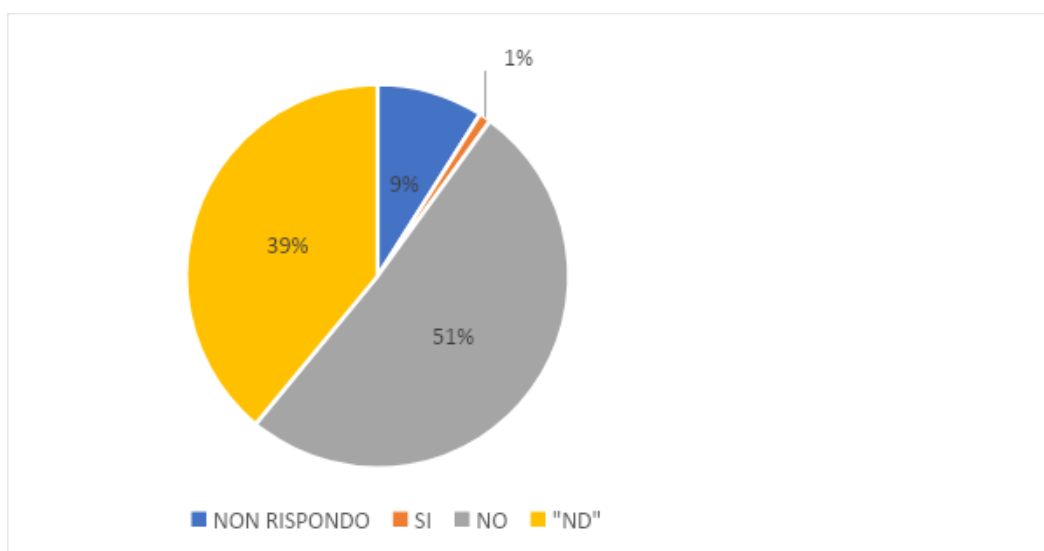


Figura 20 Distribuzione in base alla presenza/assenza di HIV in anamnesi

HBV

Per quanto riguarda la positività all'HBV, 18 persone avevano anamnesi positiva (1%), 650 non ne erano affette (43%), mentre 219 persone hanno risposto con "Non so" (15%); 611 persone non hanno risposto al quesito ("ND") (41%). (Figura 10)

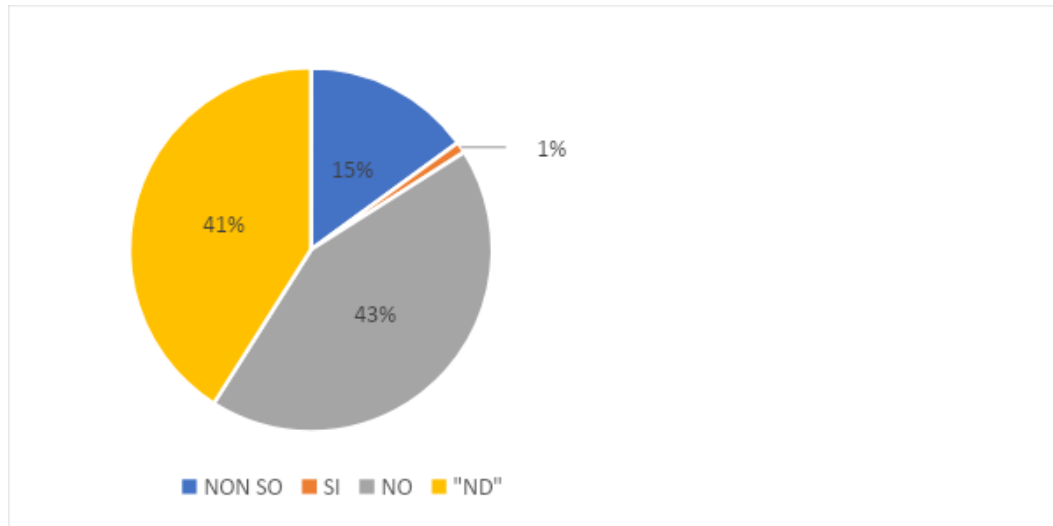


Figura 21 Distribuzione in base alla presenza/assenza di HBV in anamnesi

Rapporti sessuali non protetti

Ad avere rapporti sessuali non protetti negli ultimi 6 mesi, 327 soggetti hanno dato una risposta affermativa (22%), 1041 negativa (69%) mentre 39 hanno scelto di non rispondere al quesito (3%); 91 soggetti non ha dato alcuna risposta ("ND") (6%). (Figura 22)

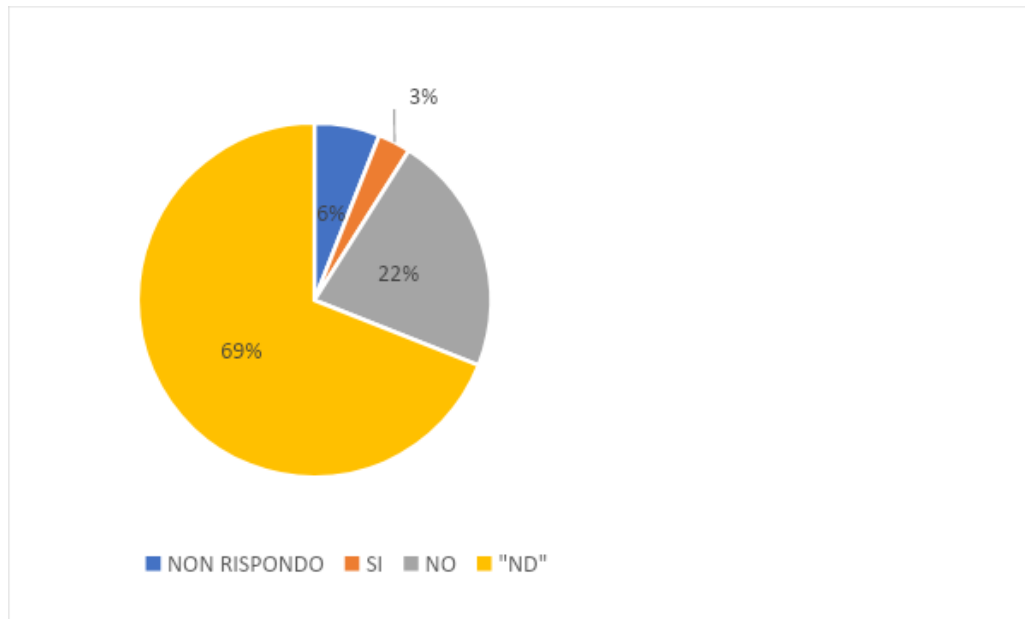


Figura 22 Distribuzione in base ad anamnesi positiva per rapporti sessuali non protetti nei pregressi 6 mesi.

HCV

Una sezione del questionario era dedicata alle domande che indagavano un po' la storia familiare e anamnesi per l'infezione da HCV.

Dei 1498 soggetti coinvolti nello studio, 77 di loro avevano un familiare o un convivente positivo all'HCV (5%). 1179 avevano risposto di non avere nessuno (79%), mentre 127 hanno preferito non rispondere al quesito (8%); 115 soggetti non hanno dato una risposta ("ND") (8%). (Figura 12)

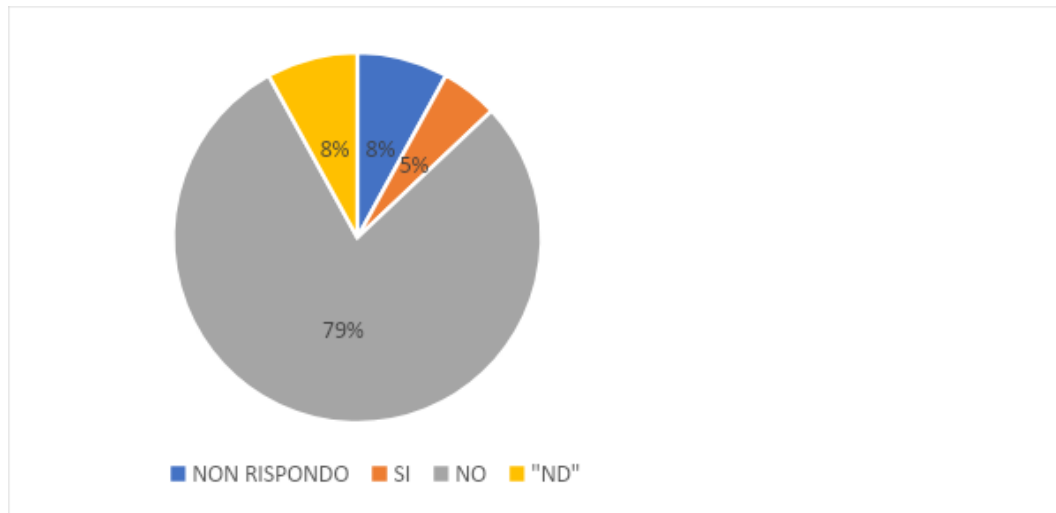


Figura 23 Distribuzione dell'infezione da HCV nei familiari/conviventi della popolazione sottoposta allo screening.

Invece, alla domanda “Ha o ha mai avuto HCV”, 158 soggetti avevano dato una risposta affermativa (11%), 1186 l'hanno negata (79%) mentre 31 soggetti hanno risposto di essere guariti (2%); 15 soggetti hanno scelto di non rispondere al quesito (1%) e 108 non hanno fornito una risposta (“ND”) (7%).

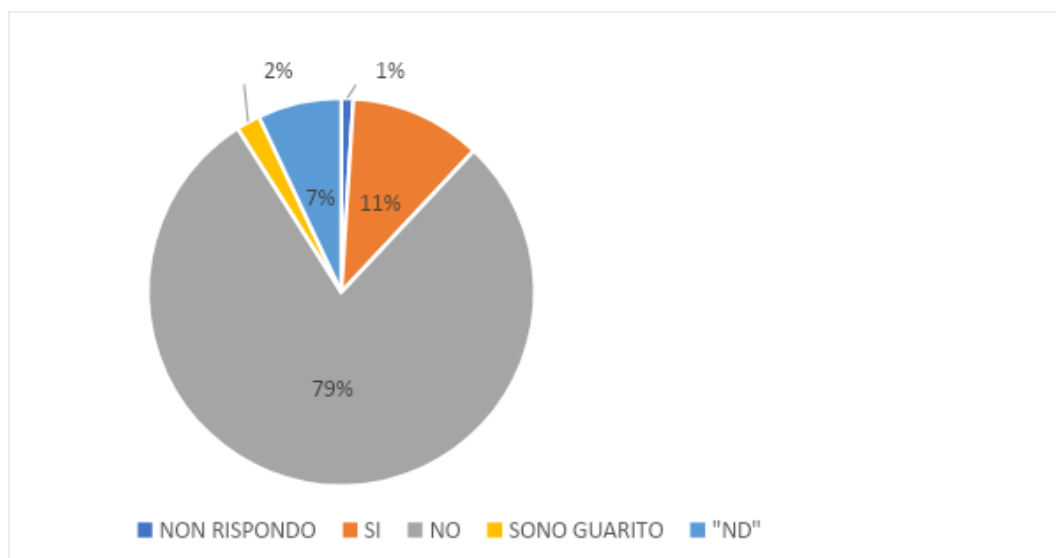


Figura 24 Distribuzione dell'infezione da HCV, attuale o pregressa, nella popolazione studiata.

Inoltre, agli indagati è stato chiesto se in passato avevano mai effettuato un test per verificare un eventuale infezione da virus dell'epatite C e, in caso di una risposta affermativa, di indicarne anche il motivo: 1223 soggetti non avevano mai eseguito il test (82%), 116 non hanno risposto al quesito ("ND") (8%) mentre 159 soggetti l'hanno già fatto (10%). Di questi ultimi, 40 soggetti hanno indicato come motivo l'intervento chirurgico (3%), 59 donazione del sangue (4%), 69 l'esecuzione di esami del sangue (5%), 5 per trasfusione, 19 per gravidanza (1%), mentre 84 persone l'hanno fatto per altri motivi (6%).

Tabella VII

TEST HCV	SI (159)	NO (1223)	ND (116)
INTERVENTO CHIRURGICO	40 (3%)		
DONAZIONE SANGUE	59 (4%)		
ESAMI DEL SANGUE	69 (5%)		
TRASFUSIONE	5		
GRAVIDANZA	19 (1%)		
ALTRO	84 (6%)		

Tabella VIII Caratteristiche socio-demografiche e potenziali fattori di rischio della popolazione positiva all'HC

<i>Caratteristiche</i>	Anti-HCV positivo n = 17 (1,13%)	HCV-RNA positivo n = 3 (0.2%)
Anno di nascita:		2 (67%) 1 (33%)
<1968	11 (64, 70 %)	
1969-1989	3 (17,64%)	
>1990	3 (17,64%)	
Sesso:		
Maschio	6 (35%)	1 (33%)
Femmina	11 (65%)	2 (67%)
Istruzione:		
Scuola d'obbligo	3 (18%)	
Diploma	7 (41%)	
Laurea	6 (35%)	
Nazionalità:		
Italiana	10 (56%)	1 (33%)
Europea	3 (18%)	1 (33%)
Extra-EU	1 (6%)	1 (33%)
Uso di sostanze:		
Sì	0	0
No	17(100%)	3 (100%)
Unità alcoliche/settimana:		
Nessuna	6 (35%)	2 (67%)
<3	6 (35%)	1 (33%)
<6	1 (6%)	
>6	0	
Tatuaggi/piercing:		
Sì	2 (12%)	
No	14 (82%)	
Cure dentarie all'estero:		
Sì	1 (7%)	
No	12 (71%)	

HIV positivo:		
Sì	0	0
No	12 (71%)	3 (100%)
HBV positivo:		
Sì	1 (6%)	0
No	9 (53%)	3 (100%)

Rapporti sessuali non protetti negli ultimi 6 mesi:		
Sì	4 (24%)	
No	13 (76%)	
Conviventi HCV positivi:		
Sì	1 (6%)	
No	14 (82%)	
HCV positivo:		
Sì	1 (6%)	
No	13 (76%)	
Guarito	3 (18%)	
Test HCV in passato:		
Sì	5 (30%)	
No	8 (47%)	

DISCUSSIONE

L'identificazione del virus dell'Epatite C nel 1989 è stata una delle più grandi scoperte nel campo medico del precedente secolo, tanto da permettere a tre ricercatori di essere insigniti con il Premio Nobel per la Medicina.

La storia della ricerca sull'HCV è considerata un modello per la ricerca traslazionale di successo: partendo da un'osservazione clinica di un'epatite definita "non-A, non-B" e attraverso l'identificazione dell'agente causante e dei suoi meccanismi, sono stati sviluppati dei farmaci specifici chiamati Direct Acting Antviral Agents (DAAs) che hanno reso l'epatite C la prima infezione virale cronica curabile.(1)

L'Epatite C è ancora la principale causa di malattia epatica avanzata, carcinoma epatocellulare (HCC), trapianto di fegato e di decessi correlati al fegato, soprattutto nel mondo occidentale.

Gli effetti dell'epatite C cronica, però, si estendono oltre la morbilità correlata al fegato e vanno ad impattare gravemente sulle condizioni generali e sulla qualità di vita della persona affetta.

Nonostante l'importante impatto clinico che i DAAs hanno nella cura dell'infezione cronica, o per lo meno nell'arresto della progressione della malattia nei casi più complicati, il carico dell'epatite C rimane alto principalmente per due ragioni: una è che l'accesso al trattamento non è universale e non è disponibile ugualmente a tutti e in tutte le regioni del mondo; il secondo motivo è che vi è un numero importante di soggetti inconsapevoli dell'infezione e di conseguenza non diagnosticati.

Tutte queste considerazioni hanno spinto le istituzioni più importanti del settore medico-scientifico, ma non solo, a sviluppare delle strategie per combattere il virus dell'epatite C.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2016, ha lanciato la Global Viral Hepatitis Strategy, un progetto mirato a raggiungere l'eliminazione dell'HCV entro il 2030. Ciò ha portato tutti gli Stati membri della comunità

OMS a sviluppare piani nazionali specifici per l'epatite C al fine di raggiungere l'obiettivo prefissato. (87)

Questi piani possono variare tra le regioni geografiche diverse e ciascun paese adotta delle strategie che si adattano meglio alla loro situazione epidemiologica ed economica. In generale, questi piani nazionali devono basarsi principalmente sull'espansione della diagnosi, miglioramento del collegamento alla cura e trattamento, e comprendere anche una serie di interventi sulla prevenzione dell'infezione.

Nel 2021, il Governo italiano ha promulgato un decreto finalizzato all'attuazione di strategie di screening dell'HCV a livello nazionale.

Nella regione del Veneto, il 16 maggio 2022, è finalmente partito un programma di screening per l'Epatite C destinato alle persone nate tra il 1969 e 1989 (considerata la coorte con prevalenza più alta di infezioni non diagnosticate), e ad alcune categorie ad alto rischio di infezione e trasmissione del virus, come i detenuti nelle carceri e i soggetti seguiti dai servizi pubblici per le tossicodipendenze (SerT). Questo screening consiste in un prelievo di sangue venoso nel quale vanno ricercati degli anticorpi anti-HCV. I soggetti che risultano reattivi verranno contattati per eseguire la verifica dell'infezione e, in caso di positività, indirizzati alla visita specialistica e al trattamento con i farmaci antivirali ad azione diretta.

Il nostro progetto di screening, condotto nel territorio di Padova dal 18/01/2020 al 02/10/2022, ha l'obiettivo di estendere lo screening alla popolazione generale, offrendo a tutti i cittadini la possibilità di eseguire gratuitamente un test non invasivo, salivare, per la ricerca degli anticorpi anti-HCV.

Grazie alla collaborazione tra le diverse Istituzioni e figure sanitarie (specialisti, medici di medicina generale, infermieri e volontari) con le amministrazioni locali, siamo riusciti a coinvolgere 1498 soggetti di tutte le età, nazionalità e senza distinzione tra la presenza o assenza di fattori di rischio specifici per l'infezione da HCV.

Lo screening ha permesso di aggiornare la stima della prevalenza dell'HCV nella popolazione del Nord-Est d'Italia e di vedere la

distribuzione dell'infezione in base alle diverse caratteristiche socio-demografiche della popolazione e ai fattori di rischio più associati all'acquisizione dell'HCV.

Dei 1498 soggetti sottoposti allo screening, 17 sono risultati positivi al test anticorpale salivare, il che corrisponde ad una sieroprevalenza di 1,13%. Di queste 17 persone, solo in 3 è stata confermata l'infezione attiva con la quantificazione dell'HCV RNA, arrivando ad una prevalenza delle infezioni viremiche nella nostra popolazione di 0,2 %.

Tutti e 3 i soggetti in cui è stata confermata la presenza di malattia attiva sono stati chiamati a fare una visita specialistica, che prevedeva l'esecuzione degli esami di funzionalità epatica, ecografia dell'addome superiore e Fibroscan, prima di iniziare la terapia antivirale.

Per tutti e tre i pazienti è stata richiesta anche la genotipizzazione. Due soggetti sono risultati infettati da genotipo 1b, mentre uno da genotipo 2. Questi sono, in generale, i due genotipi più frequenti in Italia (1b, infatti, rappresenta più della metà dei casi di epatite C, sia in Italia, che nel mondo occidentale (12,14)) e il loro riscontro non stupisce, considerando che tutti e tre i pazienti sono di origine europea (in particolare, una italiana, uno dall'UE e una extra-UE).

A conferma degli studi condotti in passato (102), anche da questo studio emerge che la prevalenza dell'HCV aumenta in funzione dell'età. Tutti i nostri HCV-RNA positivi sono persone nate prima del 1989, di cui 2 su 3 sono nate prima del 1968, mentre non abbiamo riscontrato positività nelle generazioni più giovani (0 soggetti positivi e nati dopo il 1990).

Nel complesso, la sieroprevalenza nelle tre coorti considerate risulta essere di 0,73% nei nati prima del 1968, mentre 0,20% sia nella coorte 1969-1989 che nei nati dopo 1990. Si torna a dire che questo picco di prevalenza tra i soggetti più anziani riflette le infezioni contratte principalmente attraverso le siringhe di vetro non appropriatamente sterilizzate e utilizzate per fare le iniezioni mediche. Infatti, prima degli anni '70, quando si iniziarono ad utilizzare gli aghi e le siringhe monouso, questa era la modalità prevalente di trasmissione dell'HCV in Italia.

In nessuno dei tre pazienti è stato possibile associare l'infezione riscontrata a dei fattori di rischio specifici per la trasmissione dell'HCV, quali uso di sostanze stupefacenti per via endovenosa, presenza di tatuaggi e/o piercing, co-infezioni con virus dell'epatite B (HBV) o HIV, o convivenza con una persona HCV positiva. Tutti hanno negato l'esposizione e non appartengono nemmeno alle categorie a rischio.

Nonostante l'infezione da virus dell'epatite C sia generalmente associata a determinate pratiche a rischio, che prevedono un contatto con il circolo sanguigno, non sono pochi i casi in cui non è possibile identificare alcun fattore di rischio (anche fino a 40% dei casi nei paesi occidentali (19)).

Per quanto riguarda i fattori che maggiormente si associano alla progressione accelerata della malattia epatica, come l'assunzione eccessiva di alcol o presenza di uno stato di obesità, 2 su 3 pazienti hanno riferito di essere astemi, mentre uno di essere un bevitore occasionale (< 3 unità alcoliche a settimana); il dato di BMI è rimasto sconosciuto per un paziente, mentre per gli altri due abbiamo che uno è leggermente in sovrappeso (BMI di 25,57) e l'altro francamente obeso (BMI di 38, 23 - obesità di secondo grado).

La prevalenza di infezioni viremiche di 0,2% riscontrata in questo studio, suggerisce un calo della stessa se comparata all'ultima stima, che nella popolazione italiana si attestava intorno a 0,74-1,7%.(86) Questo dato può significare, un reale calo delle infezioni attive oppure un miglioramento nell'applicazione dell'algoritmo diagnostico-terapeutico a livello della popolazione o ancora, un terzo scenario, che mostra l'esaurimento dei pazienti con infezioni note da sottoporre alla terapia, visto che sono già stati trattati con successo e probabilmente guariti finora.

È ancora oggetto di dibattito se l'estendere lo screening nazionale anche alle persone nate prima del 1968 sia un investimento sostenibile. La prevalenza di infezioni viremiche in questa popolazione è 0,13%, mentre nella coorte 1969-1989 è 0,06%. Quindi, i dati provenienti da questo programma di screening sembrano supportare la necessità di includere nello screening anche le persone nate prima del 1968.

Come sottolineato da altri programmi di screening condotti nel Nord Italia (101), anche se è vero che i soggetti nati prima del 1968, ormai anziani, non hanno più un elevato potenziale di trasmettere il virus, la prevalenza di infezioni non ancora individuate in quelle fasce di età è ancora alta. Questo fatto giustifica e ribadisce la necessità di prendere in considerazione un programma di screening più esteso, se si vuole avere un maggior controllo dell'infezione e avvicinarsi all'obiettivo finale di eliminazione dell'HCV.

In conclusione, il limite della cura dell'HCV non è più l'efficacia o l'aderenza al trattamento, ma l'identificazione del sommerso dei pazienti da trattare, ovvero quei pazienti che non sanno di essere infetti. Da questo nasce la necessità di considerare l'estensione dei programmi di screening anche alla popolazione generale, cercando sempre di adottare una strategia che meglio si adatta alla situazione epidemiologica nel paese e alle risorse disponibili.

Inoltre, in assenza di un vaccino anti-HCV che, si auspica, sarà il prossimo passo rivoluzionario nella storia dell'HCV, è di grande importanza promuovere tutte le altre attività di prevenzione primaria, educare ed informare le persone, per alzare il livello di consapevolezza sull'infezione da virus dell'epatite C. Nel nostro caso, l'inizio del progetto di screening è stato anticipato da una serata informativa sull'argomento, aperta al pubblico, che sicuramente ha contribuito in maniera significativa ad aumentare l'aderenza allo screening stesso.

CONCLUSIONI

Nonostante oggi abbiamo a disposizione dei farmaci in grado di curare l'epatite C, la presenza di soggetti non a conoscenza dell'infezione rappresenta l'ostacolo più importante per raggiungere l'obiettivo della WHO di eliminazione dell'HCV. La situazione attuale implica che non basta avere i programmi di screening mirati, che si riferiscono solo alle categorie considerate ad alto rischio di infezione e trasmissione, ma che bisogna andare a ricercare i nuovi casi all'interno della popolazione sana.

Grazie alla collaborazione tra il reparto di Gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova con i Medici di Medicina Generale, la Croce Rossa Italiana di Padova e tutte le amministrazioni locali, si è riusciti a promuovere e condurre con successo una campagna di screening per l'infezione da HCV nella popolazione generale. Questo ha permesso di ottenere una nuova stima della prevalenza dell'HCV di 0,2% e in più, di confermare come questa abbia valori più alti nella popolazione nata prima del 1968. (0,13%)

In questo contesto, lo studio ha dimostrato l'applicabilità di un test non invasivo, utilizzando un campione di saliva per la ricerca degli anticorpi anti-HCV, eseguibile in tempi rapidi (circa 20 minuti), in qualsiasi ambiente al di fuori dall'ospedale e senza richiedere una formazione specialistica particolare.

Avere a disposizione uno strumento diagnostico di questo tipo ha molti vantaggi che contribuiscono a migliorare e semplificare l'intero percorso diagnostico-terapeutico dell'HCV, rendendolo accessibile a tutti (quindi anche alle persone disagiate, marginali, che magari non hanno accesso alle strutture sanitarie).

In conclusione, il fine ultimo di questo studio è quello di contribuire agli sforzi fatti finora offrendo un programma di screening universale, rivolto alla popolazione generale, per continuare a perseguire il raggiungimento di un obiettivo maggiore che tutto il mondo ha in comune - l'eliminazione del virus dell'epatite C.

BIBLIOGRAFIA

1. Manns MP, Maasoumy B. Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(8):533–50.
2. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*. 1978 Mar 4;1(8062):459-63. doi: 10.1016/s0140-6736(78)90131-9. PMID: 76017.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA cLone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science*. 21 aprile 1989;244(4902):359–62.
4. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):362-4. doi: 10.1126/science.2496467. PMID: 2496467.
5. Stramer SL, Kleinman SH, Caglioti S, Dodd RY. Detection of HIV-1 and HCV Infections among Antibody-Negative Blood Donors by Nucleic Acid–Amplification Testing. *N Engl J Med*. 2004;
6. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatol Baltim Md*. ottobre 1990;12(4 Pt 1):671–5.
7. Polaris Observatory HCV Collaborators. Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2022 May;7(5):396-415. doi: 10.1016/S2468-1253(21)00472-6. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35180382.
8. Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar;2(3):161-176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9. Epub 2016 Dec 16. PMID: 28404132.
9. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect*. febbraio 2011;17(2):107–15.
10. Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol*. 7 agosto 2014;20(29):9633–52.
11. Razavi H, Waked I, Sarrazin C, Myers RP, Idilman R, Calinas F, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat*. 2014;21(s1):34–59.
12. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. novembre 2014;61(1):S45–57.
13. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. novembre 2014;61(1):S58–68.
14. Unigastro. Malattie dell'apparato digerente. Edizione 2019-2022

15. European Union HCV Collaborators. Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for elimination in the European Union by 2030: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 May;2(5):325-336. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30045-6. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28397696.
16. Roudot-Thoraval F. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021 May;45(3):101596. doi: 10.1016/j.clinre.2020.101596. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33610022.
17. Granados-García V, Flores YN, Díaz-Trejo LI, Méndez-Sánchez L, Liu S, Salinas-Escudero G, et al. Estimating the prevalence of hepatitis C among intravenous drug users in upper middle income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 26 febbraio 2019;14(2):e0212558.
18. Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 settembre 2014;59(6):765-73.
19. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primer*. 2 marzo 2017;3(1):1-19.
20. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *J Hepatol*. novembre 2014;61(1):S3-13.
21. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. gennaio 2004;39(1):5-19.
22. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J Virol*. luglio 2002;76(14):6919-28.
23. Lohmann V. Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1 febbraio 2019;208(1):3-24.
24. Chevaliez S, Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, curatore. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* [Internet]. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006 [citato 20 febbraio 2023]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1630/>
25. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):223-35.
26. Chou AH, Tsai HF, Wu YY, Hu CY, Hwang LH, Hsu PI, et al. Hepatitis C Virus Core Protein Modulates TRAIL-Mediated Apoptosis by Enhancing Bid Cleavage and Activation of Mitochondria Apoptosis Signaling Pathway1. *J Immunol*. 15 febbraio 2005;174(4):2160-6.
27. Núñez O, Fernández-Martínez A, Majano PL, Apolinario A, Gómez-Gonzalo M, Benedicto I, et al. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut*. novembre 2004;53(11):1665-72.
28. Vieyres G, Thomas X, Descamps V, Duverlie G, Patel AH, Dubuisson J. Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *J Virol*. ottobre 2010;84(19):10159-68.

29. Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 marzo 1991;88(5):1711–5.
30. Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett*. 2003;552(1):28–34.
31. Lin C, Thomson JA, Rice CM. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol*. luglio 1995;69(7):4373–80.
32. Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. An N-Terminal Amphipathic Helix in Hepatitis C Virus (HCV) NS4B Mediates Membrane Association, Correct Localization of Replication Complex Proteins, and HCV RNA Replication. *J Virol*. ottobre 2004;78(20):11393–400.
33. Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MMC. Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *J Virol*. aprile 2004;78(7):3480–8.
34. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance - ScienceDirect [Internet]. [citato 21 febbraio 2023]. Disponibile su: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928019798000348?via%3Dihub>
35. Zhou Z, Zhang J, Zhou E, Ren C, Wang J, Wang Y. Small molecule NS5B RdRp non-nucleoside inhibitors for the treatment of HCV infection: A medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*. 5 ottobre 2022;240:114595.
36. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*. 30 ottobre 1998;282(5390):938–41.
37. Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 ottobre 1999;96(22):12766–71.
38. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, et al. Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor *. *J Biol Chem*. 24 ottobre 2003;278(43):41624–30.
39. Barth H, Schäfer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate *. *J Biol Chem*. 17 ottobre 2003;278(42):41003–12.
40. Mailly L, Baumert TF. Hepatitis C virus infection and tight junction proteins: the ties that bind. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 7 luglio 2020;1862(7):183296.
41. Crouchet E, Wensch F, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. *Ther Adv Gastroenterol*. 21 marzo 2018;11:1756284818759483.
42. Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset FL. Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses*. 6 gennaio 2019;11(1):30.
43. Yu M ying W, Bartosch B, Zhang P, Guo Z ping, Renzi PM, Shen L ming, et al. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 maggio 2004;101(20):7705–10.

44. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 aprile 2007;104(14):6025–30.
45. Schulze zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, Kasproicz V, Nolan B, Streeck H, et al. Broadly directed virus-specific CD4 T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med*. 2 gennaio 2012;209:61–75.
46. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, et al. HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science*. 24 ottobre 2003;302(5645):659–62.
47. Sharma SA, Feld JJ. Acute Hepatitis C: Management in the Rapidly Evolving World of HCV. *Curr Gastroenterol Rep*. 31 gennaio 2014;16(2):371.
48. Glynn SA, Wright DJ, Kleinman SH, Hirschhorn D, Tu Y, Heldebrandt C, et al. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion (Paris)*. 2005;45(6):994–1002.
49. Mosley JW, Operskalski EA, Tobler LH, Andrews WW, Phelps B, Dockter J, et al. Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2005;42(1):86–92.
50. Loomba R, Rivera MM, McBurney R, Park Y, Haynes-Williams V, Rehermann B, et al. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(5):559–65.
51. Farci P, Alter HJ, Shimoda A, Govindarajan S, Cheung LC, Melpolder JC, et al. Hepatitis C Virus–Associated Fulminant Hepatic Failure. *N Engl J Med*. 29 agosto 1996;335(9):631–4.
52. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology*. 1999;29(3):908–14.
53. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O’Hugin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. ottobre 2009;461(7265):798–801.
54. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, van der Loeff MS, Rice TM, Bruneau J, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2014;59(1):109–20.
55. Beinhardt S, Payer BA, Datz C, Strasser M, Maieron A, Dorn L, Grilnberger-Franz E, Dulic-Lakovic E, Stauber R, Laferl H, Aberle JH, Holzmann H, Krall C, Vogel W, Ferenci P, Hofer H. A diagnostic score for the prediction of spontaneous resolution of acute hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2013 Nov;59(5):972–7. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.028. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23850880.
56. Leone N, Rizzetto M. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol*. marzo 2005;51(1):31–46.
57. Cacoub P, Saadoun D. Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV Infection. *N Engl J Med*. 18 marzo 2021;384(11):1038–52.

58. Mazzaro C, Quartuccio L, Adinolfi LE, Roccatello D, Pozzato G, Nevola R, et al. A Review on Extrahepatic Manifestations of Chronic Hepatitis C Virus Infection and the Impact of Direct-Acting Antiviral Therapy. *Viruses*. 9 novembre 2021;13(11):2249.
59. Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: A general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis*. gennaio 2007;39(1):2–17.
60. Lee KK, Stelzle D, Bing R, Anwar M, Strachan F, Bashir S, et al. Global burden of atherosclerotic cardiovascular disease in people with hepatitis C virus infection: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 1 ottobre 2019;4(10):794–804.
61. Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology*. 1 giugno 2016;150(7):1599–608.
62. Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, You SL, Wang LY, et al. Chronic Hepatitis C Virus Infection Increases Mortality From Hepatic and Extrahepatic Diseases: A Community-Based Long-Term Prospective Study. *J Infect Dis*. 15 agosto 2012;206(4):469–77.
63. Marwaha N, Sachdev S. Current testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward. *World J Gastroenterol WJG*. 21 marzo 2014;20(11):2948–54.
64. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory Diagnostics for Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis*. 15 luglio 2012;55(suppl_1):S43–8.
65. Roger S, Ducancelle A, Le Guillou-Guillemette H, Gaudy C, Lunel F. HCV virology and diagnosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 1 maggio 2021;45(3):101626.
66. Lee SR, Kardos KW, Schiff E, Berne CA, Mounzer K, Banks AT, et al. Evaluation of a new, rapid test for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid. *J Virol Methods*. 1 marzo 2011;172(1):27–31.
67. Le Guillou-Guillemette H, Lunel-Fabiani F. Detection and Quantification of Serum or Plasma HCV RNA: Mini Review of Commercially Available Assays. In: Tang H, curatore. *Hepatitis C: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [citato 27 febbraio 2023]. p. 3–14. (Methods in Molecular Biology™). Disponibile su: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-394-3_1
68. Chevaliez S, Feld J, Cheng K, Wedemeyer H, Sarrazin C, Maasoumy B, Herman C, Hackett J, Cohen D, Dawson G, Pawlotsky JM, Cloherty G. Clinical utility of HCV core antigen detection and quantification in the diagnosis and management of patients with chronic hepatitis C receiving an all-oral, interferon-free regimen. *Antivir Ther*. 2018;23(3):211–217. doi: 10.3851/IMP3042. PMID: 27115431.
69. McGovern BH, Birch CE, Bowen MJ, Reyor LL, Nagami EH, Chung RT, et al. Improving the Diagnosis of Acute Hepatitis C Virus Infection with Expanded Viral Load Criteria. *Clin Infect Dis*. 1 ottobre 2009;49(7):1051–60.
70. Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, Mondala T, Pockros PJ, Lindsay KL, et al. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat*. 1996;3(2):75–8.
71. Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J Gastroenterol WJG*. 28 agosto 2014;20(32):11033–53.

72. Pawlotsky JM, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, et al. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *J Hepatol.* 1 novembre 2020;73(5):1170–218.
73. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 1 maggio 2008;48(5):835–47.
74. Pol S, Lagaye S. The remarkable history of the hepatitis C virus. *Genes Immun.* maggio 2019;20(5):436–46.
75. Maasoumy B, Port K, Markova AA, Serrano BC, Rogalska-Taranta M, Sollik L, et al. Eligibility and Safety of Triple Therapy for Hepatitis C: Lessons Learned from the First Experience in a Real World Setting. *PLoS ONE.* 1 febbraio 2013;8(2):e55285.
76. Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med.* 7 dicembre 2006;355(23):2444–51.
77. Dietz C, Maasoumy B. Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Virus Infection—From Drug Discovery to Successful Implementation in Clinical Practice. *Viruses.* 17 giugno 2022;14(6):1325.
78. Hézode C, Fontaine H, Dorival C, Larrey D, Zoulim F, Canva V, de Ledinghen V, Poynard T, Samuel D, Bourlière M, Zarski JP, Raabe JJ, Alric L, Marcellin P, Riachi G, Bernard PH, Loustaud-Ratti V, Métivier S, Tran A, Serfaty L, Abergel A, Causse X, Di Martino V, Guyader D, Lucidarme D, Grando-Lemaire V, Hillon P, Feray C, Dao T, Cacoub P, Rosa I, Attali P, Petrov-Sanchez V, Barthe Y, Pawlotsky JM, Pol S, Carrat F, Bronowicki JP; CUPIC Study Group. Triple therapy in treatment-experienced patients with HCV-cirrhosis in a multicentre cohort of the French Early Access Programme (ANRS CO20-CUPIC) - NCT01514890. *J Hepatol.* 2013 Sep;59(3):434-41. doi: 10.1016/j.jhep.2013.04.035. Epub 2013 May 10. PMID: 23669289.
79. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol WJG.* 21 novembre 2014;20(43):15992–6013.
80. Manns MP, von Hahn T. Novel therapies for hepatitis C - one pill fits all? *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Aug;12(8):595-610. doi: 10.1038/nrd4050. Epub 2013 Jun 28. PMID: 23807378.
81. Pawlotsky JM. New Antiviral Agents for Hepatitis C. *F1000 Biol Rep.* 1 marzo 2012;4:5.
82. Carrat F, Fontaine H, Dorival C, Simony M, Diallo A, Hezode C, et al. Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: a prospective cohort study. *The Lancet.* 6 aprile 2019;393(10179):1453–64.
83. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology.* 2017 Oct;153(4):996-1005.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.012. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28642197.
84. Mahale P, Engels EA, Li R, Torres HA, Hwang LY, Brown EL, et al. The effect of sustained virological response on the risk of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Gut.* 1 marzo 2018;67(3):553–61.
85. Kumar A, Rajput MK, Paliwal D, Yadav A, Chhabra R, Singh S. Genotyping & diagnostic methods for hepatitis C virus: A need of low-resource countries. *Indian J Med Res.* maggio 2018;147(5):445–55.

86. Documento HCV 2020 [Internet]. AISF - ASSOCIAZIONE ITALIANA STUDIO DEL FEGATO. [citato 28 febbraio 2023]. Disponibile su: <https://www.webaisf.org/documento-hcv-2020/>
87. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Towards ending viral hepatitis [Internet]. [citato 3 marzo 2023]. Disponibile su: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HIV-2016.06>
88. Global Health Sector Strategies [Internet]. [citato 1 febbraio 2023]. Disponibile su: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/strategies/global-health-sector-strategies>
89. New WHO study: Making diagnosis of hepatitis C more accessible and closer to the community using point-of-care HCV viral load assays [Internet]. [citato 2 marzo 2023]. Disponibile su: <https://www.who.int/news/item/24-01-2023-new-who-study-making-diagnosis-of-hcv-more-accessible-and-closer-to-the-community-using-poc-hcv-viral-load-assays>
90. Gamkrelidze I, Pawlotsky JM, Lazarus JV, Feld JJ, Zeuzem S, Bao Y, et al. Progress towards hepatitis C virus elimination in high-income countries: An updated analysis. *Liver Int.* 2021;41(3):456–63.
91. Kondili LA, Craxì A, Aghemo A. Absolute targets for HCV elimination and national health policy paradigms: Foreseeing future requirements. *Liver Int.* 2021;41(4):649–55.
92. Wolfram I, Petroff D, Bätz O, Jedrysiak K, Kramer J, Tenckhoff H, Berg T, Wiegand J; German Check-Up 35+ Study Group. Prevalence of elevated ALT values, HBsAg, and anti-HCV in the primary care setting and evaluation of guideline defined hepatitis risk scenarios. *J Hepatol.* 2015 Jun;62(6):1256-64. doi: 10.1016/j.jhep.2015.01.011. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25617500.
93. Marcellusi A, Simonelli C, Mennini FS, Kondili LA. Economic Consequences of Anti-HCV Treatment of Patients Diagnosed Through Screening in Italy: A Prospective Modelling Analysis. *Appl Health Econ Health Policy.* 2022;20(1):133–43.
94. Public health guidance on HIV, hepatitis B and C testing in the EU/EEA [Internet]. [citato 3 marzo 2023]. Disponibile su: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/public-health-guidance-hiv-hepatitis-b-and-c-testing-eueea>
95. D'Ambrosio R, Rizzardini G, Puoti M, Faggioli S, Anolli MP, Gabiati C, et al. Implementation of HCV screening in the 1969–1989 birth-cohort undergoing COVID-19 vaccination. *Liver Int.* 2022;42(5):1012–6.
96. Waked I, Esmat G, Elsharkawy A, El-Serafy M, Abdel-Razek W, Ghalab R, et al. Screening and Treatment Program to Eliminate Hepatitis C in Egypt. *N Engl J Med.* 19 marzo 2020;382(12):1166–74.
97. Heffernan A, Cooke GS, Nayagam S, Thursz M, Hallett TB. Scaling up prevention and treatment towards the elimination of hepatitis C: a global mathematical model. *Lancet Lond Engl.* 30 marzo 2019;393(10178):1319–29.
98. Blach, Sarah et al: *Impact of COVID-19 on global HCV elimination efforts.* *Journal of Hepatology*, Volume 74, Issue 1, 31 - 36

99. Kondili LA, Aghemo A, Andreoni M, Galli M, Rossi A, Babudieri S, et al. Milestones to reach Hepatitis C Virus (HCV) elimination in Italy: From free-of-charge screening to regional roadmaps for an HCV-free nation. *Dig Liver Dis.* febbraio 2022;54(2):237–42.
100. Kondili LA, Gamkrelidze I, Blach S, Marcellusi A, Galli M, Petta S, et al. Optimization of hepatitis C virus screening strategies by birth cohort in Italy. *Liver Int.* 2020;40(7):1545–55.
101. Aldinio G, D'Ambrosio R, Perrone PM, Castaldi S. 2022 open day in the University of Milan: An opportunity for HCV screening. *Liver Int* [Internet]. [citato 4 marzo 2023];n/a(n/a). Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/liv.15505>
102. Andriulli A, Stroffolini T, Mariano A, Valvano MR, Grattagliano I, Ippolito AM, et al. Declining prevalence and increasing awareness of HCV infection in Italy: A population-based survey in five metropolitan areas. *Eur J Intern Med.* 1 luglio 2018;53:79–84.

ALLEGATO 1

Questionario: "Progetto ELIMINAZIONE DEL VIRUS DELL'EPATITE C"

- Sesso:
1.M; 2.F

- Anno di nascita: _____
- Età:
18-25; 26-30; 31-40; 41-50; 51-65; >65

- Scolarità:
1.nessuna; 2.scuola d'obbligo; 3.pensionato; 4.disoccupato;
5.operaio; 6.impiegato; 7.dirigente; 8.libero professionista;
9.altro

- Nazionalità:
1.Italiana; 2.Europea; 3.Extraeuropea

- Peso: _____
- Altezza: _____

- Negli ultimi 6 mesi ha fatto uso di sostanze stupefacenti?
1.SÌ; 2.NO

- Se sì, come?
1.Fumo; 2.Inalazione; 3.Endovena

- Quantità di alcol assunta in una settimana:
1. nessuna; 2. < 3 unità a settimana; 3. < 6 unità a settimana;

4. > 6 unità a settimana

- Ha mai eseguito tatuaggi e/o piercing?

1.SI; 2.NO

- Ha mai eseguito cure dentarie all'estero?

1.SI; 2.NO

- È positivo all'HBV?

1.NON SO; 2.SI; 3.NO

- È positivo all'HIV?

1.NON SO; 2.SI; 3.NO

- Negli ultimi 6 mesi ha avuto rapporti sessuali non protetti?

1.NON SO; 2.SI; 3.NO

- Qualcuno tra i suoi conviventi ha o ha avuto l'HCV?

1.NON SO; 2.SI; 3. NO

- Ha o ha avuto l'Epatite C?

1.SI; 2.NO; 3.SONO GUARITO

Se si risponde Sì o se è guarito dall'epatite C, andare direttamente al N.B.

Altrimenti proseguire con le domande restanti:

- Ha mai eseguito un test qualsiasi per l'individuazione dell'Epatite C?

1.SI; 2.NO

- Se sì, perché?

1.Intervento chirurgico; 2.esami del sangue di controllo;

3.trasfusione; 4.donazione di sangue; 5.gravidanza; 6.altro

Se la risposta è SI, ha eseguito esami per verificare l'infezione?

1.SI; 2.NO

N.B Se sa di avere avuto l'epatite C ed essere guarito o sa di essere positivo al test HCV:

NON NECESSITA DI ESEGUIRE IL TEST

Domande sull'evento:

- Ritiene utile l'iniziativa? Non rispondo; SI; NO;
- Quanto è soddisfatto dall'iniziativa? Per niente; Soddisfatto; Molto soddisfatto
- Consiglierebbe ad altri questa iniziativa? Non rispondo; SI; NO