

# Aspetti virologici e clinici delle infezioni multiple da virus epatitici: dati preliminari di uno studio italiano multicentrico

***Virological and clinical aspects of multiple hepatitis virus infections: preliminary data of an italian multicentre study***

Evangelista Sagnelli, Nicola Coppola, Carlo Scolastico,  
Pietro Filippini, Felice Piccinino

**Cooperating group:** Antonio Aceti, Caterina Casalino, Maria Chiaramonte, Antonio Craxi, Carlo De Bac, Francesca Maria Felaco, Maria Freni, Antonio Glielmo, Anna Rita Mogavero, Giuseppe Pastore, Teresa Santantonio, Maria Stanzione, Tommaso Stroffolini

Istituto di Malattie Infettive, Facoltà di Medicina e Chirurgia,  
Seconda Università degli Studi di Napoli

## INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B (HBV), il virus dell'epatite Delta (HDV) ed il virus dell'epatite C (HCV) sono nel mondo i maggiori responsabili di epatite cronica, cirrosi ed epatocarcinoma.

L'interazione tra HBV e HDV è conosciuta da tempo: l'HDV presenta un effetto inibente la replicazione di HBV [1] e la sovrainfezione da HDV in pazienti HBsAg positivi è associata a forme fulminanti di epatite acuta e ad epatite cronica severa con più rapida evoluzione verso la cirrosi [2, 3].

Minori sono invece le conoscenze sull'interazione virologica tra HBV e HCV e sugli aspetti clinici correlati. Vi sono però dati indicanti che questa coinfezione frequentemente si associa ad una presentazione clinica di epatite cronica severa, di cirrosi e di epatocarcinoma [6-12]. Gli studi sulle interazioni virologiche non sono conclusivi: la maggior parte dei pazienti con epatopatia HBV e HCV correlata sono HBeAb positivi, HBV-DNA negativi e HCV-RNA positivi come da inibizione dell'HCV sulla replicazione di HBV [7, 10, 11]. Uno studio su 9 pazienti ha evidenziato inoltre un'assenza di "pre-core stop mutation" nel genoma di HBV in pazienti HBsAg e anti-

HCV positivi, suggestiva di una inibizione selettiva di HCV sulla variante "e-minus" di HBV [13]. Altri studi suggeriscono che la sovrainfezione di HCV in pazienti portatori cronici di HBsAg favorisce la clearance dell'HBsAg nel tempo [14-16].

In quest'articolo riportiamo i dati preliminari di uno studio italiano multicentrico, teso ad evidenziare le interazioni virologiche tra HBV, HDV e HCV e le conseguenze cliniche di tali interazioni. In questo studio abbiamo anche valutato l'ipotesi che i pazienti anti-HCV e anti-HBc positivi, ma HBsAg e anti-HBs negativi, possano presentare caratteristiche virologiche, cliniche e di risposta alla terapia con interferone tipiche di una infezione multipla da HBV e HCV.

## PAZIENTI E METODI

Hanno partecipato allo studio caso-controllo sette centri epatologici di diverse regioni italiane, uno del nord (Padova), uno del centro (Roma), due del sud (Napoli e Bari), uno della Sardegna (Sassari) e due della Sicilia (Messina e Palermo). Sono stati inclusi pazienti HBsAg e/o anti-HCV positivi osservati per la prima volta nel periodo 1993-97 in uno dei 7 centri partecipanti. Abbiamo definito come "Caso B-C" un paziente HBsAg e anti-HCV positivo e come "Caso b-C" un paziente HBsAg/anti-HBs negativo, anti-HBc positivo e anti-HCV positivo; per ciascun caso B-C erano previsti due casi di controllo: "Controllo B", paziente HBsAg positivo e anti-HCV negativo, e "Controllo C", paziente HBsAg, anti-HBs

Lavoro svolto con il contributo dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma, (Progetto epatite virale - Convenzione "Infezioni multiple da virus epatitici: significato diagnostico e prognostico dei diversi patterns di infezione" N. 96/B/T27) e con il contributo del M.U.R.S.T.

ed anti-HBc negativo e anti-HCV positivo; il controllo C è stato utilizzato anche come controllo del caso b-C. Per ogni caso sottoposto a biopsia epatica era previsto un controllo con biopsia epatica; al contrario per i casi senza biopsia epatica erano previsti controlli senza biopsia epatica. In 337 pazienti era stata effettuata biopsia epatica (BE). Sono stati comunque ammessi allo studio 73 Casi B-C (56 con BE e 17 senza BE), 155 Casi b-C (76 con BE e 79 senza BE), 151 Controlli B (83 con BE e 68 senza BE), 193 Controlli C (98 con BE e 95 senza BE), 29 casi B-C con HDV (18 con BE e 11 senza BE) e 17 Controlli B con HDV (6 con BE e 11 senza BE).

In tutti i pazienti i tests di funzione e di citonecrosi epatica sono stati determinati mediante comuni metodi di routine; HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBs, anti-HBc e anti-HDV sono stati determinati mediante i comuni test immunoenzimatici in commercio; anti-HCV è stato determinato mediante un test immunoenzimatico di terza generazione.

HBV-DNA sierico è stato determinato in 230 dei 270 pazienti HBsAg positivi mediante tecnica di dot-blot ibridizzazione, come descritto da Scott [17].

HCV-RNA sierico è stato determinato in 271 dei 446 pazienti anti-HCV positivi con metodica di reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), utilizzando primers specifici per la regione conservata NS5 di HCV (18) (Hepa-check-C, Nuclear Laser, Settala-Milano, Italy); il genotipo di HCV è stato determinato mediante Line Probe Assay (INNO-LIPA HCV II, Innogenetics, Zwigndrecht, Belgium) in 183 dei 217 pazienti HCV-RNA positivi; grazie a tale metodica è stato possibile differenziare i 6 principali genotipi con i loro sottotipi (1a, 1b, 2a/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c/4d, 4h, 5a e 6a) secondo la classificazione di Simmonds [19].

Trentatré casi b-C e 32 controlli C (32 e 31 rispettivamente con BE) sono stati trattati con

( $\alpha$ -IFN (3-6 MU tre volte la settimana per 12 mesi) con un follow-up successivo all'interruzione del trattamento di 6-24 mesi. Abbiamo definito come risposta completa a lungo termine (LTR) la persistente negatività di HCV-RNA nel siero e normalità delle transaminasi sieriche durante il follow-up post-trattamento.

L'analisi statistica dei risultati è stata formulata mediante il test T di Student ed il test  $\chi^2$  con correzione di Yates. Un valore di p minore di 0,05 è stato considerato significativo.

## ■ RISULTATI

I gruppi selezionati presentavano moderate differenze di età, sesso e prevalenza di casi con tossicodipendenza, ad eccezione del gruppo B-C con HDV che presentava una più alta prevalenza di pazienti di sesso maschile e di tossicodipendenti (Tab. 1).

È stata evidenziata un'azione inibitrice di HCV e di HDV sulla replicazione di HBV. Infatti nei pazienti HBsAg positivi la prevalenza di Casi con HBV-DNA sierico, determinato mediante dot-blot, è risultata più elevata nei Controlli B (52% di 133 pazienti) che nei Casi B-C (28% di 64 pazienti,  $p < 0,005$ ), nei Casi B-C con HDV (12% di 25 pazienti,  $p < 0,0005$ ) e nei Controlli B con HDV (13% di 8 pazienti,  $p < 0,05$ ) (Tab. 2).

È stata anche evidenziata un'azione inibitrice di HBV e di HDV sulla replicazione di HCV; tra i pazienti anti-HCV positivi la prevalenza di quelli con HCV-RNA nel siero è risultata più elevata nei Controlli C (91,2% di 114 pazienti) che nei Casi B-C (64,5% di 62 pazienti,  $p < 0,0001$ ) e nei Controlli B-C con HDV (19% di 21 pazienti,  $p < 0,0001$ ). La prevalenza di casi con HCV-RNA nel siero osservata nei Casi b-C (93,2% di 74 pazienti) era invece simile a quella rilevata nei Controlli C (91,2% di 114 pazienti) (Tab. 3).

Non abbiamo osservato differenze sostanziali nella distribuzione dei genotipi di HCV nei di-

**Tabella 1** - Caratteristiche generali di 618 pazienti con epatite virale cronica alla prima osservazione in relazione all'eziologia.

Gruppi eziologici	No. di casi	Età, anni media $\pm$ DS	Maschi %	I.V.D.A %	con B.E. %
Caso B-C	73	45 $\pm$ 15	64	16,4	77
Controllo B	151	38 $\pm$ 14	72	1,3	55
Controllo C	193	49 $\pm$ 13	53	14,2	51
Caso b-C	155	52 $\pm$ 13	59	12,4	49
Caso B-C+HDV	29	35 $\pm$ 10	97	62,1	64
Controllo B+HDV	17	33 $\pm$ 8	65	1,1	35

**Tabella 2** - HBV-DNA sierico in soggetti con infezione da HBV, singola o in coinfezione con altri virus epatici.

Gruppi eziologici	No Casi	con HBV-DNA sierico	
		No.	%
Caso B-C	64	18 <sup>a</sup>	28
Controllo B	133	69 <sup>b</sup>	52
Caso B-C+HDV	25	3 <sup>c</sup>	12
Controllo B+HDV	8	1 <sup>d</sup>	13

Analisi statistica: a: vs. b: p<0,005; c: vs. b: p<0,0005; d: vs. b: p<0,05

**Tabella 3** - HCV-RNA sierico in soggetti con infezione da HCV, singola o in coinfezione con altri virus epatici.

Gruppi eziologici	No Casi	con HCV-RNA sierico	
		No.	%
Caso B-C	62	<sup>a</sup> 40	64,5
Controllo C	114	<sup>b</sup> 104	91,2
Caso B-C+HDV	21	<sup>c</sup> 4	19
Caso b-C	74	<sup>d</sup> 69	93,2

Analisi statistica: a: vs. b: p<0,0001; c: vs. b: p<0,0001; d: vs. b: n.s.

versi gruppi eziologici; in particolare il genotipo 1 (1a+1b) è stato ritrovato nel 59% dei Casi B-C, nel 51,7% dei Casi b-C, nel 66,6% dei Casi B-C con HDV e nel 54% dei Controlli C.

I valori sierici di AST osservati nei Casi B-C sono risultati più elevati di quelli evidenziati nei Controlli B (p<0,05) e nei Controlli C (p<0,01) (Tab. 2). Inoltre, i valori sierici di ALT sono risultati più elevati nei Casi B-C che nei Controlli C (p<0,005) ma simili a quelli registrati nei Controlli B. I valori sierici sia di AST che di ALT sono risultati più elevati nei Casi b-C di quelli registrati nei Controlli C (in entrambi p<0,001) (Tab. 4).

Per valutare l'influenza delle infezioni singole e multiple da virus epatitici sulla presentazione clinica, abbiamo selezionato solo i pazienti in cui era possibile determinare con precisione lo stato di malattia epatica: pazienti con biopsia epa-

tica, pazienti senza biopsia epatica ma senza alcun segno di patologia epatica (portatori asintomatici) e pazienti senza biopsia epatica e con segni inequivocabili di cirrosi (piastrinopenia <100.000/mm<sup>3</sup>, ascite, encefalopatia porto-sistemica, varici esofagee, segni ecografici certi di cirrosi).

Abbiamo quindi definito con "malattia epatica mite" pazienti con istologia caratterizzata da minime lesioni aspecifiche o da epatite cronica minima o mite, ed i portatori asintomatici. Abbiamo definito come affetti da "malattia epatica severa" i pazienti con referto biopsico di epatite cronica moderata o severa o di cirrosi, e quelli che senza biopsia mostrano segni inequivocabili di cirrosi epatica e/o epatocarcinoma. Una "patologia epatica severa" è stata osservata più frequentemente nei Casi B-C (66% di 63 pazienti) che nei Controlli B (43% di 110 pazienti,

**Tabella 4** - AST e ALT in soggetti con infezione multipla o singola da virus epatitici.

Gruppi eziologici	No Casi	AST (x v.n)	ALT (x v.n)
		Media±DS	Media±DS
Caso B-C	73	<sup>a</sup> 2,0±1,5	<sup>c</sup> 2,8±2,2
Controllo B	151	<sup>b</sup> 1,6±1,3	<sup>f</sup> 2,6±2,3
Caso b-C	155	<sup>e</sup> 2,1±1,7	<sup>g</sup> 3,1±2,2
Controllo C	193	<sup>d</sup> 1,4±1,2	<sup>h</sup> 2,0±1,8

x v.n.= multipli del valore normale massimo

Analisi statistica: a: vs. b: p<0,05 e: vs. f: n.s.

a: vs. d: p<0,001 e: vs. h: p<0,005

c: vs. d: p<0,001 g: vs. h: p<0,001

**Tabella 5 - Presentazione clinica in 452 pazienti con infezione da virus epatitici, in relazione all'eziologia.**

Gruppi eziologici	No. Casi	con Malattia Epatica	
		*mite, %	**severa, %
Caso B-C	63	34 <sup>a</sup>	66
Controllo B	110	57 <sup>b</sup>	43
Caso b-C	108	28 <sup>c</sup>	72
Controllo C	135	54 <sup>d</sup>	46
Caso B-C+HDV	23	18	82
Caso B+HDV	13	31	69

\* Mite = Diagnosi Istologica: fegato normale, EC minima o mite.  
Diagnosi Clinica: portatore sano.

\*\* Severa = Diagnosi Istologica: EC moderata, severa o cirrosi.  
Diagnosi Clinica: cirrosi ± HCC

Analisi statistica: a: vs. b:  $p < 0,05$ ; a: vs. d:  $p < 0,05$ ; c: vs. d:  $p < 0,001$

$p < 0,05$ ) e nei Controlli C (46% di 135 pazienti,  $p < 0,05$ ); anche i pazienti del gruppo b-C hanno presentato una prevalenza più elevata di casi con "patologia epatica severa" (72% di 108 pazienti) di quella del corrispondente gruppo di controllo (Controllo C: 46%,  $p < 0,001$ ). Un'elevata prevalenza di pazienti con "patologia epatica severa" è stata osservata nei Controlli B con HDV (69% di 13 pazienti) e nei Casi B-C con HDV (82% di 23 pazienti) (Tab. 5).

I dati relativi alla risposta a lungo termine (LTR) alla terapia con alfa-Interferone sono ancora incompleti o in fase di elaborazione. Ci sembra però interessante anticipare dati relativi ad un confronto tra 33 Casi b-C e 32 Controlli C trattati con IFN (3 o 6 MU tre volte a settimana per 12 mesi). La LTR, valutata entro 12 mesi dopo la sospensione dell'IFN, è stata osservata nel 18% di 33 Casi b-C e nel 40% di 32 Controlli C ( $p = 0,05$ ).

## ■ DISCUSSIONE

Nel nostro studio abbiamo osservato tra i pazienti HBsAg positivi un più raro riscontro di HBV-DNA nel siero in corso di infezione multipla rispetto ai pazienti con sola infezione da HBV; mentre già noto era l'effetto inibitorio di HDV sul genoma di HBV [1], quello di HCV era solo ipotizzato in studi in vitro su colture cellulari [14] o in studi clinici condotti su un numero limitato di pazienti [10, 11, 15].

Abbiamo anche osservato che l'infezione da HBV, soprattutto se associata a quella da HDV, inibisce la replicazione di HCV. In letteratura non vi è accordo su tale effetto inibitorio di HBV con o senza HDV su HCV: infatti mentre Pontisso ha registrato una bassa prevalenza di positività per HCV-RNA (56%) in 25 pazienti con

coinfezione HBV-HCV [11], Zarski ha osservato una prevalenza simile tra 23 pazienti con coinfezione HBV-HCV e 69 con sola infezione da HCV (82,6% vs. 88,4%) [8].

I nostri dati, ottenuti su un'ampia casistica, indicano pertanto che in corso di infezione multipla si instaura un'inibizione reciproca tra i genomi di HBV, HCV e HDV.

L'infezione multipla da virus epatitici si associa ad una presentazione clinica più severa; i nostri dati, suffragati da alcune indicazioni della letteratura [3, 6, 9-12], danno ampia dimostrazione di ciò. L'instaurarsi di una patologia più grave è verosimilmente legata ad una possibile somministrazione dell'azione patogena dei virus.

È probabile che nel tempo si possa avere la prevalenza sierica dell'uno o dell'altro alternativamente [10], ma a ciò consegue un danno epatico più grave di quello registrato nell'infezione singola.

Abbiamo poi valutato l'ipotesi che i pazienti anti-HCV e anti-HBc positivi, ma HBsAg e anti-HBs negativi, possano presentare caratteristiche virologiche, cliniche e di risposta alla terapia con interferone tipiche di una infezione multipla da HBV e HCV. In questi pazienti, da noi definiti come Casi b-C, la presentazione clinica è risultata più grave e la risposta all'IFN meno efficace rispetto ai pazienti anti-HCV positivi, HBsAg e anti-HBc negativi; ciò fa pensare che i pazienti del gruppo b-C presentino anch'essi un'infezione multipla da virus epatitici, in cui HCV è sierologicamente espresso e HBV presente in fase di latenza negli epatociti.

*Key words:* HBV chronic hepatitis; HCV chronic hepatitis; HDV chronic hepatitis; chronic hepatitis, treatment, Interferon.

## RIASSUNTO

Per valutare le interferenze virologiche e l'impatto clinico delle infezioni multiple da virus epatitici (HBV, HDV, HCV) sono stati arruolati 618 pazienti HBsAg e/o anti-HCV positivi (337 con biopsia epatica e 281 senza biopsia epatica), alla loro prima osservazione dal 1993 al 1997 in uno dei sette centri italiani partecipanti allo studio (Padova, Roma, Napoli, Bari, Messina, Palermo, Sassari). HBV-DNA sierico è stato determinato più frequentemente nei pazienti con sola infezione da HBV (52% di 133 pazienti) rispetto a quelli con coinfezione HBV-HCV (28% di 64 pazienti,  $p < 0,005$ ), con coinfezione HBV-HDV-HCV (12% di 25 pazienti,  $p < 0,0005$ ) o coinfezione HBV-HDV (13% di 8 pazienti,  $p < 0,05$ ). Una più alta prevalenza di positività per HCV-RNA si è registrata nei pazienti con sola infezione da HCV

(91,2% di 114 pazienti) rispetto a quella registrata nei pazienti con coinfezione HBV-HCV (64,5% di 62 pazienti,  $p < 0,0001$ ) o con coinfezione HBV-HDV-HCV (19% di 21 pazienti,  $p < 0,0001$ ). Vi è quindi nelle infezioni multiple da HBV e HCV una mutua inibizione dell'attività replicativa virale.

Una presentazione clinica più grave è stata osservata più frequentemente nei pazienti con coinfezione HBV-HCV (66%) che in quelli con sola infezione da HBV (43%,  $p < 0,05$ ) o da HCV (46%,  $p < 0,05$ ). I pazienti anti-HCV/anti-HBc positivi, ma HBsAg ed anti-HBs negativi, confrontati con quelli con solo anti-HCV, hanno presentato più frequentemente una patologia epatica più severa e meno frequentemente una risposta a lungo termine all' $\alpha$ -IFN.

## SUMMARY

*To evaluate the interference between HBV, HCV and HDV and the clinical impact of coinfection as compared with single HBV or HCV infection, we unrolled 618 HBsAg and/or anti-HCV positive subjects (337 with liver biopsy and 281 without liver biopsy) at their first observation at one of the seven Italian Liver Units from 1993 to 1997 (Padova, Rome, Sassari, Naples, Bari, Messina, Palermo). Serum HBV-DNA by dot-blot was found more frequently in patients with HBV infection alone (52% of 133 cases) than in those with HBV-HCV coinfection (28% of 64 cases,  $p < 0.005$ ) or in those with HBV-HDV-HCV coinfection (12% of 25 cases,  $p < 0.0005$ ) or with HBV-HDV coinfection (13% of 8 cases,  $p < 0.05$ ). We observed a higher prevalence of HCV-RNA positive cases in*

*the patients with HCV infection alone (91.2% of 114 cases) than in those with HBV-HCV coinfection (64.5% of 62 cases,  $p < 0.0001$ ) or with HBV-HDV-HCV infection (19% of 21 cases,  $p < 0.0001$ ). These observations suggest a reciprocal inhibition of HBV and HCV genome in multiple hepatitis viral infection. A severe liver disease was more frequently observed in patients with HBV-HCV coinfection (66%) than in those with a single HBV infection (43%,  $p < 0.05$ ) or HCV infection (46%,  $p < 0.05$ ). Anti-HCV positive/anti-HBc positive patients, lacking both HBsAg and anti-HBs, compared with the anti-HCV positive/anti-HBc negative ones, more frequently showed severe clinical presentation and less frequently had a sustained response to  $\alpha$ -IFN treatment.*

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Verme G., Amoroso P., Lettieri G., et al. A histopathological study of hepatitis delta virus liver disease. *Hepatology* 6: 1303-1307, 1986.
- [2] Raimondo G., Smedile A., Gallo L., Balbo A., Ponzetto A., Rizzetto M. Multicentre study of HBV-associated delta infection and liver disease in drug addicts. *Lancet* 12: 245-251, 1982.
- [3] Colombo M., Cambieri R., Rumi M.G., Ronchi G., Del Ninno F., De Franchis R. Long term delta superinfection in HBsAg carriers and its relationship to the course of chronic hepatitis. *Gastroenterology* 85: 235-239, 1983.

- [4] Sagnelli E., Felaco F.M., Filippini P., Scolastico C., Rapicetta M., Stroffolini T., Piccinino F. Multiple hepatitis virus infections in chronic HBsAg carriers in Naples. *Arch. Virol.* 142: 445-451, 1997.
- [5] Ohkawa K., Hayashi N., Yuki N., et al. Hepatitis C virus antibody and hepatitis C virus replication in chronic hepatitis B patients. *J. Hepatol.* 21: 509-514, 1994.
- [6] Sato S., Fujiyama S., Tanaka M., et al. Coinfection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B infection. *J. Hepatol.* 21: 159-166, 1994.
- [7] Liaw Y.F. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 22: 1101-1108, 1995.
- [8] Zarski J.P., Bohn B., Bastie A., et al. Characteristics of

- patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J. Hepatol.* 28: 27-33, 1998.
- [9] Kaklamani E., Trichopoulos D., Tzonou A., Zavitsanos X., Koumantaki Y., Hatzakis A. Hepatitis B and C viruses and their interaction in the origin of hepatocellular carcinoma. *JAMA* 265: 1974-1976, 1991.
- [10] Ohkawa K., Hayashi N., Yuki N., et al. Long-term follow-up of hepatitis B virus and hepatitis C virus replicative levels in chronic hepatitis patients coinfecting with both viruses. *J. Med. Virol.* 46: 258-264, 1995.
- [11] Pontisso P., Ruvoletto M.G., Fattovich G., et al. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections. *Gastroenterology* 105: 1529-1533, 1993.
- [12] Mohamed A.E., AL Karawi M.A. Dual infection with hepatitis C and B viruses: clinical and histological study in Saudi patients. *Hepato-Gastroenterol.* 44: 1404-1406, 1997.
- [13] Yah C.T., Chiu C.T., Isai S.L., Hong S.T., Chu C.M., Liaw Y.F. Absence of precore stop mutant in chronic dual (B and C) and triple (B, C, and D) hepatitis virus infection. *J. Infect. Dis.* 170 (G): 1582-85, 1994.
- [14] Shih C.M., Lo S.J., Miyamura T., Chen S.Y., Lee Y.H.W. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cell. *J. Virol.* 67: 5823-5832, 1993.
- [15] Sheen I.S., Liaw Y.F., Lin D.Y., Chu C.M. Role of hepatitis C and Delta viruses in the termination of chronic hepatitis B surface antigen carrier state: a multivariate analysis in a longitudinal follow-up study. *J. Infect. Dis.* 170: 358-361, 1994.
- [16] Liaw Y.F., Tsai S.L., Chang J.J., et al. Displacement of hepatitis B virus by hepatitis C virus as the cause of continuing chronic hepatitis. *Gastroenterology* 106: 1048-1053, 1994.
- [17] Scott J., Hacdchouel M., Hery C., Yvart J., Tiollais P., Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 3: 279-284, 1992.
- [18] Ravaggi A., Primi D., Cariani E. Direct amplification of HCV-RNA from human serum. *PCR Methods*; 1: 291-292, 1992.
- [19] Simmonds P., Alberti A., Alter H.J., et al. A proposed system for nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 19: 1321-1324, 1994.