

Distribution of Hepatitis C Virus genotypes within in-and outpatients tested by the Immuno-Haematology and Blood Transfusion Service of the “Azienda Ospedaliera S. Maria, Terni” in the year 2012

Monica Proietti, Alessandra Pagnani, Francesco Trosino, Maria Chiara Medori, Augusto Scaccetti

Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Santa Maria, Terni

Key Words: Hepatitis C Infection, HCV genotypes, RNA sequencing

Distribuzione dei genotipi dell’HCV nei pazienti afferenti al Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale dell’ Azienda Ospedaliera S. Maria di Terni nell’anno 2012

SUMMARY

Background. The diffusion of Hepatitis C Virus genotypes in a specific geographical area plays a crucial role in public health defense management.

Objectives. In this study we evaluated the prevalence and distribution of the HCV genotypes in 204 HCV-RNA positive samples of outcoming and incoming patients of the Molecular Biology Laboratory of the Immuno-Haematology and Blood Transfusion Unit, AO “S. Maria”, Terni, from January to December 2012.

Study Design. We have analyzed HCV genotypes prevalence and distribution in relation to qualitative variables such as sex, age, in- or out-coming.

Results. The results show that during the year 2012 the most prevalence genotype was genotype I (53.9%). As far as the HCV subgenotypes, 1a and 3a were prevalent within males (25% and 20.1%, respectively) and subgenotype 1b was most prevalent within females (9.3%). In addition we observed also an increase in genotype 4 (10.3%), probably due to the continuous migration of population from Northern-Africa and Middle-Eastern countries where such variant 4 is endemic. In regards to age, our data show that patients between the age of 30 and 50 years old, presented mainly HCV genotypes 3a (27%) and 4c (12.7%) whereas over 50 years old patients harboured more frequently genotypes 1b (25.3%) and 2a (23.9%).

Conclusions. The high frequency of isolation of genotypes 1a and 3a agrees with previous observation made in patients from Northern and Central Italy where the infection with this viral variant is characteristic of young patients and is often associated with drug abuse. On the contrary, genotypes 1b and 2a seems to be more associated to community- acquired infections predominantly in blood transfused patients.

INTRODUZIONE

L’infezione da Virus dell’Epatite C (HCV) resta la principale causa di malattie croniche del fegato e lo studio della diffusione dei genotipi virali in una determinata area geografica svolge un ruolo cruciale nella difesa della salute pubblica (5).

Il genoma dell’HCV è costituito da una singola catena di RNA lineare a polarità positiva di circa 9400 nucleotidi che replica in stretta associazione con le membrane intracellulari (13) delle cellule infettate e funge direttamente da RNA-messaggero per la traduzione delle proteine virali.

L’RNA dell’HCV presenta un’elevata eterogeneità molecolare e una variabilità tale da indurre i ricercatori ad usare il termine di “quasispecie” virale (6, 11).

Il maggior grado di variabilità si osserva nelle regioni che codificano per proteine la cui struttura non è sottoposta a stretti vincoli funzionali, come nella zona che codifica per l’envelope virale. Altre regioni, come quella del Core e dell’estremità 5’, 5’Un-Translated Region (5’UTR), sono più conservate. In base al grado di analogia delle sequenze l’HCV viene differenziato in genotipi, sottotipi, isolati e “quasispecie” (7, 9, 17, 18).

La classificazione attualmente accettata è quella proposta da Simmonds et al, che prevede la comparazione di sequenze derivate da diverse regioni genomiche.

La distribuzione geografica dei genotipi è variabile: la prevalenza dell’1b è alta in Europa e Giappone, ma più bassa in America dove predo-

Corresponding author: Proietti Monica

Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale, Azienda Ospedaliera Santa Maria, Terni
Via Tristano di Joannuccio 1, 05100 Terni, Italy - Tel.0744205529 - Fax 0744205846
E-mail: monicaproietti@aruba.it

mina l'1a. Il genotipo 4 è stato trovato soprattutto in Africa e Medio Oriente, il 5 in Sud Africa ed il 6 in Estremo Oriente (4, 17, 19).

Essendo l'HCV un virus a trasmissione parenterale, studi sono stati intrapresi per evidenziare associazione tra genotipo e via di trasmissione.

L'1b ed il 2a/2c sembrano prevalere tra i soggetti trasfusi o con infezione "sporadica", mentre i genotipi 1a e 3a sono i più diffusi tra i tossicodipendenti per via endovenosa (10, 12).

È stata notata una variazione dei genotipi con l'età anagrafica, essendo il genotipo 1b e 2a/2c presente soprattutto nei soggetti più anziani rispetto all'1a e 3a, prevalenti nei giovani (12, 16).

Infine, alcuni studi hanno osservato una variazione della prevalenza nel tempo dei genotipi 1b e 2a/2c nei soggetti trasfusi, con una diminuzione dell'1b ed un aumento del 2a/2c (12).

Tali dati non sono stati confermati da altri Autori (15). Concordanza sembra invece esserci nel considerare il 3a come il genotipo a più recente diffusione, rispetto all'1b e 2a/2c (12, 15).

MATERIALI E METODI

Nell'anno 2012 sono pervenute presso il Laboratorio di Biologia Molecolare del Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale (SIT) dell'Azienda Ospedaliera "S. Maria" di Terni, 341 richieste ospedaliere ed ambulatoriali di genotipizzazione del virus dell'HCV.

Ciascun campione di sangue, raccolto in apposite provette sterili con anticoagulante acido Etilendiamminotetraacetico (EDTA), è stato centrifugato entro 6 ore dal prelievo, per 20 minuti a 3000 RPM (800-1600 x g) a temperatura ambiente. Il plasma così ottenuto è stato suddiviso in tre aliquote da 1/1.5 mL e conservato in provette di polipropilene sterili (SARSTED) a -80° C fino al momento dell'esecuzione dei *test*.

Una ulteriore aliquota di plasma è stata analizzata per la ricerca degli anticorpi anti-HCV con un metodo immunoenzimatico su piastra (Test MUREX HCV Serotyping, ABBOTT Murex) o con dosaggio immunologico chemiluminescente a cattura CHEMIFLEX (chemiluminescenza perfezionata a protocolli flessibili) o CMIA (Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay) Architect System Anti-HCV (Architect System ABBOTT Diagnostic Division, Wiesbaden, Germany).

La viremia è stata valutata in Real Time con i reattivi per la quantificazione dell'acido nucleico virale COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test, v. 2.0 Roche Diagnostics.

Il *test* utilizzato nel Laboratorio di Biologia Molecolare del SIT di Terni permette la quantificazione di HCV-RNA con intervallo lineare del-

l'analisi da 15 UI/mL a 1.00E+08 UI/mL.

La genotipizzazione dell'HCV è stata effettuata mediante sequenziamento (metodo di Sanger).

Il *test* utilizzato in questo lavoro è stato il TRUGENE HCV 5'NC Genotyping Kit (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown, NY USA) che impiega amplificati PCR della regione 5'UTR compresi tra i nucleotidi 254 e 378. Tale *kit* impiegato insieme al sistema Open Gene DNA Sequencing System, permette di ottenere sequenze bidirezionali nella regione 5'UTR del virus dell'epatite C (8). Il protocollo di genotipizzazione prevede l'utilizzo dell'amplicone precedentemente generato dal *test* Roche Cobas AmpliCor™ HCV, che corrisponde ad un frammento di 244 nucleotidi interno alla regione 5' UTR del virus. Il sequenziamento diretto degli ampliconi Roche prevede come primo passaggio la neutralizzazione dell'amplicato seguita dalla purificazione dello stesso per mezzo del QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen SA, Countaboeuf, France).

I prodotti purificati rappresentano il materiale di partenza per la "CLIP™ Sequencing". Questo sequenziamento chimico produce simultaneamente ampliconi *target* bi-direzionali mediante cicli di PCR, attraverso l'uso di due *primers* oligonucleotidici marcati con differenti fluorocromi (Cy5 e Cy5.5). Il sequenziamento automatizzato del DNA del frammento di 183-bp prodotto dalla reazione CLIP™, è ottenuto dopo 25 minuti di corsa elettroforetica sulla Long-Read Tower del Sequenziatore Siemens.

Le sequenze *forward* e reverse di ciascuna coppia, vengono infine combinate ed automaticamente allineate e comparate con le sequenze di riferimento immagazzinate nell'HCV "GeneLibrarian" software Module, in modo da determinare il tipo, sottotipo ed isolato del virus infettante (14).

Il sistema informatico TRUGENE HCV 5'NC Module (3.1.2) è un database che contiene centinaia di sequenze caratterizzate precedentemente e che viene periodicamente aggiornato. La libreria di riferimento per i genotipi valutati in questo studio è stata la libreria 5'UTR 0902.

Le analisi statistiche dei dati sono state effettuate utilizzando il programma GraphPad Prism, versione 5.0.

L'associazione tra le variabili qualitative ed i genotipi virali è stata stimata con il *test* del χ^2 (o χ^2 Fisher's exact Test) a due code con intervallo di confidenza del 95%.

Dopo aver creato una tabella di contingenza, la significatività dell'associazione tra le variabili ed i genotipi è stata stimata riportando l'indice di significatività *p* (associazione statisticamente significativa per valori di *p* inferiori a 0.05).

RISULTATI

Delle 341 richieste ospedaliere ed ambulatoriali di genotipizzazione del virus dell'HCV pervenute al Laboratorio di Biologia Molecolare, solo quelle relative a 204 pazienti presentavano valori di viremia tali da poter consentire l'esecuzione del *test* di tipizzazione del genoma mediante sequenziamento. Le restanti 137 erano relative a pazienti con bassa viremia o addirittura con HCV-RNA non rilevato, condizioni, entrambe, che non hanno consentito l'esecuzione del sequenziamento.

Dei 204 campioni sequenziati, 149 (73%) appartenevano a pazienti di sesso maschile e 55 (23%) a pazienti di sesso femminile come illustrato in Tabella 1. La provenienza di tali campioni è descritta in Tabella 1 e mostra una netta prevalenza dei pazienti provenienti dal Sert di Terni (50 campioni), seguiti dai campioni provenienti dal Day Hospital delle Malattie Infettive (43 campioni), dai pazienti comunitari extra-ospedalieri o Esterni (17 campioni), dalla Casa Circondariale di Terni (15 campioni) e dai centri raccolta dell'Azienda Sanitaria Locale n° 4 (ASL n° 4) dislocati in tutto il territorio della Provincia di Terni (15 campioni). La distribuzione dei genotipi e dei sottotipi dei campioni di plasma analizzati è riportata nella Tabella 2.

Dall'analisi effettuate, il genotipo 1 è risultato il più rappresentato (53.9%) seguito dal genotipo 3 (24%), dal genotipo 2 (11.3%) e dal genotipo 4 (10.3%). Nell'anno 2012 i genotipi 5 e 6 non sono mai stati rilevati; d'altra parte, la diffusione del genotipo 5, limitata al Sud Africa e quella del genotipo 6 al Sud-Est Asiatico (1), ne rende difficile il riscontro nel territorio Italiano.

Nella Tabella 3 viene descritta la distribuzione dei genotipi e dei sottotipi virali dell'HCV relativi alla Provincia di Terni nell'anno 2012, tenendo in considerazione il sesso dei pazienti.

Dall'analisi della Tabella 3, le frequenze statisticamente rilevanti sono state quelle relative all'associazione tra uomini-donne/genotipo 1a (indice di significatività $p=0.026$), tra uomini-donne/genotipo 1b ($p=0.014$), tra uomini-donne/genotipo 2a ($p=0.0006$) in quanto tutte le altre associazioni hanno presentato valori di $p \geq 0.05$. Nei dati del 2012 relativi alla realtà della Provincia di Terni, ed illustrati nella Tabella 2 il sottotipo 1a è risultato il più frequente essendo stato riscontrato in 61 (29.9%) pazienti a conferma della sua notevole prevalenza nell'Italia Centro-Settentrionale (2). Rilevante è stata la frequenza del genotipo 3a (49 campioni pari al 24%) e del genotipo 1b (41 campioni pari al 20.1%) in accordo con altre indagini relative all'Italia centrale, che vedono il genotipo 1 essere prevalente in queste zone (3). Dalla Tabella 2 si evince che la distribuzione degli altri

sottotipi virali rilevati nell'anno 2012 risulta essere, in ordine decrescente: sottotipo 2a (19 campioni pari al 9.3%), sottotipo 4c (17 campioni pari all'8.3%), sottotipo 1a/1b (8 campioni pari al 3.9%), sottotipo 2b (3 campioni pari all'1.5%), sottotipi 2a/2d, 4a/4c/4e/4l, 4c/4e/4l, 4c/4t, 4e, (1 campione per sub-tipo con percentuale pari allo 0.5% ciascuno). Come evidenziato nella Tabella 2, per un campione (HCV-RNA genotipo 1g+4a/4c/4r) non è stato possibile determinare l'esatto genotipo virale a causa della bassa similarità tra gli isolati riscontrati nel plasma e le sequenze genomiche presenti nella libreria 5'UTR 0902; occorre dunque precisare che non è sempre possibile determinare il sottotipo dell'HCV-RNA sequenziando la regione 5'UTR del genoma virale. In questi casi per determinare il sottotipo dell'HCV-RNA occorrerebbe utilizzare un'altra regione genomica da sequenziare quale, ad esempio, la regione NS5B.

Dalla fine di ottobre 2006 il Laboratorio di Biologia Molecolare esegue analisi non solo per i pazienti ricoverati e per quelli afferenti al poliambulatorio esterno dell'Azienda Ospedaliera "S. Maria", ma anche per i pazienti in precedenza utenti della Asl n°4 di Terni e quindi analizza campioni provenienti dai Sert, dalle Comunità di Recupero e dalle Case Circondariali territoriali. Tale situazione potrebbe aver determinato il cambiamento nella prevalenza dei genotipi, a causa dell'abbassamento dell'età anagrafica dei pazienti considerati. Per cercare un riscontro significativo a questa ipotesi, i 204 campioni esaminati per la tipizzazione del genoma dell'HCV nell'anno 2012 sono stati successivamente suddivisi in tre classi di età: > di 50 anni, tra 50 e 30 anni, uguale o inferiore a 30 anni (Tabella 4).

Dei dati riportati in Tabella 4 le associazioni classi d'età/genotipo relative al sottotipo 1a ($p=0.011$), 1a/1b ($p=0.033$), 2a ($p<0.0001$) e 4c ($p=0.0072$), hanno corrisposto al criterio di significatività, le altre associazioni sono risultate statisticamente non significative ($p \geq 0.05$); alla significatività statistica dei dati relativi ai genotipi 1a, 1a/1b, 2a e 4c hanno contribuito principalmente le due classi di età > di anni 50 e tra 50 e 30 anni, essendo il contributo numerico dei pazienti con età \leq di 30 anni (11 su 204 totali) di gran lunga inferiore. Si è quindi proceduto alla valutazione del rapporto tra le variabili qualitative (classi d'età: >50 anni e 50-30 anni) e genotipi 1a, 1a/1b, 2a, 4c come descritto in Tabella 5.

Tutti i valori di p sono risultati minori di 0.05 e quindi tutte le correlazioni tra genotipi virali ed età riportate in Tabella 5 sono risultate statisticamente significative. Il valore di $p=0.028$ per il sottotipo 1a sta ad indicare che la maggior parte dei

pazienti tra 30-50 anni presenta questo genotipo. Il valore di $p=0.0047$ per il sottotipo 4c evidenzia che su 17 campioni totali che avevano questa variante virale, 16 appartenevano a pazienti con età compresa fra 30-50 anni. Ugualmente, il valore di $p<0.0001$ per il sottotipo 2a, evidenzia come questo genotipo sia rappresentato nei pazienti più anziani (>50 anni). Il valore di $p=0.0218$ per il sottotipo 1a/1b, si spiega collocando nella fascia d'età > 50 anni il 75% dei pazienti con genotipo 1a/1b.

DISCUSSIONE

I dati relativi all'anno 2012 ottenuti dai 204 campioni analizzati evidenziano una distribuzione dei genotipi dell'HCV in buona misura sovrapponibile alla diffusione delle varianti del virus nella popolazione generale Italiana ed in particolare in quella dell'Italia Centrale.

Il genotipo più frequente è risultato essere il genotipo 1 in accordo con precedenti indagini condotte sia nel territorio nazionale che nelle regioni del Centro Italia (2, 3). Per quanto concerne la preva-

lenza dei vari sottogenotipi dell'HCV, il sottotipo 1a è risultato il più rappresentato soprattutto fra i soggetti di sesso maschile; i sottotipi 3a ed 1b (la cui associazione con le pazienti di sesso femminile è risultata statisticamente significativa) sono risultati parimenti molto frequenti.

I dati del 2012 mostrano inoltre un incremento del genotipo 4 probabilmente dovuto alla crescita dell'immigrazione dal Nord-Africa e dal Medio-Oriente aree geografiche ad elevata endemia per tale genotipo. Considerando, infine, la variabile qualitativa età anagrafica dei pazienti, i soggetti con più di 50 anni avevano soprattutto i genotipi 2a e 1b mentre nei soggetti con età compresa tra i 50 ed i 30 anni i genotipi più frequenti sono risultati essere l'1a, il 3a ed il 4c.

La presenza nella nostra realtà dei genotipi 1a e 3a potrebbe far pensare, come in altre parti d'Italia, ad un legame con la diffusione e l'abuso di sostanze stupefacenti, mentre i genotipi 1b e 2a sembrerebbero essere associati ad infezioni *post*-trasfusionali e soprattutto "community-acquired".

Tabella 1. Campioni sequenziati nella regione 5'UTR del genoma virale nell'anno 2012 distinti per sesso e reparto di provenienza

Reparto di provenienza	UOMINI	DONNE	Totale	Percentuale%
ACOIN (Amelia "Comunità Incontro" di recupero per tossicodipendenti)	6	1	7	3.4
ASL n° 4	8	7	15	7.3
Casa Circondariale Terni	15		15	7.3
Clinica Medica Generale	1	1	2	1.0
Dermatologia		1	1	0.5
DH Malattie Infettive	28	15	43	21.1
DH Medico	2	2	4	2.0
DH Neurologico	1		1	0.5
Esterni	11	6	17	8.3
Malattie Apparato Respiratorio (MAR)		1	1	0.5
Malattie Infettive	4	3	7	3.4
Medicina d'Urgenza	1		1	0.5
Medicina Interna A/B	1		1	0.5
Nefrologia		1	1	0.5
Oncoematologia	2	1	3	1.5
Ospedale Amelia	5	4	9	4.4
Ospedale Narni	4	1	5	2.4
Ospedale Orvieto	5	7	12	5.9
Sert Narni	4		4	2.0
Sert Orvieto	2		2	1.0
Sert Terni	48	2	50	24.5
Servizio Trasfus. Terni		1	1	0.5
Terap. Intens. Post Operat.		1	1	0.5
Unità del Fegato	1		1	0.5
TOTALE	149	55	204	100.0

Tabella 2. Campioni sequenziati nella regione 5'UTR del genoma dell'HCV nell'anno 2012: distribuzione dei genotipi e dei sottotipi virali

GENOTIPI	Sottotipi	N° Campioni	Percentuale %
Genotipo 1	1a	61	29.9
	1b	41	20.1
	1a/1b	8	3.9
Genotipo 2	2a	19	9.3
	2a/2d	1	0.5
	2b	3	1.5
Genotipo 3	3a	49	24.0
Genotipo 4	4a/4c/4e/4l	1	0.5
	4c	17	8.3
	4c/4e/4l	1	0.5
	4c/4t	1	0.5
	4e	1	0.5
Genotipo bassa similarità*	1g/4a/4c/4r	1	0.5
TOTALE		204	100.0

*Non è sempre possibile determinare il genotipo/sottotipo HCV utilizzando la regione 5'UTR. In questi casi per definire l'esatto genotipo/sottotipo HCV occorrerebbe utilizzare un'altra regione del genoma virale.

Tabella 3. Campioni sequenziati nella regione 5'UTR del genoma virale nell'anno 2012: distribuzione dei genotipi e dei sottotipi virali nei pazienti di sesso maschile e femminile

GENOTIPI	Sottotipi	Uomini	Donne	% Uomini	% Donne
Genotipo 1	1a	51	10	25	4.9
	1b	22	19	10.8	9.3
	1a/1b	6	2	2.9	1.0
Genotipo 2	2a	7	12	3.4	5.9
	2a/2d		1		0.5
	2b	3		1.5	
Genotipo 3	3a	41	8	20.1	3.9
Genotipo 4	4a/4c/4e/4l	1		0.5	
	4c	14	3	6.8	1.5
	4c/4e/4l	1		0.5	
	4c/4t	1		0.5	
	4e	1		0.5	
Genotipo bassa similarità	1g/4a/4c/4r	1		0.5	
TOTALE		149	55	73	27

Tabella 4. Distribuzione dei genotipi dell'HCV in relazione a tre grandi classi d'età: superiore a 50 anni, tra 50 e 30 anni ed inferiore o uguale a 30 anni

Sottotipi virali Classi d'età	1a	1b	1a/1b	2a	2a/2d	2b	3a	4a/4c/4e/4l	4c	4c/4e/4l	4c/4t	4e	1g+4a/4e/4r	Tot. (%)
>50anni	12 (5.9)	17 (8.3)	6 (2.9)	16 (7.8)	1 (0.5)	2 (1.0)	12 (5.9)		1 (0.5)					67 (32.8)
50-30 anni	43 (21.1)	22 (10.8)	2 (1.0)	3 (1.5)		1 (0.5)	34 (16.7)	1 (0.5)	16 (7.8)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	126 (61.8)
≤ 30 anni	6 (2.9)	2 (1.0)					3 (1.5)							11 (5.4)
Totale (%)	61 (29.9)	41 (20.1)	8 (3.9)	19 (9.3)	1 (0.5)	3 (1.5)	49 (24.0)	1 (0.5)	17 (8.3)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	204 (100)

Tabella 5. Associazioni statisticamente significative genotipi-classi d'età

genotipo	1a	1a/1b	2a	4c	Totale (%)
>50 anni	12 (34.3)	6 (17.1)	16 (45.7)	1 (2.9)	35 (100)
50-30 anni	43 (67.2)	2 (3.1)	3 (4.7)	16 (25.0)	64 (100)
0,05≥p<0,05	0,0028	0,0218	<0,0001	0,0047	

BIBLIOGRAFIA

1. Argentini C, Dettori S, Rapicetta M. Variabilità virale ed infezione da HCV. Rapporti ISTISAN 2003; 03/09: 116-20.
2. Bellentani S, Mignoli L, Bedogni G, Croce LS, Tribelli C. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 15-29.
3. Cenci M, De Soccio G, Recchia O. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) genotypes in central Italy. *Anticancer Res* 2003; 23: 5129-32.
4. Cicciarello S, Borgia G, Crowell J, et al. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Southern Italy. *Eur J Epidemiol* 1997; 13(1): 49-54.
5. Marascio N, Matera G, Quirino A, et al. Eleven-year distribution pattern of hepatitis C virus in southern Italy. *J Pathog* 2012; 2012: 631095.
6. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-9.
7. Miyakawa Y, Okamoto H, Mayumi M. Classifying hepatitis C virus genotypes. *Mol Med Today* 1995; 1: 20-5.
8. Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' non-coding region. *J Clin Microbiol* Apr 2003; 41(4): 1558-64.
9. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al. Nucleotide sequence of genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72: 2697-704.
10. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infectious Dis* 1995; 171: 1607-10.
11. Plauzolles A, Lucas M, Gaudieri S. Hepatitis C virus adaptation to T-cell immune pressure. *Scientific World Journal* 2013; 2013: 673240.
12. Roffi L, Ricci A, Ogliari C, et al. HCV genotypes in Northern Italy: a survey of 1368 histologically proven chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 1998; 29: 701-6.
13. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 2012 Dec; 8(12): e1003056.
14. Roque-Afonso AM, Férey MP, Poveda JD, Marchadier E, Dussaix E. Performance of TRUGENE™ hepatitis C virus 5' non coding genotyping kit, a new CLIP™ sequencing-based assay for hepatitis C virus genotype determination. *J of Viral Hepatitis* 2002; 9: 385-9.
15. Sacco R, Randone A, Flichman D, et al. The prevalence of hepatitis C virus types in patients of the same geographic area, according to the source of infection and liver disease. *Clin Diagn Virol* 1997; 8(3): 189-94.
16. Silini E, Bono F, Cividini A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *J Hepatol* 1995; 22: 691-5.
17. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-9.
18. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparison in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75: 1053-61.
19. Xu LZ, Larzul D, Delaporte E, Bréchet C, Kremsdorf D. Hepatitis C virus genotype 4 is highly prevalent in central Africa (Gabon). *J Gen Virol* 1994; 75(Pt 9): 2393-8.