

LAVORO ORIGINALE

Associazione tra genotipo virale, HLA e manifestazioni extra-epatiche dell'epatite C*

Viral genotype and HLA class II alleles influence on extra-hepatic manifestations of chronic HCV infection

C. Giannitti¹, G. Morozzi¹, S. D'Alfonso², F. Bellisai¹, M. Galeazzi¹

¹Sezione di Reumatologia, Dipartimento Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Università di Siena;

²Dipartimento di Scienze Mediche e IRCAD (Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases), Università del Piemonte Orientale A. Avogadro

SUMMARY

Objective: To test whether an association between HCV genotype, HLA class II alleles distribution and extra-hepatic manifestations (EHM) can be demonstrated in a group of Italian patients with chronic HCV infection.

Methods: Sixty patients affected by HCV infection with EHM were consecutively enrolled. 163 HCV patients without EHM were tested as controls for the prevalence of HCV genotypes, while we referred to literature as to the controls for HLA distribution. HCV-RNA was quantified by a RT-PCR. HLA class II alleles typing was performed using a standard microlymphocytotoxicity assay. We used chi-square or Fisher test ($p < 0.05$ significant). Odds Ratio (OR) was performed by 2X2 contingency table.

Results: HCV 2c genotype was found in 63.46% of patients compared to 19.63% of controls ($p < 0.0001$; OR=7.11). Furthermore, it correlated with carpal tunnel syndrome ($p=0.03$; OR=4.5) and autoimmune thyroiditis ($p=0.02$; OR=9.2). On the contrary, 1b genotype protected from EHM in toto ($p=0.0004$; OR=0.21) and particularly from carpal tunnel syndrome ($p=0.0014$; OR=0.07). Moreover, 3a genotype prevented HCV people from having cryoglobulinemia ($p=0.05$; OR=0.11). As to HLA, DR6 seemed to facilitate EHM in HCV patients ($p=0.041$; OR=1.61), while DQ2 ($p=0.03$; OR=0.5) and DQ3 ($p=0.002$; OR=0.5) may play a protective role. In addition, HLA DR3 was associated with cryoglobulinemia ($p=0.02$; OR=9.5).

Conclusions: According to our findings, 2c genotype can be considered as a major risk factor for developing HCV-related EHM, while 1b genotype seems to prevent their onset; there are also evidences suggesting that HLA might play a role in chronic HCV infected patients.

Reumatismo, 2008; 60(3):192-198

*Lavoro premiato al XLIV Congresso SIR, Venezia 2007.

INTRODUZIONE

Le malattie autoimmuni sono caratterizzate da un'anormale attivazione dei linfociti B con produzione di autoanticorpi, comparsa di linfociti T autoreattivi ed alterazioni del complemento.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Chiara Giannitti
Sezione di Reumatologia
Dipartimento Medicina Clinica e Scienze Immunologiche
Viale Bracci - 53100 Siena
E-mail: chiara.giannitti@libero.it

La fisiopatologia di tali affezioni è sconosciuta; sembra tuttavia che fattori genetici ed infezioni virali possano essere coinvolti nella loro eziopatogenesi (1, 2).

Tra i virus candidati, uno dei più studiati è quello dell'epatite C (HCV) (3, 4).

La morbilità associata con l'infezione da HCV è, infatti, dovuta non solo alle sequele dell'epatopatia cronica (cirrosi, carcinoma epatocellulare), ma anche a disordini extra-epatici nell'ospite (5, 6), che secondo alcune stime sarebbero presenti in circa il 36% dei pazienti HCV, ma l'esatta prevalenza non è nota (7, 8). HCV può, infatti, replicarsi in tessuti e cellule extraepatiche, comprese le cellule mononucleate del sangue periferico (9), e tale recen-

te osservazione ha dato lo spunto per analizzare i possibili meccanismi dei fenomeni autoimmuni associati ad HCV (10, 11).

A tale proposito, diversi studi hanno cercato di dimostrare l'associazione tra fattori virali, come il titolo sierico di HCV-RNA e/o il genotipo virale, e la suscettibilità a sviluppare disordini immunomediati in pazienti con infezione da HCV (12, 13).

È stato, inoltre, ipotizzato che fattori dell'ospite possano giocare un ruolo importante nella patogenesi delle manifestazioni extra-epatiche (MEE) HCV-correlate. Una predisposizione genetica, infatti, è stata ben dimostrata in diverse malattie autoimmuni, sia in modelli animali che umani. È evidente che tale predisposizione possa essere attribuita, almeno in parte, ai prodotti del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA) (14, 15), la cui funzione è, infatti, quella di regolare la risposta immunitaria. È anche noto che molte malattie autoimmuni, disordini immunomediati, formazione di autoanticorpi (16) si verificano più frequentemente in portatori di particolari antigeni A, B, DR del sistema HLA.

Lo scopo del nostro studio, quindi, è stato quello di valutare il ruolo giocato dall'assetto genetico HLA - DR e -DQ del paziente e dal genotipo virale come fattori di rischio per lo sviluppo di MEE in pazienti con infezione cronica da HCV.

MATERIALI E METODI

Sessanta pazienti, non parentati, affetti da infezione cronica da HCV con MEE sono stati inclusi consecutivamente nello studio tra ottobre 2001 e ottobre 2006; di questi, 49 erano femmine e 11 maschi. L'età media era di 59,3 anni (dev. std. = 9,7 anni) e la durata media del disordine extra-epatico di 7,1 anni (mediana 4 anni).

Nello stesso periodo sono stati arruolati 163 pazienti con infezione da HCV senza MEE come controlli per la prevalenza dei genotipi di HCV, mentre per la distribuzione degli alleli HLA di classe II nella popolazione sana, abbiamo fatto riferimento ai dati presenti in letteratura (17, 18).

Per rendere possibile il confronto tra soggetti della stessa area geografica, tutti i pazienti ed i controlli provenivano dall'Italia Centrale. Il consenso informato e l'approvazione della commissione etica sono stati ottenuti prima dell'inizio dello studio. Test ematologici di routine sono stati effettuati su tutti i pazienti, compresa la ricerca del Fattore Reumatoide IgM, degli anticorpi anti-tiroide, degli an-

ticorpi antinucleari (ANA) con immuno-fluorescenza indiretta (Hep2) e delle crioglobuline; la crioglobulinemia era riportata come positiva quando il criocrito era >1%.

La determinazione del genoma virale è stata effettuata mediante reazione polimerasica a catena con trascrittasi inversa (RT-PCR).

La tipizzazione degli alleli HLA di classe II è stata ottenuta con un test standard di microlinfocitotossicità su preparazioni purificate di linfociti B nei pazienti HCV.

Per rendere possibile il confronto delle frequenze fenotipiche ottenute sui pazienti con il test di microlinfocitotossicità con quelle genotipiche riportate in letteratura, abbiamo operato la trasformazione secondo la formula in uso:

$$F_g \cdot 100 = 1 - \sqrt{1 - F_f} \quad (\text{con } F_g : \text{frequenza genica} \\ \text{e } F_f : \text{frequenza fenotipica}).$$

Le frequenze degli alleli HLA sono state confrontate tra i gruppi utilizzando l'analisi convenzionale del chi-quadro con correzione di Yate, quando appropriato, o il test esatto di Fisher (2 code). Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. L'odds ratio (OR) è stata calcolata utilizzando una tabella di contingenza 2x2. Quando il valore di una cella nella tabella 2x2 era 0, è stata applicata la modificazione di Haldane.

RISULTATI

Le manifestazioni clinico-sierologiche più frequenti nei nostri pazienti con infezione cronica da HCV (Tab. I) erano crioglobulinemia (57,63%), sindrome del tunnel carpale (STC) (42,59%), sindrome secca (31,48%), poliartrite cronica (17,24%); il fattore reumatoide era positivo in 41 pazienti (68,33%) e gli ANA in 17 (29,31%).

In tabella II sono illustrate le correlazioni tra le MEE e il genotipo virale. Dai dati ottenuti, risulta evidente l'associazione tra il genotipo 2c e la comparsa di MEE nel loro complesso (OR=7,11; $p < 0,0001$; $pc = 0,0006$). Abbiamo, inoltre, riscontrato una associazione tra tale genotipo e alcune MEE, che però non mantengono la significatività statistica dopo la correzione del p per il numero di confronti effettuati. In particolare, è emersa l'associazione con la presenza di STC (OR=4,5; $p = 0,03$; $pc = n.s$) e di tiroidite autoimmune (OR=9,2; $p = 0,02$; $pc = n.s$) (dati non evidenziati nel testo).

Al contrario, emerge l'effetto protettivo, statistica-

mente significativo, che il genotipo 1b sembra conferire verso la comparsa di MEE in toto (OR=0,21; p=0,0004; pc=0,0024) e, in particolare, verso la STC (OR=0,07; p=0,0014; pc=0,0084). Inoltre, il genotipo 3a sembra proteggere dalla comparsa di crioglobulinemia in modo statisticamente significativo (OR=0,11; p=0,05; pc=n.s.).

Tabella I - Distribuzione delle manifestazioni clinico-sierologiche nei 60 pazienti HCV con MEE.

Manifestazioni clinico-sierologiche	N.	%
Crioglobulinemia	34	(57,63%)
Sindrome del tunnel carpale (STC)	23	(42,59%)
Sindrome secca	17	(31,48%)
Poliartrite cronica (5AR, 3ARPS)	10	(17,24%)
Fenomeno di Raynaud (RP)	8	(13,56%)
Tiroidite autoimmune	6	(10%)
Poliartrite e STC	7	(12%)
Poliartrite e crioglobulinemia	6	(10,3%)
Poliartrite e sindrome secca	5	(8,6%)
Poliartrite e tiroidite autoimmune	1	(1,7%)
Crioglobulinemia e sindrome secca	11	(18,6%)
Crioglobulinemia e RP	4	(6,7%)
Sindrome secca, CAH e RP	4	(7,4%)
Fattore reumatoide	41	(68,33%)
ANA	17	(29,31%)

Tabella II - Distribuzione del genotipo virale nei pazienti HCV con e senza MEE.

Genotipo virale	HCV+MEE+	HCV+MEE-	OR	p	pc
1a	5/52 (9,62%)	28/163 (17,08%)	0,51	0,27	
1b	7/52 (13,5%)	68/163 (41,7%)	0,21	0,0004	0,0024
2a	4/52 (7,69%)	8/163 (4,9%)	1,61	0,67	
2c	33/52 (63,46%)	32/163 (19,63%)	7,11	<0,0001	0,0006
3a	5/52 (9,62%)	27/163 (16,56%)	0,53	0,31	
4c	1/52 (1,92%)	5/163 (3%)	0,61	0,96	

Tabella III - Distribuzione alleli HLA tra i pazienti HCV+ con MEE e i sani.

HLA	HCV+MEE+	Controlli sani	OR	p	pc
DQ1	36/112 (32,14%)	271/760 (35,65%)	0,85	0,52	
DQ2	12/112 (10,71%)	146/760 (19,21%)	0,5	0,03	ns
DQ3	30/112 (26,78%)	319/760 (41,97%)	0,5	0,002	0,02
DQ4	4/112 (3,57%)	22/760 (2,89%)	1,2	0,76	
DR1	12/120 (10%)	97/1074 (9%)	1,12	0,85	
DR2	8/120 (6,67%)	141/1074 (13,13%)	0,47	0,059	ns
DR3	7/120 (5,83%)	89/1074 (8,29%)	0,69	0,45	
DR4	10/120 (8,33%)	67/1074 (6,24%)	1,37	0,49	
DR5	31/120 (25,83%)	250/1074 (23,28%)	1,15	0,6	
DR6	32/120 (26,67%)	198/1074 (18,43%)	1,61	0,041	ns
DR7	14/120 (11,67%)	119/1074 (11,08%)	1,06	0,97	
DR8	4/120 (3,34%)	31/1074 (2,89%)	1,16	0,77	

Per quanto concerne la distribuzione degli alleli HLA tra i pazienti HCV + con MEE rispetto alla popolazione generale di controllo della letteratura (Tab. III), si evince una debole associazione con il DR6 (OR=1,61; p=0,041; pc=n.s.), mentre il possedere l'allele DQ2 (OR=0,5; p=0,03; pc=n.s.), DQ3 (OR=0,5; p=0,002; pc=0,02) e DR2 (OR=0,47; p=0,059; pc=n.s.) sembra conferire protezione per la comparsa delle MEE.

Inoltre, dai nostri dati emerge anche che l'allele HLA DR3 conferisce il rischio di sviluppare crioglobulinemia (OR=9,50; p=0,02; pc=n.s.).

Non emergono nel nostro studio correlazioni dirette tra l'assetto genetico HLA dell'ospite e il genotipo del virus.

DISCUSSIONE

Dai dati ricavati dal nostro studio, emergono possibili associazioni tra le MEE con il genotipo virale di HCV e tra la presenza di MEE e l'assetto genetico del paziente.

Riguardo il genotipo virale, numerose correlazioni sono emerse: le più significative, mai descritte prima da altri gruppi, riguardano l'associazione tra il genotipo 2c di HCV e lo sviluppo delle MEE

nel loro complesso (OR=7,11; $p < 0,0001$; $pc=0,0006$). Il genotipo 2c è risultato correlato, inoltre, con la STC (OR=4,5; $p=0,03$; $pc=n.s$) e con la tiroidite autoimmune (OR=9,2; $p=0,02$; $pc=n.s$) nei pazienti in studio.

Alcuni di questi risultati trovano conferma in Sebastiani et al. (19), che evidenziava una significativa associazione tra il genotipo virale 2c e le MEE complessivamente (OR=5,1; $p=0,00001$).

Il genotipo virale 1b, invece, sembra proteggere in modo statisticamente significativo dallo sviluppo di MEE nella loro totalità (OR=0,21; $p=0,0004$; $pc=0,0024$) e dalla STC in particolare (OR=0,07; $p=0,014$; $pc=0,0084$) nei pazienti esaminati. La correlazione in senso protettivo verso la comparsa di MEE era già stata trovata da Sebastiani et al. (OR=0,21; $p=0,002$) (19).

Riguardo l'assetto genetico del paziente, abbiamo trovato che i portatori dell'allele HLA DQ2 (OR=0,5; $p=0,03$; $pc=n.s$), DQ3 (OR=0,5; $p=0,002$; $pc=0,024$), DR2 (OR=0,47; $p=0,059$; $pc=n.s$) risultavano protetti dall'infezione da virus dell'epatite C e dalle sue conseguenti MEE in modo statisticamente significativo, mentre l'allele DR6 sembrava conferire loro suscettibilità (OR=1,61; $p=0,041$; $pc=n.s$). Abbiamo confrontato i nostri risultati con quelli precedentemente descritti da altri autori ed abbiamo trovato numerosi riscontri.

Anche Yoon et al. osservavano che la frequenza allelica del DQ2 era significativamente più bassa nei portatori cronici di HCV che nei controlli sani (20). Le conferme più numerose riguardano il DQ3. Molti autori (21) sostengono che tale allele risulta protettivo verso l'infezione cronica da HCV (22), favorendo la clearance spontanea del virus (23-26), e quindi associa con un'infezione autolimitantesi, con una malattia meno severa e minor rischio di epatopatia HCV-correlata end-stage (27-31), perchè più efficiente nel presentare gli epitopi HCV ai linfociti T CD4+ (32, 33).

In merito al DR2, i nostri dati concordano con studi che dimostravano la sua prevalenza nei pazienti con infezione autolimitantesi rispetto ai pazienti con infezione cronica (34), in quanto favorirebbe la clearance virale (35).

Riguardo all'importanza del DR6 nello sviluppo delle MEE in pazienti HCV+, i nostri risultati confermano quelli di Sebastiani et al. (19). È stata anche segnalata un'aumentata frequenza dell'HLA DR6 in pazienti italiani HCV positivi con lichen planus orale (36). Scotto et al. inoltre, hanno evidenziato che la presenza del DR6 predisponesse ad un maggiore danno epatico (37).

Sono emerse anche altre associazioni riguardo alcune manifestazioni cliniche e sierologiche.

Nel nostro studio, la crioglobulinemia compare associata alla presenza dell'assetto genico HLA DR3 (OR=9,50; $p=0,02$; $pc=n.s$). L'associazione negativa del DR5 con la crioglobulinemia (OR=0,07) che era stata trovata da Sebastiani et al. (19) non trova pienamente conferma nei nostri dati (OR=0,32; $p=0,06$). In contrasto con questi risultati, Amoroso et al. (38) hanno riportato una significativa aumentata frequenza di DR5 in pazienti crioglobulinemici se confrontati con i controlli ($p=0,0035$) e anche Congia et al. (39) hanno evidenziato che il DR5, nei pazienti con infezione da HCV, era associato con sintomi clinici di crioglobulinemia quando confrontati con pazienti asintomatici e controlli. Questa discrepanza può essere dovuta a una diversa numerosità del campione esaminato e/o alle differenze geografiche dei pazienti. Cacoub (40) inoltre, affermava che il DR5 era associato con un maggior rischio di sviluppo della crioglobulinemia HCV correlata (OR=3,4; $pc=0,017$).

Ritornando all'associazione tra DR3 e formazione di crioglobuline da noi trovata, questa era stata ben evidenziata anche da Yee (27), Manns e Rambusch (41), Nocente et al. (42), Lenzi et al. (43), Hwang et al. (44).

È stato anche visto che la crioglobulinemia HCV correlata era associata al genotipo virale 2c con OR=3,52, al genotipo 2a con OR=2,48, al genotipo 1b con OR=1,51. Se invece, il genotipo era il 3a il paziente HCV positivo sembrava protetto dal presentare anche una crioglobulinemia (OR=0,11; $p=0,05$; $pc=n.s$). Anche Zignego et al. (45) hanno trovato che il genotipo 2a di HCV era più frequente nei soggetti con crioglobulinemia mista che nei controlli (41% vs 15%).

Possiamo confermare la particolare frequenza della tiroidite autoimmune nei soggetti HCV positivi presente in letteratura (42, 46-49). Più precisamente, la prevalenza da noi trovata (10%) è perfettamente in linea con quella riscontrata da Broussole et al. (4,6-15%) (50), da Huang et al. (13,5%) (51), da Antonelli et al. (17-21%) (52), da Testa et al. (11,6%) (53).

Più in generale ancora, la prevalenza delle manifestazioni clinico-sierologiche nella nostra casistica, è in linea con quella osservata dal GERMIVIC (48) nel 2000 per alcuni parametri considerati (crioglobulinemia =57,63% vs 56%, poliartrite =17,24% vs 19%, tiroidite autoimmune =10% vs 13%), mentre se ne discosta per altri (sindrome secca =31,48% vs 12%, positività degli ANA =29,31% vs 41%, po-

sività del fattore reumatoide =68,33% vs 38%): tali differenze potrebbero essere dovute alla diversa numerosità (60 pazienti vs 321), provenienza geografica e selezione (ambiente reumatologico vs ambiente internistico) del campione esaminato o alla diversità delle metodiche per dosare gli autoanticorpi.

In conclusione, quindi, si conferma la forte correlazione, da noi già descritta, del genotipo 2c con lo sviluppo di MEE; parimenti, si conferma la protezione che il genotipo virale 1b sembra conferire verso di esse: paradossalmente si tratta proprio di quel genotipo che sappiamo associato con epatopatia più aggressiva e possibile evoluzione in epatocarcinoma, identificato anche come quello meno sensibile alla terapia con interferone alfa.

Anche l'HLA del paziente sembra svolgere un ruolo nella predisposizione genetica o nella protezione conferita verso la comparsa di MEE di tipo immunitario in soggetti con infezione cronica da HCV, ma non così determinante come il genotipo virale. Tuttavia, non emergono nel nostro studio correlazioni dirette tra l'assetto genetico HLA dell'ospite e il genotipo virale.

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che l'infezione da HCV, frequentemente associata alla comparsa di patologie immunomediate, rappresenta un interessante modello umano di auto-immunità indotta da un virus a RNA in individui geneticamente predisposti.

Certamente, studi più estesi sono necessari per verificare questa ipotesi.

RIASSUNTO

Scopo: Valutare il ruolo dei genotipi HCV e degli alleli HLA di II classe come fattori di rischio per manifestazioni extraepatiche nell'infezione cronica da HCV. A tale scopo abbiamo reclutato 60 pazienti con HCV e manifestazioni extraepatiche e 163 pazienti HCV+ senza manifestazioni extraepatiche come controlli per la prevalenza del genotipo, riferendoci alla letteratura per la distribuzione del DR e DQ.

Risultati: I risultati del nostro studio hanno messo in evidenza:

- 1) un'associazione tra il genotipo 2c e le manifestazioni extraepatiche, la sindrome del tunnel carpale (STC) e la tiroidite autoimmune;
- 2) che il genotipo 1b protegge dalle manifestazioni extraepatiche e dalla STC;
- 3) che il genotipo 3a protegge dalla crioglobulinemia;
- 4) che il DR6 predispone alle manifestazioni extraepatiche e il DR3 alla crioglobulinemia;
- 5) che DQ2 e DQ3 proteggono dalle manifestazioni extraepatiche.

Parole chiave - HCV-HLA, manifestazioni extra-epatiche.

Key words - HCV-HLA, extra-hepatic manifestations.

BIBLIOGRAFIA

1. Mountz JD, Talal N. Retrovires, apoptosis and autoantigens. *Immunology Today* 1993; 14: 532-6.
2. Behar SM, Porcelli SA. Mechanisms of autoimmune disease induction, the role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 458-76.
3. Pivetti S, Novarino A, Merico F, Bertero MT, Brunetto MR, Bonino F, et al. High prevalence of autoimmune phenomena in hepatitis C virus antibody positive patients with lymphoproliferative and connective tissue disorders. *Br J Haematol* 1996; 95: 204-11.
4. Buskila D. Hepatitis C-associated arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 295-9.
5. Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci* 2003; 325: 135-48.
6. Lormeau C, Falgarone G, Roulot D, Boissier MC. Rheumatologic manifestations of chronic hepatitis C infection. *Joint Bone Spine* 2006; 73: 633-8.
7. Sterling RK, Bralow S. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus. *Curr Gastroenterol Rep* 2006; 8: 53-9.
8. Vassilopoulos D, Calabrese LH. Extrahepatic immunological complications of hepatitis C virus infection. *AIDS* 2005; 19 (3 Suppl): 123S-7S.
9. Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006; 44: 15-22.
10. Durazzo M, Mariani GM, Sacchi C, Biava MA. HCV and extrahepatic diseases. *Minerva Gastroenterol Dietol* 1998; 44: 91-104.
11. Kristiansen MG, Florholmen J. Extrahepatic manifestations in hepatitis C. Are they overlooked? *Tidsskr Nor Laegeforen* 2001; 121: 446-9.
12. Nagao Y, Sata M, Itoh K, Tanikawa K, Kameyama T. Quantitative analysis of HCV-RNA and genotype in patients with chronic hepatitis C accompanied by oral lichen planus. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 495-8.
13. Lodi G, Carrozzo M, Hallet R, D'Amico E, Piattelli A, Teo CG, et al. HCV genotypes in Italian patients with HCV-related oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 381-4.

14. Sebastiani GD, Galeazzi M, Morozzi G, Marcolongo R. The immunogenetics of the antiphospholipid syndrome, anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulant. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25: 414-20.
15. Lulli P, Sebastiani GD, Trabace S, Passiu G, Cappelacci S, Porzio F, et al. HLA antigens in Italian patients with systemic lupus erythematosus: evidence for the association of DQw2 with the autoantibody response to extractable nuclear antigens. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 475-9.
16. Galeazzi M, Sebastiani GD, Tincani A, Piette JC, Allegri F, Morozzi G, et al. HLA class II associations of anti-cardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of european patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; 9: 47-55.
17. Rendine S, Borelli I, Barbanti M, Sacchi N, Roggero S, Cartoni ES. HLA polymorphisms in Italian bone marrow donors: a regional analysis. *Tissue Antigens* 1998; 52: 135-46.
18. www.allelefrequencies.net
19. Sebastiani GD, Bellisai F, Caudai C, Rottoli P, Valensin PE, Pippi L, et al. Association of extrahepatic manifestations with HLA class II alleles and with virus genotype in HCV infected patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 2005; 19: 17-22.
20. Yoon SK, Han JY, Pyo CW, Yang JM, Jang JW, Kim CW, et al. Association between human leukocytes antigen alleles and chronic hepatitis C virus infection in the Korean population. *Liver Int* 2005; 25: 1122-7.
21. Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, Bottelli R, Daielli C, Asti M, et al. Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 28: 1-7.
22. Cramp ME, Carucci P, Underhill J, Naoumov NV, Williams R, Donaldson PT. Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *J Hepatol* 1998; 29: 207-13.
23. Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, et al. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J Hepatol* 1999; 30: 984-9.
24. Minton EJ, Smillie D, Neal KR, Irving WL, Underwood JC, James V. Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *J Infect Dis* 1999; 179: 1309-10.
25. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Bureau C, Sandre K, et al. Study of host- and virus-related factors associated with spontaneous hepatitis C virus clearance. *Tissue Antigens* 2000; 56: 154-8.
26. De Re V, Caggiari L, Talamini R, Crovatto M, De Vita S, Mazzaro C, et al. Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma and B-cell lymphoma patients show a different profile of major histocompatibility complex class II alleles. *Hum Immunol* 2004; 65: 1397-404.
27. Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2004; 5: 237-45.
28. Yoshizawa K, Ota M, Saito S, Maruyama A, Yamaura T, Rokuhara A, et al. Long-term follow-up of hepatitis C virus infection: HLA class II loci influences the natural history of the disease. *Tissue Antigens* 2003; 61: 159-65.
29. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1997; 113: 1675-81.
30. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Treppe C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. *Lancet* 1999 Dec 18-25; 354: 2119-24.
31. Tillmann HL, Chen DF, Trautwein C, Kliem V, Grundey A, Berning-Haag A, et al. Low frequency of HLA-DRB1*11 in hepatitis C virus induced end stage liver disease. *Gut* 2001; 48: 714-8.
32. Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7302-7.
33. Harcourt G, Hellier S, Bunce M, Satsangi J, Collier J, Chapman R, et al. Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2001; 8: 174-9.
34. Lechmann M, Schneider EM, Giers G, Kaiser R, Dumoulin FL, Sauerbruch T, et al. Increased frequency of the HLA-DR15 (B1*15011) allele in German patients with self-limited hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 337-43.
35. McKiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, et al. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 2004; 40: 108-14.
36. Carozzo M, Francia Di Celle P, Gandolfo S, Carbone M, Conrotto D, Fasano ME, et al. Increased frequency of HLA-DR6 allele in Italian patients with hepatitis C virus-associated oral lichen planus. *Br J Dermatol* 2001; 144: 803-8.
37. Scotto G, Fazio V, D'Alessandro G, Monno L, Saracino A, Palombo E, et al. Association between HLA class II antigens and hepatitis C virus infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17: 316-21.
38. Amoroso A, Berrino M, Canale L, Cornaglia M, Guarera S, Mazzola G, et al. Are HLA class II and immunoglobulin constant region genes involved in the pathogenesis of mixed cryoglobulinemia type II after hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1998; 29: 36-44.
39. Congia M, Clemente MG, Dessi C, Cucca F, Mazzoleni AP, Frau F, et al. HLA class II genes in chronic hepatitis C virus-infection and associated immunological disorders. *Hepatology* 1996; 24: 1338-41.
40. Cacoub P, Renou C, Kerr G, Hue S, Rosenthal E, Cohen P, et al. Influence of HLA-DR phenotype on the risk of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2118-24.
41. Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 39-42.
42. Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G. HCV infection and extra-

- hepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1149-54.
43. Lenzi M, Frisoni M, Mantovani V, Ricci P, Muratori L, Francesconi R, et al. Haplotype HLA-B8-DR3 confers susceptibility to hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1998; 91: 2062-6.
 44. Hwang SJ, Chu CW, Huang DF, Lan KH, Chang FY, Lee SD. Genetic predispositions for the presence of cryoglobulinemia and serum autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens* 2002; 59: 31-7.
 45. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, Monti M, La Civita L, Carecchia G, et al. Hepatitis C virus genotype analysis in patients with type II mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1996; 124: 31-4.
 46. Ferri C, Zignego AL. Relation between infection and autoimmunity in mixed cryoglobulinemia. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 53-60.
 47. Ghinoi A, Mascia MT, Puccini R, Ferri C. Autoimmune and lymphoproliferative HCV-correlated manifestations: example of mixed cryoglobulinaemia. *G Ital Nefrol* 2004; 21: 225-37.
 48. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 47-56.
 49. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Ferrari SM, Ghinoi A, Mascia MT, et al. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus: the thyroid disorders. *Recenti Prog Med* 2005; 96: 370-81.
 50. Broussolle C, Steineur MP, Bailly F, Zoulim F, Trepo C. Hepatitis C virus infection and thyroid diseases. *Rev Med Interne* 1999; 20: 766-73.
 51. Huang MJ, Tsai SL, Huang BY, Sheen IS, Yeh CT, Liaw YF. Prevalence and significance of thyroid autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: a prospective controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 50: 503-9.
 52. Antonelli A, Ferri C, Pampana A, Fallahi P, Nesti C, Pasquini M, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med* 2004; 117: 10-3.