

BAZELE EPIDEMIOLOGICE ȘI MOLECULARE ALE IMPLICĂRII VIRUȘURILOR HEPATICE B ȘI C ÎN ETIOPATOGENIA LIMFOPROLIFERARILOR CRONICE

Epidemiological and molecular bases of the implication of hepatitis B and C viruses in the etiopathology of chronic lymphoproliferations

Victoria Aramă, Violeta Molagic, Sorin Ștefan Aramă,
Ana Maria Vlădăreanu, Raluca Mihăilescu, Mihaela Rădulecu,
Alexandru Rafila, Sergiu Costoiu, Maria Marza, Camelia Dobrea,
Alexandru Rafila, Nicoleta Irimescu

REZUMAT

Carcinomul hepatocelular (CHC) corelat infecției cu VHB reprezintă a 2-a cauză de deces prin cancer, după tutun. VHB crește de 200 de ori riscul de CHC. Carcinomul hepatocelular asociat cirozei hepatice survine cu un risc anual de 2-5% dar și purtătorii cronici de VHB pot evolua către CHC cu un risc anual de 0,5%. (47, 48)

Bolile cronice extrahepatice asociate infecției VHB și VHC aparțin în special bolilor autoimune și sindroamelor limfoproliferative cronice. Prevalența infecției VHB la pacienții cu limfoame maligne non-Hodgkiniene (LMNH) este cuprinsă între 3-30%.

Prevalența infecției cu VHC la pacienții cu LMNH cu celulă B sau alte limfoproliferări cronice este cuprinsă între 8-32%. (47)

Cuvinte cheie: virusurile hepatice, VHB, VHC

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) correlated with HBV infection is the 2nd cancerous death cause, after smoking. HBV increases HCC risk 200 times. Hepatocellular carcinoma associated with hepatic cirrhosis appears with an annual risk of 2-5%, but the HBV infected persons may also evolve towards HCC with an annual risk of 0,5%. (47, 48)

Extrahepatic chronic diseases associated with HBV and HCV infection belong mainly to the autoimmune diseases and chronic lymphoproliferative syndromes. HBV infection prevalence to the patients with malignant non-Hodgkinian lymphoma (MNHL) ranges between 3-30%.

HCV infection prevalence in patients with NHML B cell or other cronical limfoprolifertions ranges between 8-32%.

Key words: hepatitis viruses, HBV, HCV

La nivel mondial, infecția cu virusurile hepatice B și C (VHB și VHC) reprezintă o importantă problemă de sănătate publică, mai ales în țările în curs de dezvoltare. Se estimează că VHB afectează 5% din populația mondială (400 milioane persoane), iar VHC 3% din populația globului (170 milioane persoane), existând mari variații de seroprevalență între diferite grupuri populaționale din cadrul aceleiași regiuni geografice (1). În Europa, prevalența globală a infecției VHC este de 1-2%, crescând de la nord la sud. Astfel țările scandinave au în general o prevalență de sub 0,5%,

în timp ce în țările mediteraneene ea depășește 2%. (1).

Infecția cu VHB și VHC evoluează frecvent către hepatită cronică, ciroză hepatică, carcinom hepatocelular și deces. În ultimele decenii însă, VHB și VHC au fost implicate etiopatogenia a tot mai multe patologii extrahepatice din grupul bolilor autoimune și sindroamelor limfoproliferative.

Conform ultimelor statistici OMS, România ocupă unul din primele locuri la mortalitatea cauzată de hepatitele cronice virale, înregistrându-

Adresa de corespondență:

Dr. Victoria Aramă, Institutul de Boli Infecțioase „Prof. Dr. Matei Balș”, Strada Calistrat Grozovici, Nr. 1, Sector 2, București

se 30 decese/1 milion de locuitori, în condițiile în care media europeană este de numai 2,4 decese/1 milion de locuitori (41).

România este încadrată de OMS în zonele cu endemicitate intermediară pentru VHB. Se estimează că în țara noastră prevalența infecției VHB este cuprinsă între 5-8%, iar a VHC între 5-6% (2,3,4). Studii pe loturi restrânse au arătat că în România predomină genotipul 1b de VHC (4), neexistând însă date asupra genotipurilor de VHB și VHD. Conform CDC, România este inclusă în zonele cu prevalență ridicată pentru infecția VHD (5), existând însă puține date asupra prevalenței reale a acestei infecții.

Deși la nivel mondial incidența infecției cu VHB este în scădere ca urmare a extinderii utilizării vaccinării anti-VHB, ea continuă să fie totuși o importantă problemă de sănătate publică datorită riscului de cronicizare și de evoluție către ciroză hepatică și carcinom hepatocelular, precum și datorită implicării VHB în etiopatogenia a tot mai multe boli cronice extrahepatice.

Carcinomul hepatocelular (CHC) corelat infecției cu VHB reprezintă a 2-a cauză de deces prin cancer, după tutun. VHB crește de 200 de ori riscul de CHC. Carcinomul hepatocelular asociat cirozei hepatice survine cu un risc anual de 2-5% dar și purtătorii cronici de VHB pot evolua către CHC cu un risc anual de 0,5%. (47, 48)

Bolile cronice extrahepatice asociate infecției VHB și VHC aparțin în special bolilor autoimune și sindroamelor limfoproliferative cronice. Prevalența infecției VHB la pacienții cu limfoame maligne non-Hodgkiniene (LMNH) este cuprinsă între 3-30%.

Prevalența infecției cu VHC la pacienții cu LMNH cu celulă B sau alte limfoproliferări cronice este cuprinsă între 8-32 %. (47)

Limfoamele maligne non-Hodgkinine (LMNH) sunt neoplazii care afectează de obicei limfocitele B (LB). În ultimul deceniu incidența lor a crescut alarmant, cu cel puțin 5% pe an. În cadrul neoplaziilor, LMNH ocupă locul 5 din punct de vedere al incidenței globale și locul 3 din punct de vedere al ritmului de creștere a incidenței (6). În paralel, se constată o creștere a mortalității prin LMNH, apreciată în USA la 2% pe an. În țările industrializate, LMNH reprezintă a 7-a cauză de deces (6). Majoritatea LMNH debutează la nivel ganglionar, dar în ultimele decenii s-a remarcat o creștere a incidenței limfoamelor extraganglionare.

Implicarea virusurilor EBV, HIV, HTLV și HHV8 în etiopatogenia LMNH este confirmată și bine documentată. VHB și VHC au fost mai recent

asociate cu limfoproliferările cronice (LC), iar mecanismele intime ale inducerii limfoproliferării de către aceste virusuri sunt insuficient cunoscute.

TROPISMUL EXTRA-HEPATIC AL VIRUSURILOR HEPATITICE

VHB este un virus ADN din familia *Hepadnaviridae*, care are nevoie pentru replicarea genomului de o transcriptază inversă, similar retrovirusurilor. VHB are un tropism primordial hepatic, demonstrat prin prezența predominantă a ADN-VHB și a antigenelor virale în hepatocitele infectate. El nu are efect citopatogen direct, leziunile hepatice fiind rezultatul conflictului între răspunsul imun citotoxic și hepatocitul infectat. VHB are capacitatea de a persista indefinit în celulele infectate și de a se integra în genomul celulei gazdă, fapt care se traduce clinic prin evoluția către hepatită cronică, ciroză hepatică și carcinom hepatic după 10-30 ani. Din această cauză infecția VHB continuă să fie o importantă problemă de sănătate publică.

Numeroase studii (9,11) au demonstrat prezența unor cantități mici de ADN-VHB non-replicativ sau de antigene virale în mononuclearele din sângele periferic (monocite, limfocite B, limfocite T CD 4 și CD8) și mai rar în polimorfonucleare (49,50,51,52,53). Aceste observații sugerează că limfocitele pot reprezenta un rezervor viral extrahepatic, care permite reinfectarea grefei hepatice la bolnavii transplantați pentru ciroză hepatică cu VHB. In vitro, pe un model de hepatită la marmotă s-a demonstrat că stimularea limfocitelor infectate a condus la producerea de virioni infecțioși (49). S-a observat că structura ADN-ului VHB izolat din limfocite este diferită de a celui extras din hepatocite (49). Nu se cunoaște mecanismul prin care genomul VHB persistă și se replică în limfocitele umane (49). Studii recente (10) au demonstrat prezența de ADN-VHB „aberrant” în mononuclearele sanghine, ceea ce sugerează o replicare aberantă (50). La marmotă, stimularea cu agenți mitogeni a unei culturi de limfocite infectate cu WHV (*woodchucks hepatitis virus* – virus înrudit cu VHB) a dus la activarea replicării virale (50). La bolnavi infectați cronic cu VHB, a fost identificat ADN-VHB în culturile efectuate din măduvă hematogenă (50). Totodată este documentată replicarea VHB și în țesuturi extrahepatice, inclusiv în ganglionii limfatici și măduva osoasă. Cele mai frecvente manifestări extrahepatice întâlnite în infecția cronică cu VHB sunt: periarterita nodoasă, glomerulonefrita

membranoasă cronică, vasculita leucocitoclastică, eritem nodos, artrite (mai ales în infecția acută cu VHB), sindrom Raynaud, polineuropatii, sindrom Guillain Barre, pericardite și pancreatite (11). Prezența crioglobulinelor a fost remarcată la 15% din pacienții cu infecție cronică VHB. VHC este un virus ARN din familia *Flaviviridae*, genul *Hepacavirus* și are un tropism predominant hepatic. El este însă capabil să infecteze și să se replice și în celulele hematopetice. Flavivirusurile sunt capabile să infecteze celule limfoide asociindu-se cu tulburări hematologice severe:

neutropenii, trombocitopenii etc. (34). Totodată, în ultimii ani, numeroase studii au asociat infecția VHC cu crioglobulinemiile mixte esențiale și limfoamele non-Hodgkiniene (34). În același timp, din perspectiva teoriei după care celulele hematopetice pot vehicula infecția VHC de la un organism la altul, numeroase studii au demonstrat prezența ARN VHC în limfocitele T, limfocitele B și monocitele pacienților cu hepatită cronică VHC (34,47). În tabelul 1 este prezentată sinteza rezultatelor acestor studii citate în literatura (34).

Tabelul 1. Detecția de secvențe genomice VHC prin PCR în diferite eșantioane biologice – sinteză a datelor din literatură (34)

ARN-VHC	Ser		Ficat		MN periferice		MN medulare	
	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg	Poz	Neg
Nr. publicații	24	14	8	6	26	21	5	3
Nr. pacienți studiați	472	209	120	85	443	303	52	27
% pacienți la care s-a decelat VHC	50-100	0-100	96-100	44-100	9-100	0-100	0-100	0-45
Rata medie de detecție VHC	87%	27%	99%	85%	74%	41%	49%	21%

Pozitiv/Negativ = tipul lanțului de ARN VHC decelat; MN = mononucleare

Navas S și colaboratorii au demonstrat că quasispeciile detectate în mononuclearele din sângele periferic sunt genetic mai apropiate de cele detectate în hepatocit, față de cele detectate în ser (54). Alte studii au arătat că unele quasispecii limfocitotrope se replică mai bine în limfocit decât în hepatocit (55). Variantele limfocitotrope au niște mutații în regiunea 5'UTR, care stimulează replicarea virală în culturi de celule limfoide și nu în hepatocit (47). ARN VHC a fost identificat și în leziunile cutanate ale pacienților cu vasculită crioglobulinemică asociată infecției VHC (47). Analiza ARN VHC prin PCR nu poate stabili dacă secvența genomică amplificată provine de la particule infecțioase sau non-infecțioase. În cursul replicării VHC se sintetizează un ARN-intermediar numit ARN-negativ. Decelarea acestui ARN-negativ reprezintă la ora actuală singura dovadă pentru replicarea activă a virusului într-un țesut sau celulă (34). Unele studii au arătat prezența de secvențe ale ARN VHC în până la 60% din limfocitele B (34). Alte studii au evidențiat prezența lanțului pozitiv al ARN VHC în granulocite, monocite-macrofage și în celulele NK. În aceste cazuri a fost imposibil de diferențiat dacă este vorba de o infecție veritabilă a celulei sau de prezența pasivă a unor particule virale captate prin fagocitoză (47). Ulterior, s-a demonstrat chiar prezența lanțului negativ al ARN VHC în granulocite și monocite-macrofage, care dovedește o infecție replicativă în aceste celule (47). Studii recente sugerează că ar putea exista

un tropism preferențial al unor genotipuri sau subtipuri de VHC pentru celulele hematopetice (47). Astfel, genotipul majoritar decelat în mononuclearele periferice este 1a și 1b, fapt care ar putea explica rezistența crescută la terapia cu interferon a pacienților infectați cu acest subtip. Este greu de spus dacă este vorba despre un veritabil tropism legat de genotip, bazat pe diferența de secvențe proteice virale care condiționează penetrarea virusului în celulă sau de o selecție a genotipurilor în timpul replicării virale intracelulare (47). **În ultimii ani, numeroase publicații au subliniat asocierea relativ frecventă între infecția VHC și diverse anomalii imunologice. Prevalența autoanticorpilor și anomaliilor imunologice este mai mare la pacienții cu hepatită cronică VHC, față de bolnavii cu alte hepatopatii, ceea ce sugerează că VHC ar putea interveni în mod direct sau indirect în patogenia acestor tulburări disimunitare. Majoritatea datelor actuale provin din studii epidemiologice (statistice), existând puține date referitoare la mecanismele patogenice ale acestor tulburări. Fenomene disimunitare întâlnite în infecția cronică cu VHC pot fi nespecifice (aparitia factorului reumatoid, complexelor imune sau crioglobulinelor) sau specifice (aparitia de autoanticorpi specifici sau nonspecifici de organ). Prezența autoanticorpilor la pacienții cu infecție cronică VHC variază între 5-20% (56), fiind semnificativ mai mare decât la donorii de sânge (1-4%).**

IPOTEZE ACTUALE ASUPRA MECANISMELOR MOLECULARE ALE IMPLICĂRII VHB ÎN ETIOPATOGENIA LIMFOPROLIFERĂRILOR CRONICE

VHB poate persista indefinit în celulele infectate, putându-se integra în genomul celulei gazdă. Numeroase studii au demonstrat prezența de ADN-VHB în mononuclearele periferice (6), precum și capacitatea lui de a se replica în ganglionii limfatici și măduva osoasă (9,10,11). Prevalența infecției VHB la pacienții cu LMNH variază între 3-30% (12,13). O sinteză a rezultatelor principalelor studii publicate este prezentată în **tabelul 2**.

Tabelul 2 – Sinteza a rezultatelor principalelor studii publicate referitoare la prevalența infecției VHB la bolnavii cu LMNH

Țara	Nr. pacienți cu LMNH	Seroprevalența	Autor, an
Coreea	222	12,6%	Kim, 2002 (14)
Japonia	348	6,9%	Kuniyoshi, 2001 (12)
Hong-Kong	484	22%	Liang, 1990 (12)

Kim JH (14) a efectuat un studiu în Coreea pe un lot de 222 pacienți cu LMNH, urmărind implicarea VHB în limfoproliferari. Au fost studiate 2 loturi martor: lotul 1 alcătuit din 439 pacienți cu afecțiuni maligne non-hematologice și lotul 2 alcătuit din 444 pacienți cu afecțiuni non-maligne. În cazul pacienților cu LMNH, prevalența infecției VHB a fost de 12,6% față de 7,3% în lotul 1 și 4,7% pentru lotul 2. S-a estimat că riscul de LMNH este de 2-3 ori mai mare la pacienții cu infecție cronică VHB față de cei AgHBs negativi. Autorii au enunțat 3 ipoteze privind asocierea infecției VHB cu LMNH: a) Riscul de infecție virală sau de reactivare virală este crescut datorită efectului imunosupresiv direct al limfomului; b) VHB însuși poate fi răspunzător de limfomogeneză; c) Implicarea unui alt virus care posedă un mod de transmitere similar cu al VHB. Prezența unor secvențe de AND-VHB în mononuclearele periferice și în celulele tumorale hematopoetice la pacienții cu AgHBs prezent a permis emiterea ipotezei că persistența VHB în mononuclearele periferice poate produce o stimulare cronică a celulelor B, care antrenează dezvoltarea LMNH cu celula B. Într-un studiu publicat în 1990 de Liang (57), efectuat pe un lot de 484 de pacienți cu LMNH din Hong Kong, s-a raportat o prevalență de 22% a infecției cu VHB. În lotul studiat, cazurile de LMNH asociat infecției VHB au fost mai numeroase la tineri. În studiile

publicate în anul 1997 de Kumagai (58) și în 1999 de Markovic (59) s-a raportat o prevalență a infecției cronice VHB de 3,2% în Japonia și în Slovacia, prevalență fiind mai mare decât cea din populația generală a fiecărei țări. Într-un alt studiu publicat în 2001 de Kuniyoshi (60) s-a evaluat prevalența infecției VHB și/sau VHC la 348 de pacienți cu LMNH. În 14,9% dintre cazuri (37 pacienți) au fost identificați markeri serologici pozitivi pentru VHB sau VHC. Dintre aceștia, 8,1% din cazuri (20 pacienți) erau infectați cu VHC și 6,9% dintre cazuri (17 pacienți) aveau AgHBs prezent. La pacienții de sex masculin, rata infecției cu VHC a fost semnificativ mai mare ($p < 0.001$) decât în populația generală. De asemenea, rata infecției cu VHB tinde să fie mai mare decât în populația generală ($p = 0.0551$).

IPOTEZE ASUPRA MECANISMELOR MOLECULARE ALE IMPLICĂRII VHC ÎN ETIOPATOGENIA LIMFOPROLIFERĂRILOR CRONICE

VHC este un virus hepatotrop și limfotrop, fiind capabil să infecteze limfocitele periferice prin intermediul receptorului CD81. Proteina virală de envelopă E2 conține situsul de legare cu CD81, care este considerat receptorul pentru VHC atât la nivel hepatocitar, cât limfocitar (5). Infecția cronică VHC se asociază cu alterarea funcției LB, care va produce autoanticorpi, crioglobuline și va prolifera clonal (16,17,18,19). Clona limfocitară B proliferează în principal în măduva osoasă și ficat, având risc crescut de transformare malignă (16,20,21). Se consideră că aceste anomalii reflectă stimularea cronică a LB de către de proteina virală E2 (19,20).

Zignego (33) a arătat în 2002 că VHC activează calea antiapoptotică prin inducerea translocației *t* (14;18), care activează gena *bcl2*. Astfel, gena *bcl2* este adusă în apropierea genei lanțului greu de Ig (IgH). S-a remarcat o frecvență crescută a LB monoclonale, care exprimă aceeași rearanjare a lanțului greu de Ig. Rearanjarea genei *bcl2* (prezentă la 75% din pacienții cu LC și infecție VHC) dispăre sub terapie antivirală (33).

Asocierea dintre infecția VHC și LMNH a fost pentru prima dată descrisă în 1994 de Ferri C (22,23), care a evidențiat că 32% dintre pacienții cu LMNH cu celula B (LMNH-B) au markeri de infecție cu VHC. În Germania (24), prevalența infecției VHC la pacienții cu LMNH-B a fost de 4,3%, iar în Franța (25) de numai 1,8%. Majoritatea studiilor a arătat că seroprevalența VHC este semnificativ mai mare la pacienții cu LMNH decât

în populația generală, dar există și țări unde această asociere nu a fost confirmată. O sinteză a datelor publicate până acum asupra seroprevalenței

infecției VHC la pacienții cu LMNH este prezentată în tabelul 3 (6,25).

Tabelul 3 – Sinteza a datelor publicate asupra seroprevalenței infecției VHC la pacienții cu LMNH

Țara	Nr. pacienți cu LMNH	Prevalența VHC la bolnavii cu LMNH (%)	Lot martor (nr. pacienți)	Prevalența VHC la lotul martor (%)	Autor, an
USA	120	22	114	5	Zukermann, 1997
USA	312	11,5	ND	ND	Kashyap, 1998
Italia	199	28,6	6,917	2,87	Mazzoro, 1996
Italia	115	32	70	0	Zugnega, 1995
Italia	175	37	175	10	Vallisa, 1999
Italia	91	23	1568	1,9	De Rosa, 1997
Japonia	54	22,2	ND	ND	Izumi, 1996
Brazilia	109	9	98	2	Chindamo, 2001 (37)
Egipt	227	42	227	ND	Cowgill, 2004 (26)
Italia	400	17,5	ND	ND	Mele, 2003 (27)
Japonia	348	8,1	ND	ND	Kuniyshi, 2001 (12)

LMNH asociate infecției VHC afectează mai ales LB, predominând formele extraganglionare (hepatosplenice, salivare, cardiace) și formele cu grad mic de malignitate (37,31). Imunocitomul (limfoplasmocitomul), limfomul MALT, limfomul difuz cu celulă mare, limfomul de zona marginală și limfomul splenic cu celule vilozite reprezintă formele de limfom cel mai frecvent asociate infecției VHC (6,18,28,29). Cea mai puternică asociere cu infecția cronică cu VHC este la subșetul de pacienți cu imunocitom, afecțiune hematologică cu grad de malignitate scăzut asociat inițial cu crioglobulinemia (46).

Identificarea subtipului VHC are implicații clinice și biologice la pacienții cu limfoproliferari B. Tipurile 1b și 2 au fost singurele genotipuri virale

detectate la pacienții cu LMNH, iar dintre acestea un rol patogen major îl are subtipul 2c.

Există studii (37,31) care au arătat asocierea dintre infecția VHC și LMNH cu grad scăzut de malignitate. VHC a fost detectat la 9% dintre pacienții cu LMNH, la 2% dintre persoanele din grupul martor și la 1,2% dintre donatorii de sânge. Acest studiu nu a arătat o diferență majoră a prevalenței VHC la pacienții cu LMNH cu celula B față de cei cu LMNH cu celulă T. Transfuzia de sânge sau intervențiile chirurgicale (ambele factori de risc pentru infecția VHC) au fost detectate la 90% dintre pacienții cu infecție VHC, aceste antecedente fiind localizate în timp în medie cu 15-17 ani înainte de a se stabili diagnosticul de LMNH.

Tabelul 4. Caracteristicile pacienților și prevalența infecției cu VHC în cele 3 loturi: LMNH, pacienți transfuzați și lotul martor (37,31)

Caracteristica	LMNH	Lot martor	Donatori de sânge
Număr de persoane	109	98	39.371
Sex			
Masculin	57 (52%)	47 (48%)	
Feminin	52 (48%)	51 (52%)	
Vârsta (mediana)	50 (13-84)	44 (12-79)	40
Imunofenotipare			
Celula B	87 (980%)		
Celula T	22 (20%)		
Prevalența infecției cu VHC	9%	2%	1,2%
Prevalența infecției VHC în funcție de subtipul de LMNH			
Imunofenotiparea LMNH			
Celula B	8/87 (9%)		
Celula T	2/22 (9%)		
Clasificarea REAL			
Difuz cu celula mare	3/32		
Limfoplasmocitoid	2/11		
Folicular	1/19		
Celula T	1/11		
Limfoblastic	1/11		
Difuz cu celula mică	1/9		
Manta	1/4		
Boala Hodgking	1/67 (1,5%)		
Leucemie limfocitară cronică	1/31 (3%)		

Alte studii au detectat prezența infecției VHC la 30% din pacienții cu imunocitoame (60). Majoritatea imunocitoamelor asociate cu VHC prezintă *crioprecipitate IgM cu activitate de factor reumatoid, precum și afectare hepatică și renală*. S-au remarcat mari similitudini între imunocitomul asociat VHC și crioglobulinemia mixtă esențială (CME) asociată VHC, ceea ce sugerează că terapia antivirală cu interferon ar putea avea un efect benefic în imunocitoame (60). Se pare că VHC induce imunocitomul printr-un mecanism indirect (similar cu *Helicobacter pylori* în limfomul MALT) deoarece el nu se poate integra în genomul celulei gazdă, nu posedă reverstranscriptază și nici oncogene. Se pare că VHC stimulează proliferarea policlonală a unor clone transformate neoplazic de stimuli oncogeni (60). Asocierea imunocitom – infecție VHC a fost demonstrată și de un alt studiu efectuat de Jose M Domingo în Spania în 1998 (58).

Virusul hepatitic C a fost implicat și în patogenia unor LNH extranodale – în primul rând LNH hepatice și LNH care apar secundar sindromului SICCA (LNH de glande salivare).

Afectarea extranodală ca primă determinare de boală a caracterizat majoritatea cazurilor luate în studiu (28). Dintre determinările extranodale cele mai frecvente au fost ficatul și glandele salivare. S-a formulat o ipoteză potrivit căreia la pacienții cu LMNH cu celula B infectați cu VHC există o mare pondere a determinărilor extranodale nespecifice. Atât ficatul cât și glandele salivare sunt ținte ale virusului VHC care poate infecta și se poate replica activ atât în hepatocit, cât și în celulele epiteliale ale glandelor ductale și acinare. (28)

Pentru că în mod tipic celule nonlimfoide sunt infectate de VHC și pentru că în alte determinări extranodale stimularea sistemului limfocitar de către un antigen exogen a fost relatată în dezvoltarea unui LMNH, s-a formulat ipoteza că în patogenia LMNH este incriminat rolul local al VHC ca *trigger* exogen al limfoproliferării LB. Rolul VHC în oncogeneza prin infecție directă și dereglare a funcției celulelor B nu este susținut în prezent prin date concrete.

Tabelul 5 – Determinările extranodale la pacienții cu LMNH în momentul prezentării (61)

Locul determinării extranodale	Pacienți VHC negative (%) (n = 113)	Pacienți VHC pozitivi (%) (n = 37)
Măduva osoasă	27	29
Splina	16	5
Tract gastrointestinal	9	3
Inel Waldeyer	8	3
Sân	3	0,8
Ficat	2	0,8
Piele/țestu subcutanat	2	0,8
Conjunctive	0,8	–
Testicul	0,8	–
Plămâni	0,8	–

INTERRELAȚIA DINTRE VHC – CRIOGLOBULINEMIE – LMNH

Infecția VHC se asociază frecvent cu crioglobulinemia mixtă esențială (CME), afecțiune cronică autoimună, în care are loc proliferarea LB, fapt ce precede apariția LMNH-B (30).

Crioglobulinele sunt decelate la peste 50% dintre pacienții seropozitivi pentru VHC, iar dintre acestia numai 1-2% vor dezvolta o forma simptomatică de CME (47). Aceasta sugerează implicarea unor factori genetici ai gazdei. (47). Numeroase studii au arătat că 50-75% dintre pacienții cu CME prezintă anticorpi anti VHC (62,56) Analiza moleculară a decelat ARN VHC la 50% dintre pacienții cu CME seronegativi pentru VHC (62).

Argumentele care susțin **rolul VHC în apariția CME** sunt sugerate de următoarele observații (6,21,34):

- concentrația de ARN-VHC în crioprecipitat este de 10-1000 de ori mai mare decât în supernatant. Crioprecipitatul conține antigenele virale și anticorpii omologi.
- este documentată o replicare anormală a VHC în limfocite.
- toate genotipurile VHC cunoscute au fost identificate în criocomplexe, dar mai frecvent întâlnit a fost tipul 1b sau 2a (63)
- în complexe imune s-a evidențiat că IgG de care se leagă IgM cu efect de FR, direcționate împotriva Ag virale de suprafață, dar și a celor mascate de capsidă.
- proteinele virale au fost identificate în țesuturile afectate de vasculita crioglobulinemică.
- diminuarea concomitentă a viremiei VHC serice și în crioprecipitate după tratamentul cu interferon (64).

- crioglobulinele sunt decelate la peste 50% dintre pacienții seropozitivi pentru VHC, iar dintre aceștia numai 1-2% vor dezvolta o formă simptomatică de CME (47). Aceasta sugerează implicarea și a unor factori genetici ai gazdei (47).

În zona Mediteraneană, datorită prevalenței mari a VHC, majoritatea cazurilor de CME sunt VHC pozitive.

Au fost raportate concentrații semnificative de ARN viral în celulele B-CD19 pozitive și în celulele stem hematopoetice pluripotente CD34 pozitive.

Datele existente în literatură indică faptul că până la 56% dintre pacienții cu CME și infecție VHC prezintă morfologie anormală a măduvei (agregate limfoide focale sugestive de limfom – 44%, sau limfom non-Hodgkinian – 13%) și elemente de diagnostic prin *flow cytometrie* de limfom non-Hodgkinian cu celulă B. Mecanismele celulare și moleculare ce mediază progresia cioglobulinemiei la limfom rămân încă necunoscute deși se pare că la pacienții infectați cronic cu VHC asociind crioglobulinemie, un rol important în acest proces îl are *over* – expresia bcl-2, rearanjamentul bcl-2 și translocția t (14:18) (45).

Se consideră că CME tip II echivalează cu un limfom cu grad mic de malignitate. Se estimează că 50-80% dintre cazurile de CME sunt asociate infecției cu VHC (6,21).

În plus, se pare că VHC determină producerea unei reglări aberante a celulelor B corelată cu o incidență crescută a limfoamelor non-Hodgkiniene cu celule B. Această asociere a fost evidențiată de o serie de studii efectuate în Japonia și Italia, zone cu prevalență crescută a infecției cu VHC. Asocierea nu a fost confirmată însă de studiile desfășurate în țări cu prevalență scăzută a infecției cu VHC cum ar fi SUA și unele state europene.

În 1994, *Pozzato G* (31) a raportat că incidența globală a LMNH-B la pacienții cu viremie VHC și CME este de 38,7%.

Silvestri F (32) a raportat în 1994 că în Italia 19,1% (434/2275) dintre cazurile de LMNH-B au anticorpi anti-VHC+, iar 41,2% dintre pacienți aveau crioglobuline prezente.

La pacienții cu CME, s-a observat o replicare anormală a VHC în limfocite. În criocomplexe, mai frecvent întâlnit a fost genotipul 1b și 2a (33). CME asociată VHC se caracterizează prin proliferarea unei clone de LB, evidențiată prin

flow-citometrie în măduva osoasă.

De Re (20) a demonstrat că celulele producătoare de factor reumatoid (FR) sunt în special cele care determină degenerarea malignă. Proteina virală E2 este un stimul antigenic cronic, care induce inițial un răspuns imun policlonal, care devine ulterior oligoclonal prin emergența unei clone de IgM-FR. La bolnavii cu LMNH s-a observat o compatibilitate între receptorul limfocitar BCR și anticorpii cu rol de FR din CME, ceea ce sugerează implicarea unui antigen comun în CME și LMNH. Compatibilitatea dintre CDR (zonă hipervariabilă a BCR) și anticorpii anti-E2 susține ipoteza că proteina E2 este un stimul antigenic cronic implicat atât în procesul limfoproliferativ, cât și în producerea de anticorpi cu rol de FR.

Quinn E (17) a demonstrat că în LMNH-B asociate VHC, limfoproliferarea este antigen-dependentă și a evidențiat compatibilitatea dintre receptorul limfocitar BCR și proteina E2. Anticorpii anti-E2 sunt codificați de aceleași gene ca și Ig din CME și din LMNH (VH, Vk).

În cazul CME s-a demonstrat că negativarea viremiei VHC este urmată de scăderea limfoproliferării. Terapia antivirală are ca efect dispariția LB monoclonale și reduce probabil riscul transformării maligne.

În 2004, *Vallisa D* (35), a evaluat impactul terapiei antivirale asupra evoluției LMNH-B cu grad mic de malignitate. Un lot de 13 pacienți cu infecție VHC și LMNH-B a primit numai terapie antivirală cu Peginterferon alfa și ribavirină. În 60% dintre cazuri s-a obținut remisiune hematologică completă, care s-a corelat cu clearance-ul VHC sub terapia antivirală. Au fost citate cazuri de LMNH refractare la chimioterapia standard, dar care au răspuns la terapia antivirală (35).

Sunt necesare studii mai ample în vederea evaluării impactului terapiei antivirale asupra evoluției și prognosticului LMNH.

În România, relația dintre virusurile hepatitice și limfoproliferări a fost puțin studiată. Într-un studiu publicat în 1999 de către *Cucuianu A* (7) s-a raportat că prevalența infecției VHB și VHC la pacienții cu LMNH este semnificativ mai mare decât în populația generală. Din cei 68 de pacienți cu LMNH, 20 (29,5%) aveau anticorpi anti-VHC, 21 (30,8%) erau AgHBs+, iar 6 pacienți aveau dublă infecție B și C. *Munteanu C* (8) a raportat în 2002 rezultatele unui studiu efectuat pe un lot de 50 de pacienți cu LMNH, comparativ cu un lot de

6087 donatori de sânge. Prevalența anticorpilor anti-VHC la pacienții cu LMNH a fost semnificativ mai mare față de a donatorilor de sânge (22% vs 1,44%; $p < 0,001$).

CONCLUZII

La nivel mondial, infecția cu virusurile hepatice B și C (VHB și VHC) ramane o importantă problemă de sănătate publică. Deși hepatotrope, VHB și VHC au fost implicate în ultimele decenii în etiopatogenia sindroamelor limfoproliferative cronice, contribuind la creșterea mortalității și morbidității acestora. Limfotropismul lor a fost deja confirmat prin evidențierea replicării virale în mononuclearele periferice, ganglionii limfatici și măduva hematogenă. Prevalența infecției cu VHB și VHC la pacienții cu limfoproliferări cronice (LC) pare semnificativ statistic mai mare decât în populația generală. Mecanismele intime ale limfoproliferării induse de VHB și VHC sunt insuficient cunoscute. În România nu s-au efectuat până acum cercetări aprofundate în acest domeniu.

IMPLICAȚII PRACTICE

Pornind de la aceste premize, în 2007 Institutul Național de Boli Infecțioase Prof. Dr. Matei Balș din București a elaborat și câștigat un grant de cercetare în cadrul programului Parteneriate în domeniul prioritare (LIMFO-VIR, contract 41-012/2007). Este vorba despre o cercetare complexă

multidisciplinară care reunește 4 instituții medicale prestigioase (INBI Matei Balș, București, UMF Carol Davila București, Institutul Național de Cercetare Dezvoltare Victor Babeș București, Clinica de Hematologie a Spitalului Universitar de Urgență București) și 2 instituții nemedicale (ICPE București și Universitatea Politehnică București).

Obiectivele cercetării sunt: evaluarea prevalenței infecției cu VHB, VHC și VHD la pacienții cu LC; identificarea unor mecanisme moleculare implicate în geneza limfoproliferărilor; evaluarea implicațiilor terapeutice. Implicarea virusurilor hepatice va fi evaluată prin metode complexe: teste serologice; tehnici de biologie moleculară: PCR pentru determinarea viremiei; PCR in situ pentru detecție virală în țesuturi biopsiate; genotipare virală. Se va încerca identificarea unor receptori pentru antigenele virale la nivel limfocitar.

Rezultatele așteptate: estimarea prevalenței infecției cu VHB, VHC și VHD la pacienții cu LC și a genotipurilor mai des implicate; perfectarea unor tehnici de diagnostic molecular nefolosite până acum în România; identificarea unor mecanisme moleculare prin care VHB și VHC generează LC; definirea unor markeri biologici de diagnostic precoce în LC; definirea unor implicații terapeutice și prognostice. Rezultatele vor fi diseminate către mediului medical și academic din țară și străinătate și vor fi comunicate Comisiilor de Specialitate din Ministerul Sănătății în vederea optimizării protocoalelor de diagnostic și terapie în limfoproliferările cronice.

BIBLIOGRAFIE

1. Foster GR, Goldin RD – Management of chronic viral hepatitis. Second edition. 2005; 1-14.
2. Grosheide P, Van Damme P – Prevention and control of hepatitis B in the community. 1996, 2nd edition, pg. 17-26.
3. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH – Management of hepatitis B- 2000 – summary of a work shop. *Gastroenterology*, 2001; 120:1828-1853.
4. Beldescu M, Balan A, Popa R – Prevalența markerilor de hepatite virale în populația generală. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 1995; 40:101-8.
5. www.cdc.gov/hepatitis.
6. Vlădăreanu AM – Actualități în limfoamele maligne non-Hodgkiniene. Editura med. Amaltea, 2002; cap.19 : 262-272.
7. Cucuianu A, Patin M, Duma M, Basarab C, Soritan O, Bojan A, et al – Hepatitis B and C virus infection in Romania non-hodgkin lymphoma patients. *British J of Hematology*, 107; 1999, 353-356.
8. Munteanu C, Grigorescu M, Busuioc M – Prevalența Ac anti VHC pe un lot de 50 de cazuri consecutive de bolnavi cu LMNH. Probleme de tratament ale bolnavilor care prezintă asocierea LMNH-boala hepatică cronică de etiologie virală C. Trebuie tratați cu citostatice acești bolnavi? Al IX-lea Congres Național de Hematologie Clinica și Transfuzională, București, oct. 2002, volumul de rezumate, pag. 12.
9. Mason A, Wick M, White H, Perrillo R – Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 18, 781-789 (1993).
10. Stoll Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Krenner J, Kam M, Lampert F, Gerlich WH – Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *J Virol*, 71, 5399-5407 (1997).
11. Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, Combes B – Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology* 12, 187-192 (1990).
12. Kuniyoshi M, Nakamura M, Sakai H, Enjoji M, Kinukawa N, Kotoh K, Fukutomi M, Yokota M, Nishi H, et al – Hepatitis B or C virus infections and non-hodgkin's lymphoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 16, 215-219 (2001).
13. Liang R, Lok ASF, Chan TK, Todd D, Chin EKW – Hepatitis B infection in patients with lymphomas. *Hematol. Oncol*, 8, 261-270 (1990).
14. Kim J H, Bang Y J, Park B J, Taiwoo Yoo, Chul Woo Kim, Tae You Kim et al – Hepatitis B virus infection and B cell non-hodgkin's lymphoma in a hepatitis B endemic area: A case control study. *Jpn J. Cancer Res*, 93; 471-477, May 2002.
15. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S et al – Binding of hepatitis C virus to CD 81. *Science* 1998; 282 : 938-941.

16. **Ursuleac I, Coliță A, Căruntu FA** – Strategii terapeutice în limfoamele non-Hodgkin asociate infecției cu VHC. *InfoMedica* 2005, nr. 3 (133) :37-43.
17. **Quinn ER, Chan Ch, Hadlock KG, Fong SKH, Flint M, Levy S** – The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-hodgkin lymphoma binds the viral E 2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis. *Blood* 2001; 98(13): 3745-3749.
18. **Turner NC, Dusheiko G, Jones A** – Hepatitis C and B-cell lymphoma. *Annals of oncology*, 2003;14(9):1341-1345.
19. **Ni Janhua, Hembrado E, Biscaglia AM, Jacobson I, Talal AH, Butera D et al** – Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *The Journal of immunology*, 2003;170:3429-3439.
20. **De Re V, De Vita S, Marzotto A, Rupolo M, Gloghini A, Pivetta B et al** – Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non-hodgkin lymphomas suggests that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia. *Blood* 2000; 96(10): 3578-3584.
21. **Ursuleac I, Caruntu F A, Colita A** – Crioglobulinemiile în infecția cu virus hepatitic C- aspecte clinice, etiopatogenice și terapeutice. *InfoMedica*. 2005; 1(131):18-22.
22. **Ferri C, Caracciolo F, Zignego A L et al** – Hepatitis C virus infection in patients with non-hodgkin's lymphoma. *Br J Hematology* 1994; 88(2): 392-394.
23. **Ferri C, La Civita L, Monti M, Giannini C, Cecchetti R, Caracciolo F et al** – Chronic hepatitis C and B cell non-hodgkin's lymphoma. *Q J Med* 1996; 89: 117-122.
24. **Ellenrieder V, Weidenbach H, Frickhofen N, Michel D, Prummer O, Klatt S et al** – HCV and HGV in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Hematol* 1998; 28(1):34-39.
25. **Hausfater P, Cacoub P, Sterkers Y, Thibault V, Amoura Z, Nguyen L et al** – Hepatitis C virus infections and lymphoproliferative diseases: prospective study on 1576 patients in France. *Am J Hematol* 2001; 67 (3): 168-171.
26. **Cowgill KD, Loffredo CA, Eissa SAL, Mokhtar N, Hamid MA, Fahmy A, Strickland GT** – Case-control study of non-hodgkin's lymphoma and hepatitis C virus infection in Egypt. *International J of Epidemiology*, 2004; 33(5): 1034-1039.
27. **Mele A, Pulsoni A, Bianco E, Musto P, Szklo A, Sanpaolo MG et al** – Hepatitis C virus and B-cell non-hodgkin lymphoma: an italian multicenter case-control study. *Blood* 2003; 102(3): 996-999.
28. **Ascoli V, Coco F, Aetini M et al** – Extranodal lymphomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:600-609.
29. **Vallisa D, Berte R, Rocca A, Civardi G, Giangregorio F, Ferrari B et al** – Association between hepatitis C virus and non-hodgkin's lymphoma, and effects of viral infection on histologic subtype and clinical course. *Am J Med* 1999; 106(5): 556-560.
30. **De Vita S, Cosimo S, Sansonno D, Gloghini A et al** – Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection. *Blood* 1997; 90:776-782.
31. **Pozzato G, Mazzaro C, Crovatto M et al** – Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994; 84: 3047-3053.
32. **Silvestri F, Baccarani M** – Hepatitis C virus-related lymphomas. *Br J Haematol* 1997; 99:475-480.
33. **Zignego AL, Ferri C et al** – Prevalence of bcl2 rearrangement in patients with hepatitis C virus – related mixed cryoglobulinemia with or without B – cell lymphomas. *Ann InternMed* 2002; 137: 571-580.
34. **Lerat H, Inchauspe G** – Tropism extrahepatique du virus de l'hepatite C. *Virologie*, vol 1, nr. 4, 1997, 291-300.
35. **Vallisa D, Bernuzzi P, Arcaini L, Sacchi S, Callea V, Marasca R, et al** – Role of anti-hepatitis C virus (HCV) treatment in HCV related, low-grade, B-cell, non-hodgkin's lymphoma: a multicenter italian experience. *J of Clinical Oncology* 2005; 23(3): 468-473.
36. **Hermine O, Lefrere F** – HCV and lymphomagenesis- another piece of evidence (letter). *Hepatology*. Vol 36, nr. 6, 2002.
37. **Chindamo MC, Spector N, Segadas JA, Pimenta G, Vanderborcht B, Morais J C et al** – Prevalence of hepatitis C infection in patients with non-hodgkin's lymphoma. *Oncology Reports* 2002; 9: 657-659.
38. **Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B et al** – Comparison of the DNA extraction methods for PCR amplification from formalin fixed and paraffin embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 10(4); 265-271, 2001
39. **Hsu SM, Rainel L si Fanger H** – Use of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *JHistochemCytochem* 1981, 29: 577-580
40. **Bussolati G si Gugliotta P** – Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC), *J Histochem Cytochem* 1983, 31: 1419-1421
41. www.data.euro.who.int
42. **Iancu LS, Macovei O, Tourle C, Beadsworth A., Duca M** – The prevalence of anti-hepatitis C virus antibodies in children from social assistance units in the country of Iasi. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 1996 Jul – Dec: 100 (3-4): 109-13
43. **Molnar GB, Popa S, Jebeleanu L, Damian C** – A prevalence study of serum markers in hepatitis virus infection in the epidemiological anamnesis of the population. *Bacterial Virusol Parazitol Epidemiol*. 1994 Jul –Dec; 39 (3-4):141 -50
44. **Azoicai D, Ivan A, Carasievici E, Luca V et al** – The prevalence of the owner of serologic markers for the hepatitis C virus, in a north – eastern territory of Romania. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2001 Jan-Mar. 105(1):127-31
45. **Kitay-Cohen Y, Amiel A, Hilzenrat N, Buskila D, Ashur Y, Fejgin M, Gaber E, Safadi R, Tur-kaspa R, Lishner M** – Bcl-2 rearrangement in patients with chronic hepatitis C associated with essential mixed Cryoglobulinemia type II. *Blood* 2000; 96(8) : 2910-2912.
46. **Silvestri F, Barillari G, Fanin R, Salmasso F, Pipan C, Falasca E, Puglisi F, Mariuzzi L, Zaja F, Infanti L et al** – Impact of hepatitis C virus infection on clinical features, quality of life and survival of patients with lymphoplasmacytoid lymphoma/ immunocytoma. *Annals of Oncology* 1998; 9: 499-504
47. **David L Thomas, Stanley M Lemon** – Hepatitis C. Chapter 143 in Principles and practice of infectious diseases; fifth edition (2000), pag 1736 – 1760.
48. **Kumagai K, Takagi T, Nakamura S, Sawada U, Kura Y, Kodama F et al** – Hepatitis B virus carriers in the treatment of malignant lymphoma: an epidemiological study in Japan. *Ann Oncol* 8 (suppl 1), S107-S109 (1997).
49. **Zoulin F, Treop C** – Virus de l'hepatite B: replication et mecanismes d' action des antiviraux. *Virologie*, vol 1, nr. 3, mai-juin 1997, pag 197-215
50. **William S Robinson** – Hepatitis B and Hepatitis D virus. Chapter 135 in Principles and practice of infectious diseases; fifth edition (2000), pag 1652-1685.
51. **Romet-Lemone JL** – Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastic cells. *Science* 1993; 221:667-669.
52. **Lie-Injo LE, Lopez CG et al** – Hepatitis B virus DNA in liver and white blood cells of patients with hepatoma. *DNA*, 1993;2: 301-308.
53. **Bouffard P, Lamelin JP et al** – Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 1990; 31: 312-317.
54. **Navas S, martin J et al** – genetic diversity and tissue compartmentalization of de HCV genom in blood mononuclear cells, liver and serum of the chronic hepatitis C patients. *J virol* 1998; 72:1640-1646.
55. **Shimizu YK et al** – Sequence analysis of the hepatitis C virus genom recovered from serum, liver and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J virol*. 1997; 71: 5769-5773.
56. **Lunel Fabiani Fr** – Les manifestations auto-immunes de l'hepatite chronique C. *La Gazette de la Transfusion*, nr 129, decembrie 1996, pag 30-35.
57. **McColl et al** – The role of HVC in aetiology of non-Hodgkin's lymphoma – a regional association? *Leukemia & Lymphoma* 1997; 26 (1-2): 127-130.
58. **Jose M Domingo et al** – Hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia in patients with lymphoproliferative diseases. *J of Hemato*, vol 84, nr 1, january 1999, pag 94-95.
59. **Ferri C et al** – HVC virus infection in mixed cryoglobulinemia and B cells lymphoma; Clinical and experimental rheumatology 12:86-96, 1994.
60. **Thomas M Grogan et al** – A south west oncology group perspective on the revised european-american lymphoma classification. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol 11, nr. 5, october 1997, pag 819-842.

61. **Roberto J. Firpi, David R Nelson** – Viral Hepatitis. Manifestations and Management Strategy. American Society of Hematology
62. **Aloman C, Mihaela Ștefan, Monica Aloman** – Manifestări extrahepatice în infecția cu virusul hepatitic C. *Medicina modernă*, vol IV, 1997, nr. 10, pag 532-535.
63. **Ivanoski M, Silvestri F, Pozzato G et al** – Somatic hypermutation, clonal diversity and preferential expression of VH51p1/VL kv 325 immunoglobulin gene combination in hepatitis C virus-associated immunocytomas. *Blood* 1998; 91:2433-2442.
64. **Cristian Munteanu et al** – Prevalența anticorpilor anti VHC la bolnavii cu limfoame maligne non-Hodgkin. *Infomedica*, nr 4/ 2000, pag 45-47.
65. **Ellenrieder V et al** – HCV and HGV in B cells non Hodgkin's lymphoma. *J Hepatol* 1998; 28 (1):34-39.
66. **King PD et al** – Hepatitis C virus infection in non Hodgkin's lymphoma. *Clinical & Laboratory Hematology* 1998; 107-110.