

Métodos moleculares para la determinación del genotipo del virus de la hepatitis C

David Navarro Ortega^{a,b}, Marta Jiménez Mayordomo^a y M. Desamparados Martínez Aparicio^a

^aServicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia. España.

^bDepartamento de Microbiología. Facultad de Medicina de Valencia. Valencia. España.

Se han descrito 6 genotipos y hasta 80 subtipos del virus de la hepatitis C (VHC). El conocimiento del genotipo infectante es crucial para tratar adecuadamente al paciente. El método de referencia para la tipificación molecular del VHC es la secuenciación completa del genoma viral y su posterior análisis filogenético. Sin embargo, esta posibilidad no está al alcance de la mayoría de los laboratorios hospitalarios. Existen varios métodos alternativos comercializados; los de uso más extendido se basan en el análisis de la región 5'UTR mediante amplificación y posterior secuenciación directa (TRUGENE 5'NC Genotyping Kit; Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canadá) o hibridación inversa de los amplicones con sondas dispuestas en línea sobre membrana-LiPA- (INNO-LiPA HCV I/II/ VERSANT HCV Genotype Assay 1.0; Innogenetics, N.V., Zwijnaarde, Bayer Healthcare, Bélgica). Los resultados obtenidos con estos ensayos son generalmente superponibles; identifican correctamente los genotipos en un 95-100% (clasifican algunos genotipos 4 y 6 como genotipos 1), pero su índice de acierto es menor (70-85%) con los subtipos, particularmente 1a, 1b, 2a/2c y 4a/4c. Existe una nueva generación de pruebas comercializadas con mejores prestaciones: GEN-ETI-K DEIA kit (Sorin, Saluggia, Italy) que analiza la región *core*; TRUGENE NS5B Genotyping Assay (Bayer Healthcare, Bélgica), la región NS5B; Real Time HCV Genotyping Test (Abbott, MS) las regiones 5'UTR y la NS5B y VERSANT 2.0 (Bayer), las regiones 5'UTR y *core*; estos ensayos son muy certeros en la determinación del genotipo y de la mayoría de subtipos conflictivos, particularmente 1a y 1b.

Palabras clave: Virus de la hepatitis C. Genotipo. Subtipo. Secuenciación directa. LiPA.

Molecular methods for genotypic determination of the hepatitis C virus

Six genotypes and up to 80 subtypes of hepatitis C virus (HCV) have been described. Knowledge of the infecting genotype is crucial for appropriate therapeutic management of HCV infection. Whole genome sequencing and subsequent phylogenetic analysis is the gold standard for HCV molecular typing; however, this procedure cannot be implemented in routine clinical laboratories. A number of alternative methods have been commercialized, the most widely used being those that target the 5'UTR region. In these assays, amplicons are first generated and then analyzed by direct sequencing (TRUGENE 5'NC genotyping kit; Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canada) or by reverse hybridization of amplicons with membrane immobilized line probes -LiPA- (INNO-LiPA HCV I/II/ VERSANT HCV genotype assay 1.0; Innogenetics, N.V., Zwijnaarde, Belgium/Bayer Healthcare). Both assays produce comparable results: the overall accuracy for genotype determination is 95-100% (a number of genotypes 4 and 6 are misclassified as genotype 1), but only 70-85% for subtyping (with frequent mistyping of subtypes 1a, 1b, 2a/2c, 4a/4c). A new generation of commercialized assays with better performance is currently available: GEN-ETI-K DEIA kit (Sorin, Saluggia, Italy), which analyzes the core region, TRUGENE NS5B genotyping assay (Bayer Healthcare) for the NS5B region, RealTime HCV Genotyping Test (Abbott, MS) for both 5'UTR and NS5B regions and VERSANT 2.0 (Bayer), both for the 5'UTR and core regions; these assays are highly accurate for genotype determination and typing of most difficult subtypes, particularly 1a and 1b.

Key words: Hepatitis C virus (HCV). Genotype. Subtype. Direct sequencing. LiPA.

Heterogeneidad genómica del virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus envuelto, con ARN de polaridad positiva, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus*¹. El genoma viral, de

Correspondencia: Dr. D. Navarro Ortega.
Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario.
Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia. España.
Correo electrónico: David.Navarro@uv.es

aproximadamente 9,0 a 9,6 Kpb según el genotipo considerado, codifica una única poliproteína de 3.011-3.033 aminoácidos que es escindida por proteasas celulares y virales en 3 péptidos estructurales que conforman el virión maduro (proteína *core*, E1 y E2) y en 7 no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4a/b y NS5a/b) con actividad catalítica (ARN polimerasa ARN dependiente [NS5B], 2 proteasas [NS2 y NS3] y una NTPasa/helicasa [NS3]) o reguladora (NS4a/b y NS5A). El genoma viral contiene secuencias nucleotídicas en ambos extremos que no se traducen (5' y 3'UTRs o NCRs) y que intervienen en la regulación de la replicación y la expresión del genoma viral, así como en la traducción del ARN (*ribosomal entry site* [IRES] en la secuencia 5'UTR).

El VHC muestra un grado considerable de heterogeneidad genética, hasta el punto de que los distintos genotipos y subtipos caracterizados hasta la fecha comparten únicamente el 66-80% de su secuencia. La variabilidad genómica es máxima en la región E1-E2, que incluye la secuencia denominada RHP-1 (región hipervariable 1), y mínima en la secuencia 5'UTR y en los 98 nucleótidos terminales de la región 3'UTR². Esta particularidad es fácilmente comprensible si se considera que: *a*) la RHP-1 codifica una secuencia de 30 aminoácidos que incluye epítopos inmunodominantes diana de anticuerpos neutralizantes y linfocitos T CD8+; la persistencia del VHC en el hospedador se debe, en gran medida, a que esta secuencia es propa a experimentar rápidos cambios adaptativos ante la presión selectiva del sistema inmunitario, y *b*) la correcta conformación secundaria de la secuencia 5'UTR es crítica para que ésta desempeñe con eficacia su papel regulador durante el ciclo infectivo del virus; tanto es así que cambios no "conservativos" en esta secuencia son, a menudo, incompatibles con la viabilidad de la cepa. Las secuencias correspondientes a las regiones C y NS3 muestran también un elevado grado de identidad entre los distintos aislados.

El VHC se replica en el citoplasma celular utilizando una ARN polimerasa propia que, al ser incapaz de reconocer y reparar las inserciones erróneas de nucleótidos que inevitablemente se producen durante la replicación del ARN viral (10^{-2} 10^{-3} sustituciones/nucleótido/año), propicia la generación de variantes o "cuasiespecies" en cada ciclo replicativo que difieren mínimamente entre sí. El VHC circula en el individuo infectado crónicamente en forma de un conjunto de cuasiespecies, no todas infectivas, que se diferencian entre sí en un 1-5% de la secuencia nucleotídica³. Esta enorme capacidad de variación hace posible una mayor adaptabilidad del virus al hospedador y, con ésta, una alta probabilidad de establecer infecciones crónicas persistentes. Si bien la heterogeneidad genómica del VHC se debe, esencialmente, a la escasa fidelidad copista de la ARN polimerasa viral, hoy se reconoce la recombinación homóloga entre distintos genotipos como fuente añadida de variabilidad. Recientemente se han descrito infecciones naturales por un híbrido 2k/1b⁴ y por una variante intragenotípica (1a/1b)⁵. Se desconoce en gran medida el potencial patogénico de estas cepas, pero sí se sabe que su correcta tipificación puede resultar problemática con los métodos al uso.

Después del descubrimiento del VHC se puso de manifiesto el enorme potencial del virus para variar su secuencia. En un artículo de consenso publicado en 1994⁶ se pro-

puso una clasificación del VHC, sustentada en la secuenciación completa del genoma viral y el posterior alineamiento de secuencias con otras prototípicas y análisis filogenético, que postulaba la existencia de 6 genotipos claramente diferenciados, equidistantes filogenéticamente, que diferían entre sí en un 30-33% de su secuencia. Cada una de estas agrupaciones filogenéticas incluía variantes estrechamente relacionadas entre sí, que diferían en un 20-25% de su secuencia y que se denominaron subtipos. Quedó patente que existía más diversidad genética entre las cepas pertenecientes a los genotipos 3 y 6 que entre las adscritas originalmente a los subtipos 1a, 1b y 2a, 2b y 2c, lo que condujo a un grupo de expertos, reunidos en Santa Fe (Nuevo México) en 1997, a proponer una nueva clasificación genómica⁷ en la que se introducía una categoría de mayor jerarquía que el genotipo, el denominado *clade* o agrupación monofilética. Ésta distinguía 6 *clades*, asimilables a los genotipos propuestos en 1994, y 11 genotipos (el *clade* 6 incluía los genotipos 6, 7, 8, 9 y 11, y el *clade* 3 los genotipos 3 y 10). Sin embargo, esta propuesta no gozó de aceptación unánime, lo que, unido a la existencia en la literatura científica de distintas notaciones para designar idénticas variantes, condujo a un notable estado de confusión, resuelto en una reciente reunión de expertos en esta materia celebrada en Heidelberg, en 2004, a la que fueron invitados científicos estadounidenses, europeos y japoneses expertos en variabilidad genética del VHC y en el análisis de bases de datos. De ella emanaron varias propuestas, actualmente vigentes, de las cuales destacan la de conservar la división clásica en 6 genotipos o *clades* (asimilan ambas categorías taxonómicas) y la de designar cada subtipo exhaustivamente caracterizado, 80 hoy por hoy, con el número correspondiente al genotipo en el que se incluye y una letra en minúscula: genotipo 1 (subtipos a-l), genotipo 2 (subtipos a-q), genotipo 3 (subtipos a-k), genotipo 4 (subtipos a-t), genotipo 5 (subtipo a), genotipo 6 (subtipos a-q). Igualmente, establece criterios formales basados en la secuenciación completa del genoma viral y el posterior análisis filogenético para clasificar las nuevas variantes que pudieran descubrirse en el futuro⁸.

Relevancia de la determinación del genotipo del virus de la hepatitis C

La caracterización genotípica del VHC tiene interés clínico, epidemiológico y, en determinadas circunstancias, legal. La tipificación genómica del VHC es crítica para el correcto manejo terapéutico del paciente infectado. En efecto, el genotipo del VHC es un factor pronóstico con significación estadística propia e independiente de otros factores (carga viral periférica o daño hepático previo) de respuesta virológica mantenida (RVM) al tratamiento antiviral (interferón estándar o pegilado en monoterapia o en combinación con ribavirina). La tasa de RVM es 2 a 3 veces mayor en pacientes infectados por los genotipos 2 y 3 que en los infectados por el genotipo 1. Además, la RVM puede lograrse en los primeros con una menor dosis de ribavirina y un régimen terapéutico más corto (24 semanas frente a 48 semanas). Incluso los pacientes que no responden inicialmente al tratamiento tienen mayor probabilidad de responder a un segundo curso terapéutico si están infectados por los genotipos 2 o 3 que si lo están por el 1. Existen pocos

datos sobre el grado de RVM en casos de infecciones por los genotipos 4, 5 y 6; se tratan como si fueran infecciones causadas por el genotipo 1 y parecen responder mejor que las producidas por éste, aunque peor que generadas por los genotipos 2 y 3^{9,10}.

Por otra parte, la caracterización de subtipo de las cepas circulantes del VHC ha permitido establecer la forma en que se transmiten más eficazmente y conocer su distribución geográfica. Sabemos que el genotipo 1a, en cuya secuencia prototípica se basaron los primeros ensayos serológicos y moleculares para diagnosticar la infección por el VHC, es más prevalente en EE. UU. y en Europa que en el resto del mundo, y que su transmisión está habitualmente vinculada al consumo de drogas por vía parenteral. Por el contrario, el subtipo 1b, el más común, es muy prevalente en todo el mundo, particularmente en EE. UU., Europa y Japón, donde supone el 70% de las infecciones por el VHC. El genotipo 3 es especialmente prevalente en el subcontinente indio e Indonesia, mientras que los genotipos 4, 5 y 6 parecen confinados a zonas geográficas concretas: África del Norte, África del Sur y Hong Kong, respectivamente. Estos datos epidemiológicos son de gran relevancia en materia de política sanitaria si se considera el comportamiento de los distintos genotipos frente al tratamiento antiviral, ya que los tratamientos son caros y los regímenes de tratamiento más cortos suponen un ahorro considerable¹⁰.

La tipificación genotípica del VHC tiene interés legal en casos de brotes epidémicos en los que resulta perentorio vincular de forma epidemiológica los casos registrados con la fuente probable de infección. En éstos, sólo el análisis filogenético de la región E1/E2 de las cuasiespecies mayoritarias circulantes, cuya cinética evolutiva es mucho más rápida que la de otras regiones subgenómicas, permite obtener información relevante¹¹.

Genotipos del virus de la hepatitis C e historia natural de la infección

Varios estudios parecen indicar que existe una relación directa entre el genotipo infectante y el curso clínico de la infección. Se ha sugerido que las infecciones causadas por el VHC de genotipo 1b tienen mayor probabilidad de cronificarse, cursan con un mayor grado de daño hepático y devienen en cirrosis hepática y hepatocarcinoma más frecuentemente que las debidas a otros subtipos. Otros estudios vinculan el genotipo 3 con el desarrollo de esteatosis hepática grave^{9,10}. Existe gran controversia en esta materia; sin embargo, lo cierto es que cualquier subtipo del VHC puede generar infecciones crónicas persistentes que eventualmente pueden complicarse por igual. Incluso distintos pacientes infectados por el mismo subtipo del VHC pueden experimentar cursos evolutivos disímiles. Es muy probable que el perfil evolutivo de la infección por el VHC dependa de un conjunto de factores, algunos vinculados a la propia naturaleza de la cepa viral infectante (genotipo, nivel replicativo, adaptabilidad de las cuasiespecies generadas), otros del hospedador (haplotipo HLA) y otros, quizá también, del modo en que el virus y el sistema inmunitario interaccionan en cada caso. Tal vez, la mayor patogenicidad atribuida al genotipo 1b refleja únicamente una mayor ancianidad de la población infectada por este subtipo^{9,10}. Para dilucidar esta cuestión, se requiere un

modelo in vitro adecuado. En este sentido, se ha conseguido replicar satisfactoriamente el VHC (genotipos 1a, 1b, y 2a) en cultivos in vitro mediante transfección celular de vectores de expresión que integran el genoma del VHC (replicones)¹².

Métodos para determinar el genotipo del virus de la hepatitis C

Se ha descrito una amplia variedad de procedimientos moleculares para determinar el genotipo del VHC. En todos ellos se amplifica inicialmente una región subgenómica determinada mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR); posteriormente, se discrimina entre los diferentes tipos mediante secuenciación directa¹³, reamplificación con cebadores específicos de genotipo o subtipo¹⁴, hibridación inversa sobre membrana (LiPA) con sondas específicas de genotipo o subtipo¹⁵, RFLP (ADN *restriction fragment length polymorphism*)¹⁶, análisis de movilidad de heterodúplex utilizando electroforesis capilar en gradiente de temperatura¹⁷, o análisis de curvas de disociación con sondas fluorescentes mediante la tecnología FRET (transferencia de energía fluorescente mediante resonancia)¹⁸, entre otras posibilidades. También existen métodos serológicos¹⁹ para este propósito: uno de ellos, comercializado por Murex (MurexTM HCV Serotyping 1-6 Assay, Murex Diagnostics, Dartford, Reino Unido), permite la correcta dilucidación del genotipo en un 85-90% de los casos.

El método de referencia para la determinación, tanto del genotipo como del subtipo del VHC, es la secuenciación directa del genoma completo del virus y el posterior análisis filogenético tras comparar la secuencia obtenida con otras prototípicas, lo cual resulta impracticable en el ámbito hospitalario. La secuenciación de la región polimórfica de NS5B en exclusiva permite obtener esa misma información con un grado de certeza virtualmente absoluto, de modo que esta estrategia se ha erigido en el método de referencia en la mayoría de estudios comparativos publicados. Los métodos genómicos basados en el análisis de la región 5'UTR permiten tipificar acertadamente la mayoría de genotipos del VHC, pero son imprecisos para la determinación del subtipo. Por otra parte, la caracterización de variantes y cuasiespecies requiere procedimientos más complejos que incluyen la amplificación, el clonado y la secuenciación de la región E1/E2¹¹.

La mayoría de los métodos genotípicos comercializados se basa en el análisis de la región 5'UTR, la cual contiene suficientes polimorfismos para discriminar correctamente entre los genotipos del VHC más prevalentes. Esta región subgenómica, al contrario que NS5B (las cepas del genotipo 4 se amplifican con dificultad), es fácilmente amplificable sea cual fuere el genotipo infectante^{20,21}. De hecho es la diana de amplificación de la mayoría de las pruebas comerciales que detectan (ensayos cualitativos) o cuantifican (ensayos cuantitativos de carga viral) el VHC en la sangre periférica. Las 2 pruebas más representativas, por su uso extendido, son TRUGENE[®] 5'NC Genotyping Kit (Visible Genetics/Siemens Medical Solutions, Toronto, Ontario, Canadá) e INNO-LiPA[®] HCV II (Innogenetics, N.V., Zwijnaarde, Bélgica/VERSANT HCV Genotype Assay 1.0; Siemens Medical Solutions); en estos ensayos se amplifi-

ca inicialmente la región 5'UTR mediante PCR-TR y, posteriormente, se discrimina entre los distintos genotipos mediante secuenciación directa (TRUGENE®) o hibridación inversa-LiPA- (INNO-LiPA®). Ambos ensayos pueden llevarse a cabo tras amplificar la región 5'UTR (244 pbs) mediante la prueba COBAS AMPLICOR® Hepatitis C Virus test, versión 2.0 (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, N.J.) o COBAS AMPLICOR® HCV Monitor (Roche), siempre que la carga viral periférica sea al menos de 1.000 U/ml y 20.000 U/ml, respectivamente. Sin embargo, son actualmente incompatibles con los ensayos PCR-TR recientemente comercializados por Roche: COBAS TaqMan (COBAS TaqMan HCV Test; Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) y TaqMan HCV Analyte Specific Reagent (Roche Molecular Systems, Inc.). En el método TRUGENE®, el producto de amplificación se neutraliza, purifica y posteriormente se secuencian en ambas direcciones mediante un método capilar desarrollado por la propia empresa (CLIP™). La secuencia obtenida se alinea con secuencias prototípicas de los distintos genotipos y subtipos incluidas en una base de datos (GeneLibraryGL 3.1.1 y más recientemente GL3.1.2) y un programa informático realiza un análisis filogenético (nucleótidos -256 a -70) para determinar el genotipo y el subtipo. El ensayo de genotipos del VHC (LiPA) VERSANT® 1.0 (comercializado como ensayo INNOLIPA HCV II, antes de adquirir Bayer Healthcare/Siemens Medical Solutions los derechos de distribución y venta) se basa en la técnica de hibridación inversa. En primera instancia, se generan amplicones biotinilados mediante PCR-TR (el *kit* de amplificación de VERSANT® incluye cebadores que amplifican las secuencias -299 a -239 y -46 a -6 de la región 5'UTR), que tras ser desnaturalizados se someten a hibridación con varias sondas diana y dos de control alineadas convenientemente y fijadas a la membrana de nitrocelulosa mediante sendas colas poli-(T). Los híbridos formados se hacen patentes mediante la adición de un conjugado (estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina) seguida del sustrato cromógeno (BCIP/NBT). El genotipo se determina tras la alineación de la tira problema con la tarjeta de referencia del ensayo. La diferencia entre las versiones I y II del LiPA radica en que la primera incluía 17 sondas (1 genérica del genotipo 1, 1a, 1b; 2 genéricas del genotipo 2, 2 del subtipo 2a, 2 del subtipo 2b, 4 del subtipo 3a, 3 de los genotipos 4/5) mientras que la versión II incluye 5 más, específicas de los genotipos 4, 5, y 6. Ambos ensayos pueden completarse en alrededor de 5 h y tienen un coste similar, si bien la complejidad técnica del ensayo TRUGENE® y la necesidad de disponer de un secuenciador para llevarlo a cabo han hecho que el LiPA tenga una mayor aceptación, particularmente en laboratorios medianamente equipados. Los 2 ensayos son igualmente competentes en la determinación del genotipo, con índices de acierto que oscilan entre el 95-100%²²⁻³⁰. Tan sólo algunas cepas pertenecientes al genotipo 6 (subtipos a, c-1)³¹, muy prevalentes en Tailandia, o al subtipo 4a³² son incorrectamente clasificadas como pertenecientes al genotipo 1, lo cual tiene importantes consecuencias en la elección del régimen terapéutico. Ambos, en cambio, son inadecuados para la caracterización de subtipo (en más de un 95% de los casos se llega a la misma resolución empleando uno u otro método), por cuanto su índice de acierto se sitúa alrededor del 75-85%. El mayor inconveniente de los métodos TRUGENE®

NE® e INNO-LiPA® es su incapacidad para discriminar correctamente entre algunas cepas pertenecientes a los subtipos 1a y 1b y acertar con los subtipos 2a/2c²²⁻³⁰. TRUGENE® en particular y también INNO-LiPA® tienden a catalogar como 1b cepas que son en realidad 1a, lo cual se debe a que la secuencia amplificada sólo contiene un polimorfismo de subtipo (nt-99, A por G), poco consistente a tenor de los datos obtenidos mediante el análisis de la región NS5B de un gran número de cepas de estos subtipos^{15,33,34}. Los 2 métodos también tienen dificultades para tipificar acertadamente los subtipos 4a/4c, en particular el INNO-LiPA³⁵.

El Invader HCV Genotyping Assay (Third Wave Technologies, Inc., Madison, Wisconsin) es un método recientemente comercializado, también basado en el análisis de la región 5'UTR, que emplea la tecnología ADN clivasa y FRET. Al igual que TRUGENE® y el INNO-LiPA®, puede partir de amplicones generados por distintos métodos comerciales. En este sentido, es destacable su compatibilidad con el método COBAS Taqman (Roche), a diferencia del INNO-LiPA® (el COBAS Taqman no emplea iniciadores biotinilados) y el TRUGENE® (deslizamiento de la región amplificada). Este método, algo más sencillo de ejecutar que el TRUGENE® y que puede completarse en 1,5 h (tras la amplificación) a un coste comparable a los ya referidos, se comporta de modo similar a los anteriores; esto es, preciso con los genotipos e impreciso con los subtipos, sobre todo 1a/1b³⁶.

En resumen, los métodos basados en el análisis de la región 5'UTR son plenamente competentes para la determinación de los genotipos más prevalentes en nuestro medio y, consecuentemente, son adecuados para guiar el tratamiento antiviral, pero no lo son para la dilucidación del subtipo, por lo que no pueden emplearse en estudios epidemiológicos. Con objeto de mejorar la discriminación entre subtipos y solventar los inconvenientes en la resolución del genotipo infectante, se han comercializado varios ensayos que, o bien se basan en el análisis de otras regiones subgenómicas, como la región *core* (GEN-ETI-K DEIA kit; Sorin, Saluggia, Italy) o la región NS5B (TRUGENE NS5B Genotyping Assay; Siemens Medical Solutions), o bien conjugan el análisis de las regiones 5'UTR y la NS5B (Real Time HCV Genotyping Test, Abbott, MS) o las regiones 5'UTR y *core* (VERSANT 2.0, Bayer/Siemens).

En el ensayo DEIA (ADN inmunoanálisis), en primer lugar se amplifica una secuencia de 250 pb de la región *core* mediante PCR-TR anidada (incluye 4 polimorfismos 1a/1b) y, posteriormente, los amplicones generados se hibridan de forma diferencial con 9 sondas (1a, 1b, 2 genérica, 2a, 2b, 3a, 4, 5 y 6) fijadas a la fase sólida (placa de micropocillos) mediante puentes avidina-biotina. El revelado se lleva a cabo empleando un anticuerpo monoclonal específico frente a ADN ds marcado con una enzima, tras la adición del sustrato correspondiente. Esta prueba es comparable con las basadas en el análisis de la región 5'UTR en cuanto a la eficacia en la determinación del genotipo, pero discrimina mejor los subtipos 1a/1b que aquéllas. Sin embargo, los subtipos 2 son, a menudo, clasificados incorrectamente³⁷.

El ensayo Abbott Real Time® HCV Genotype (Abbott Molecular Diagnostics, Abbott Park, Illinois) es el único comercializado hasta la fecha que emplea la tecnología PCR-TR. El ensayo parte de ARN purificado a partir del

plasma, que es amplificado mediante el uso de iniciadores específicos de las regiones NS5B y 5'UTR y de una polimerasa termoestable recombinante (Z05 modificada) con actividad retrotranscriptasa y ADN polimerasa. El ensayo utiliza sondas MGB® (*Minor Groove Binder*) con doble marcado fluorescente específicas de 1a y 1b (región NS5B) y otras específicas de los genotipos 2 (2a, 2b), 3, 4, 5 y 6 (estos últimos de la región 5'UTR). La prueba se realiza en 3 reacciones independientes; la primera contiene iniciadores y sondas control destinadas a detectar cualquier genotipo presente, e iniciadores y sondas específicas de 1a y 1b; la segunda reacción contiene los iniciadores y las sondas específicas de 2a, 2b y 3, y, finalmente, la tercera reacción contiene los iniciadores correspondiente y las sondas específicas de los genotipos 4, 5 y 6. Tras 50 ciclos de amplificación en un ABI PRISM® 7000, los datos obtenidos son analizados mediante el programa Sequence Genotyping Software, V1.0 (recientemente actualizada, v2.0; Celera Diagnostics, Alameda, California). Esta prueba permite determinar el genotipo de 32 muestras en menos de 6 h, con un límite de detección que varía entre 1.200 y 1.500 U/ml, según el procedimiento empleado para la extracción del ARN; es precisa en la determinación de los subtipos 1a/1b 2a, 2b y 3, pero no tanto en la de los genotipos 4 y 6. Un inconveniente añadido es su alta tasa de resultados indeterminados (alrededor del 6%)^{38,39}, que, sin embargo, es comparable con la que se obtiene con TRUGENE® y el INNO-LiPA®.

La nueva versión del INNO-LiPA (VERSANT® HCV Genotype 2.0 assay; Bayer/Siemens) se ha diseñado para circunvenir algunos de los inconvenientes de la versión anterior 1.0. Con este propósito, incluye nuevas sondas que reconocen secuencias específicas de la región *core* de los subtipos 1a, 1b y 6c-6l. Esta prueba es capaz de determinar correctamente el subtipo de un 95-97% de las cepas^{40,41} (alrededor de un 70% la versión 1.0), pero requiere la amplificación conjunta de las regiones 5'UTR y *core*, por lo que la mayoría de pruebas comercializadas para la determinación cualitativa o cuantitativa del ARN del VHC no es adecuada para generar los amplicones de partida. Este ensayo, sin embargo, no discrimina acertadamente entre la mayoría de los subtipos pertenecientes al genotipo 2. Finalmente, existe un nuevo prototipo de ensayo basado en la amplificación y la posterior secuenciación de la región NS5B, desarrollado por Bayer/Siemens (Trugene® NS5B HCV Genotyping Kit), todavía en fase de evaluación, del que cabe esperar gran precisión en la determinación de los subtipos más conflictivos²¹.

Métodos de determinación del genotipo del virus de la hepatitis C e infecciones mixtas

Las infecciones por más de un genotipo del VHC son factibles por la ausencia de inmunidad protectora cruzada entre los distintos genotipos. La prevalencia de estas infecciones parece variar entre un 0-20% en función de la población considerada (son factores de riesgo establecidos la adicción a drogas por vía parenteral y las transfusiones múltiples) y el método de análisis^{42,43}. Los ensayos genotípicos comercializados están pensados para identificar el genotipo dominante y, consecuentemente, están limitados en cuanto a su capacidad para detectar infecciones mixtas.

Sólo la amplificación de una región genómica suficientemente polimórfica, preferiblemente NS5B, seguida del clonado de los amplicones generados y la subsecuente secuenciación de los clones obtenidos, permite determinar con certeza la existencia de infecciones mixtas. Este procedimiento, sin embargo, no puede llevarse a cabo sistemáticamente, ni siquiera en laboratorios altamente especializados. Desde una perspectiva estrictamente clínica, sólo es relevante saber si los genotipos más refractarios al tratamiento (particularmente los genotipos 1 y 4) están presentes en el paciente infectado. En este sentido, los ensayos TRUGENE® e INNO-LiPA® son capaces de detectar genotipos minoritarios siempre que se encuentren en proporciones no inferiores al 10-20% (TRUGENE®) y 5% (INNO-LiPA®) de la población global del VHC presente en la muestra^{21,28}. Cabe esperar algo más de los métodos de tipificación molecular basados en la PCR-TR en virtud de su extrema sensibilidad. Estudios preliminares en este sentido parecen sustentar este pronóstico^{38,39}.

Bibliografía

- Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G, et al. Flaviviridae. En: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus Taxonomy, VIIIth report of the ITCV. 2005:979-96.
- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. J Gen Virol. 2004;85:3173-88.
- Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. J Hepatol. 1999;31:54-60.
- Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. J Virol. 2002;76:4034-43.
- Colina R, Casane D, Vasquez S, García-Aguirre L, Chunga A, Romero H, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. J Gen Virol. 2004;85:31-7.
- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. Hepatology. 1994;19:1321-24.
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and data base development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. Arch Virol. 1998;143:2493-503.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C genotypes. Hepatology. 2005;42:962-73.
- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev. 2000;13:223-35.
- Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. Antiviral Ther. 2005;10:1-11.
- Bracho MA, Gosalbes MJ, Blasco D, Moya A, González-Candelas F. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a hemodialysis unit. J Clin Microbiol. 2005; 43:2750-5.
- Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, et al. Production of infectious hepatitis C Virus of various genotypes in cell culture. J Virol. 2007;81:4405-11.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha T-A, Chan S-W, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of NS-5 region. J Gen Virol. 1993;74:2391-9.
- Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. J Gen Virol. 1992;73:673-9.
- Stuyver L, Wyseur A, Van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. J Clin Microbiol. 1996;34:2259-66.
- Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genome by restriction fragment length polymorphism. J Gen Virol. 1991;72:2105-12.
- White PA, Zhai X, Carter I, Zhao Y, Rawlison WD. Simplified hepatitis C virus genotyping by heteroduplex mobility analysis. J Clin Microbiol. 2000;38:477-482.

18. Schroter M, Zollner B, Schafer P, Landt O, Laufs R, Feucht HH. Genotyping of hepatitis C virus types 1, 2, 3 and 4 by one-step LightCycler methods using three different pairs of hybridization probes. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2046-50.
19. Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M, DiNello K, et al. Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: strong correlation with standard genotyping methodologies. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2978-83.
20. Tamalet C, Colson P, Tissot-Dupont H, Henry M, Tourres C, Tivoli N, et al. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C isolates: a survey of 535 strains circulating in southern France. *J Med Virol.* 2003;71:391-8.
21. Laperche S, Lunel F, Izopet J, Alain S, Dèny P, Duverlie G, et al. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2005;43:733-9.
22. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, De Ledinghen V, Couzigou P, et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene). *J Clin Microbiol.* 2001;39:1771-3.
23. Germer JJ, Majewski DW, Rosser M, Thompson A, Mitchell PS, Smith TF, et al. Evaluation of the TRUGENE HCV 5'NC genotyping kit with the new GeneLibrarian module 3.12. for genotyping of hepatitis C virus from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4855-7.
24. Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, Picciotto A, Crovari P, Icardi GJ. Evaluation of a new hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J Med Virol.* 2001;63:17-21.
25. Haushofer AC, Berg J, Hauer R, Trubert-Exinger D, Stekel HG, Kessler HH. Genotyping of hepatitis C virus- comparison of three assays. *J Clin Virol.* 2003;27:276-85.
26. Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of hepatitis C genotype by direct sequence analysis of products generated with the amplicor test. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2625-30.
27. Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, Beyou A, Monnet A, Mazure C, et al. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3581-4.
28. Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, Caliendo A, Sturchio C, Grunwald A, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' non coding region. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1558-64.
29. Zheng X, Pang A, Roberto A, Warner D, Belinda YL. Direct comparison of hepatitis C virus genotypes tested by INNO-LiPA HCV II and TRUGENE HCV genotyping methods. *J Clin Virol.* 2003;28:214-6.
30. Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: Interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3127-34.
31. Chinchai T, Labout J, Noppornpanth S, Theamboonlers A, Haagmans A, Osterhaus AD, et al. Comparative study of different methods to genotype hepatitis C virus type 6 variants. *J Virol Methods.* 2003;109:195-210.
32. Zekri ARN, Alam El-Din HM, Bahnassy AA, El-Shehabi AMR, El-Leethy HE, Omar A, et al. TRUGENE sequencing versus INNO-LiPA for sub-genotyping of HCV genotype 4. *J Med Virol.* 2005;75:412-20.
33. Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, et al. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implication for secondary structure, virus detection and typing. *J Gen Virol.* 1995;76:1749-61.
34. Fornis X, Maluenda MD, Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Olmedo E, Costa J, et al. Comparative studies of three methods for genotyping hepatitis C virus strains in samples from Spanish patients. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2516-21.
35. Cantaloube JF, Laperche S, Gallian P, Bouchardeau F, De Lamballerie X, De Micco P. Analysis of the 5' noncoding region versus the NS5b region in genotyping hepatitis C virus isolates from blood donors in France. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2051-6.
36. Germer JJ, Majewski DW, Yung B, Mitchell PS, Yao JDC. Evaluation of the Invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J Clin Microbiol.* 2006;44:318-23.
37. Le Pogam S, Dubois F, Christen R, Raby C, Cavicchini A, Goudeau A. Comparison of DNA enzyme immunoassay and line probe assays (Inno-LiPA HCV I and II) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1461-3.
38. Schutzbank TE, Seifers SE, Kahman N, Li H, Tang YW. Comparative evaluation of three commercial available methodologies for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3797-8.
39. Cook L, Sullivan KW, Krantz EM, Bagabag A, Jerome KR. Multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4149-56.
40. Noppornpanth S, Sablon E, De Nys K, Lien T-X, Brouwer J, Van Brussel M, et al. Genotyping hepatitis C viruses from southeast Asia by a novel line probe assay that simultaneously detects core and 5' untranslated regions. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3969-74.
41. Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, et al. Improvement of HCV genotype determination with the new version of Inno-LiPA HCV assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1140-5.
42. Eyser ME, Sherman KE, Goedert JJ, Katsoulidou A, Hatzakis A. Prevalence and changes in hepatitis C virus genotypes among multitransfused persons with hemophilia. The Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Infect Dis.* 1999;179:1062-9.
43. Hu YW, Balaskas E, Furione M, Yen PH, Kessler G, Scaglia V, et al. Comparison and application of a novel genotyping method, semiautomated primer-specific and mispair extension analysis, and four other genotyping assays for detection of hepatitis C virus mixed-genotype infections. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2807-13.

