

Variabilidad genética del virus de la hepatitis C en el área de salud de Elche. Correlación entre el antígeno del core y la carga viral

J.C. Rodríguez^a, J. García^a, I. Moya^a, A. Ayelo^a, N. Vázquez^b, C. Sillero^b y G. Royo^a

^aServicio de Microbiología. ^bServicio del Aparato Digestivo. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Elche. Alicante. España.

RESUMEN

Se ha investigado la prevalencia de los diferentes genotipos del virus de la hepatitis C (VHC) en el Área de Salud de Elche sobre un total de 281 pacientes estudiados entre marzo de 2000 y marzo de 2002. De ellos, 55 estaban coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Se ha relacionado el genotipo con la carga viral y la coexistencia de infección por el VIH. Asimismo, se ha establecido la relación de estos parámetros con la presencia del antígeno del core del VHC.

Los resultados permiten establecer que el genotipo 1b es el que presenta mayor prevalencia (38,4%), seguido del genotipo 3a (23,1%). Los pacientes coinfectados por el VIH presentan menos infecciones debidas a genotipos del grupo 1 ($p < 0,05$).

Los pacientes infectados por el VIH presentan una mayor carga viral en todos los genotipos, sobre todo el genotipo 3.

La detección del antígeno del core del VHC presenta una buena correlación con la determinación de la carga viral. Aunque todavía no ha sido suficientemente evaluada, la determinación del antígeno del core del VHC constituye una técnica sencilla que puede contribuir, en el futuro, a mejorar el manejo de los pacientes con hepatitis crónica por el VHC.

GENETIC VARIABILITY OF THE HEPATITIS C VIRUS IN THE HEALTH AREA OF ELCHE (SPAIN). CORRELATION BETWEEN THE CORE ANTIGEN AND VIRAL LOAD

We investigated the prevalence of the various genotypes of hepatitis C virus (HCV) in 281 patients evaluated between March, 2000 and March, 2002 in the health area of Elche. Of these patients, 55 were coinfecting with human immunodeficiency virus (HIV).

Correspondencia: Dr. J.C. Rodríguez.
Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche.
Huertos y Molinos, s/n. 03203 Elche. Alicante. España.
Correo electrónico: micro_elx@gva.es

Recibido el 27-1-2003; aceptado para su publicación el 29-4-2003.

The genotype was related to viral load and the co-existence of HIV infection. Likewise, the relationship between these parameters and the presence of the HCV core antigen was established.

The results indicate that genotype 1b was the most prevalent (38.4%) followed by genotype 3a (23.1%). Patients coinfecting with HIV presented fewer infections due to group 1 genotypes ($p < 0.05$).

Patients with HIV presented a greater viral load in all the genotypes, with genotype 3 presenting a high viral load.

Detection of the HCV core antigen showed a close correlation with viral load determinations. Although not yet sufficiently assessed, determination of the HCV core antigen constitutes a simple technique that could eventually contribute to improving the management of patients with chronic HCV hepatitis.

INTRODUCCIÓN

La infección por el VHC ha adquirido proporciones epidémicas, diagnosticándose más de 1 millón de nuevos casos cada año. Se cree que es más prevalente que el virus de la hepatitis B, siendo responsable de la aparición de un buen número de casos de cirrosis hepática y hepatocarcinoma y en la actualidad es la primera indicación de trasplante hepático¹.

El VHC presenta una notable heterogeneidad genética, y se han observado diferencias en la patogenicidad y en la respuesta al tratamiento combinado con interferón y ribavirina según los diferentes genotipos.

Este estudio analiza la frecuencia de los distintos genotipos del VHC en el Área de Salud de Elche y el valor de la investigación del antígeno del core del VHC en relación con la carga viral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 281 pacientes (193 varones y 88 mujeres) con hepatitis por el VHC, no tratados, entre marzo de 2000 y marzo de 2002; de ellos, 55 presentaban una coinfección por el VIH. En todos ellos se determinó la carga viral mediante el método HCV Monitor (Roche), con el sistema automatizado Cobas Amplicor. Este

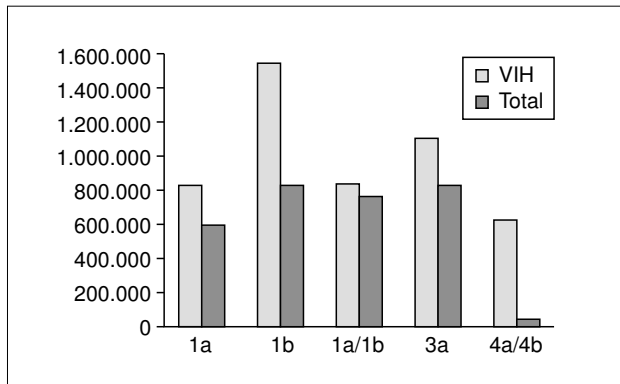


Fig. 1. Asociación entre la carga viral, el genotipo y la coinfección por el VIH.

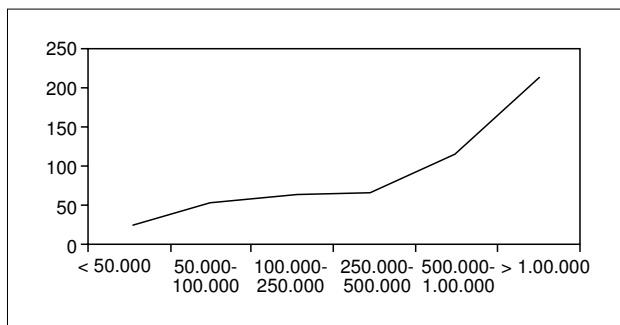


Fig. 2. Relación entre la carga viral y el antígeno del core.

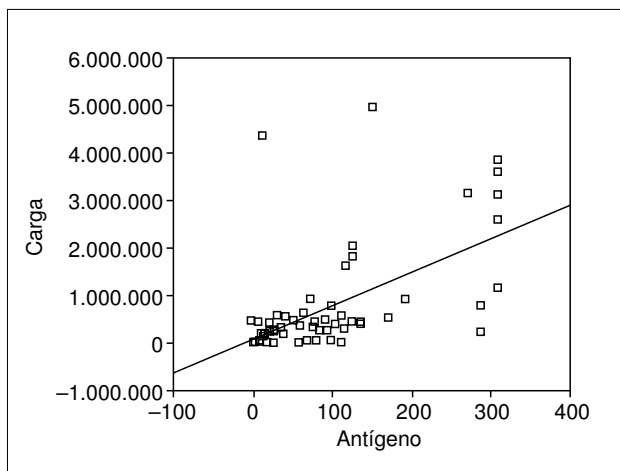


Fig. 3. Correlación entre la carga viral y el antígeno del core viral.

método detecta la presencia de ARN viral mediante una PCR cuantitativa, expresando los resultados en U/ml. Un sistema de control interno diferencia la ausencia de ARN viral en el plasma del paciente y la inhibición de la reacción de amplificación.

La determinación de los genotipos se realizó mediante el método Innolipa (Innogenetics). Utilizando la amplificación realizada en la técnica anterior se determinó el genotipo del virus mediante la hibridación con un soporte de nailon en el que se encuentran adheridas sondas específicas que pueden identificar los siguientes genotipos: 1a, 1b, 1a/1b, 1, 2a/2c, 2b, 2, 3a, 3b, 3c, 3, 4a, 4b, 4c/4d, 4c, 4f, 4h, 4, 5a, 6a y 10. Esta técnica no puede realizarse en sueros con ausencia o valores muy bajos de ARN viral.

TABLA I. Distribución por genotipos

Genotipo	General	VIH	No VIH	Varones	Mujeres
1b	108 (38,4)	15 (27,3)	93 (41,5)	65 (33,2)	43 (48,9)
3a	65 (23,1)	14 (25,4)	51 (22,5)	45 (23,3)	20 (22,7)
1a	38 (13,5)	9 (16,4)	29 (12,8)	31 (16,1)	7 (7,9)
1a/1b	24 (8,5)	5 (9,1)	19 (8,4)	16 (8,3)	8 (9,1)
4c/4d	20 (7,1)	5 (9,1)	15 (6,6)	14 (7,2)	6 (6,8)
4	6 (2,1)	1 (1,8)	5 (2,2)	6 (3,1)	0 (0)
2a/2c	5 (1,8)	0 (0)	5 (2,2)	3 (1,5)	2 (2,3)
Otros	15 (4,9)	6 (10,8)	9 (3,7)	13 (6,5)	2 (2,2)

Las cifras entre paréntesis expresan porcentajes.

En 68 de los 281 pacientes se determinó la presencia del antígeno del core del VHC mediante una técnica de ELISA. La cuantificación de los resultados se realizó mediante la utilización de un sistema de control con concentraciones conocidas y crecientes del antígeno. Los resultados se han expresado en picogramos de antígeno presente por ml de suero (pg/ml.). Un programa informático auxiliar facilita el cálculo de los resultados.

RESULTADOS

Distribución por genotipos

La distribución por genotipos se detalla en la tabla I. El genotipo 1b fue el más prevalente, representando el 38,4% de todos los casos, seguido de los genotipos 3a (23,1%) y 1a (13,5%).

Si clasificamos los pacientes en función de la presencia de coinfección por el VIH, se observa que los pacientes con el VIH presentan menos infecciones por genotipos del grupo 1 ($p < 0,05$).

Al agrupar los pacientes en función del sexo se observa que las mujeres están infectadas más frecuentemente por el genotipo 1b, asociado con una mayor proporción de pacientes coinfectados por el VIH de sexo masculino.

Relación entre la carga viral, el genotipo y la coinfección por el VIH

La variación de los valores de carga viral en función del genotipo del virus y de la coinfección por el VIH se detalla en la figura 1.

Relación entre la carga viral y el antígeno del core del VHC

Al comparar los valores de la carga viral con los de la detección del antígeno del core, se observa que existe una relación directa entre ambas variables (fig. 2) y una correlación aceptable (coeficiente de correlación ρ de Spearman de 0,614) (fig. 3).

Por otra parte, al analizar los datos en función del genotipo causante de la infección, se observa que esta correlación es mejor en los pacientes con genotipo 1 (0,766 frente a 0,430). Si tenemos en cuenta la coinfección por el VIH, se observa que existe una mejor correlación entre ambas técnicas en este tipo de pacientes (0,703 frente a 0,539).

DISCUSIÓN

La prevalencia de los diferentes genotipos del VHC depende del área geográfica. Los genotipos 1a y 1b son los que presentan mayor prevalencia en Estados Unidos y en buena parte de Europa. Sin embargo, el genotipo 2, que se ha descrito como prevalente en Estados Unidos y el Reino Unido, es muy poco frecuente en nuestro medio. El genotipo 4 ha sido descrito en Estados Unidos, en Oriente Medio y en África; se han observado algunos casos en nuestro país, incluyendo nuestra propia zona geográfica². Los genotipos 5 y 6 han sido comunicados en Sudáfrica y en Hong Kong, respectivamente³.

En un estudio multicéntrico llevado a cabo en donantes de sangre en España, se observó que el genotipo 1 era el más prevalente (85,5%), sobre todo el subtipo 1b, seguido de los genotipos 3 (4,4%), 2 (4,1%), 4 (3,4%) y 5 (0,5%). En este estudio se comprobó también un 2,1% de infecciones mixtas⁴. En otro estudio español se indicaba que el 72% de los pacientes con hepatitis crónica y el 90% de los pacientes con cirrosis hepática presentaban genotipo 1b⁵.

En nuestro estudio, en cambio, se ha observado una proporción mucho más elevada de pacientes con genotipo 3a, hecho probablemente relacionado con la ruta de transmisión ya que, como han comunicado Elghouzzi et al, los genotipos 1a y 3a se relacionan con los pacientes adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) y el 1b con transfusiones o infecciones nosocomiales⁶. Otros estudios han confirmado también la asociación entre el genotipo 3a y los pacientes ADVP⁷ y en pacientes infectados por el VIH^{8,9}.

Sin embargo, estos datos son variables, ya que en otro estudio realizado en pacientes españoles ADVP se ha observado una elevada proporción de infecciones por más de un genotipo (43,8% de los pacientes), sobre todo 1a y 1b (82,7%); destaca la escasa infección por el 3a (11,4%), a pesar de que muchos de estos pacientes estaban coinfectados por el VIH¹⁰.

En un análisis de 6.807 pacientes se observó que los varones y los infectados por el genotipo 1 presentaban una mayor carga viral que las mujeres y los infectados por los genotipos 2 y 3 ($p < 0,001$)¹¹. Por otra parte, se ha comprobado que los pacientes infectados por el genotipo 4 presentan una carga viral menor que con el resto de los genotipos^{12,13}, lo que concuerda con nuestros resultados.

En nuestro estudio se ha observado que los pacientes coinfectados por el VIH presentan una mayor carga viral en todos los genotipos y que los infectados por el genotipo 3a presentan una elevada carga viral, lo que va de acuerdo con los datos publicados previamente¹⁴. Pérez-Gracia et al han comunicado que existe una asociación entre los valores de ARN del VHC, el genotipo 3 y la coinfección por el VIH, así como entre la viremia y el genotipo 1b en pacientes no infectados por el VIH⁸.

La influencia de los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia en el grado de viremia del VHC es un hecho controvertido. Se ha comunicado que los pacientes con VIH presentan valores más elevados de ARN del VHC¹⁵; pero

recientemente se ha referido que estos tratamientos reducen la carga viral del VHC¹⁶, mientras que otros estudios indican que no modifica este parámetro¹⁷.

Recientemente, se ha introducido un método para la detección del antígeno del core viral en el suero de los pacientes con infección por el VHC¹⁸. Se ha comunicado que puede ser útil para la detección de casos de primoinfección en ausencia de anticuerpos^{19,20}, y muestra una sensibilidad del 97%, una especificidad del 100% y una buena correlación ($r = 0,627$) cuando se compara con la *nested* PCR²¹.

Lagging et al han realizado un seguimiento de 48 pacientes con infección por el VHC mediante la determinación de la carga viral, el antígeno del core y la histología hepática, y encontraron una buena correlación entre los dos primeros parámetros ($r = 0,8$). Estos autores han comunicado que los pacientes con una carga viral negativa tienen menos de 1 pg/ml de antígeno en el suero y relacionan 1 pg/ml a 1.000 U/ml. Sin embargo, no han encontrado ninguna asociación con la histología hepática²². En cambio, en otro estudio se ha comunicado que 1 pg/ml equivale a 8.000 U/ml y se plantea que esta metodología puede ser útil en la cuantificación del virus antes de la terapia y también en la evaluación de la respuesta al tratamiento. Los autores han recomendado que no se utilice esta técnica en pacientes con cargas virales inferiores a 20.000 U/ml, lo que limita en cierta manera su utilización en el control de la respuesta al tratamiento²³.

Los datos publicados concuerdan con nuestros resultados, aunque no hemos encontrado diferencias en función del genotipo y la coinfección con el VIH.

El VHC presenta características diferenciales y cambiantes en función de la zona geográfica y del tipo de paciente²⁴. Este trabajo aporta datos a la epidemiología de la enfermedad en nuestro medio. Concluimos que, aparte de la optimización de las técnicas ya establecidas, la detección del antígeno del core viral contribuye a validar una técnica sencilla y automatizable que puede mejorar el manejo clínico de estos pacientes y complementar los datos ya disponibles. Puede ser útil para el diagnóstico precoz de la primoinfección²⁵, pero debe estudiarse más profundamente en otras situaciones, como su utilidad en la valoración de la respuesta al tratamiento²⁶. Es necesario, pues, la realización de más estudios que permitan determinar su verdadero valor en distintos grupos de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Cooreman MP, Schoondermark Van de Ven EM. Hepatitis C virus: biological and clinical consequences of genetic heterogeneity. *Scand J Gastroenterol* 1996;218:106-15.
- Sánchez-Quijano A, Abad MA, Torronteras R, Rey C, Pineda JA, Leal M, et al. Unexpected high prevalence of hepatitis C virus genotype 4 in Southern Spain. *J Hepatol* 1997;27:25-9.
- Cha TA, Beall B, Irvine J, Kolberg J, Chien D, Kuo G, et al. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7144-8.

4. León P, López JA, Amela C, Elola C, Echevarría JM. Prevalencia de tipos del virus de la hepatitis C en donantes de sangre españoles: resultados de un estudio multicéntrico de ámbito estatal. Grupo Español de Estudio de Donantes de Sangre en Riesgo de Transmisión del VHC. (GEDSRT-VHC). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17:448-53.
5. López Labrador FX, Ampurdanes S, Forns X, Castells A, Sáiz JC, Costa J, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol* 1997;27:959-65.
6. Elghouzzi MH, Bouchardeau F, Pillonel J, Boiret E, Tirtaine C, Barlet V, et al. Hepatitis C virus: routes of infection and genotypes in a cohort of anti-HCV-positive French blood donors. *Vox Sang* 2000;79:138-44.
7. Pawlotsky JM, Taskiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *C J Infect Dis* 1995;171:1607-10.
8. Pérez-Gracia T, Galán F, Fernández-Gutiérrez C, Girón JA, Rodríguez-Iglesias M. Relationship of hepatitis C viremia to HIV state and to infection by specific hepatitis C genotypes. *Liver* 1999;19:288-93.
9. Rubio M, Rubio C, Nogués A, Manonelles A. Genotipos del virus de la hepatitis C. Estudio de 302 pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc)* 2001;116:650-1.
10. Bravo R, Soriano V, García-Samaniego J, González J, Castro A, Colmenero M, et al. Prevalencia de los genotipos del virus de la hepatitis C en drogadictos españoles con hepatitis crónica C. Grupo Español para el Estudio de las Hepatitis víricas en Pacientes VIH +. *Rev Clin Esp* 1996;196:673-7.
11. Blatt LM, Mutchnick MG, Tong MJ, Klion FM, Lebovics E, Freilich B, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J Viral Hepat* 2000;7:196-202.
12. Smith DB, Davidson F, Yap P, Brown H, Kolberg J, Detmer J, et al. Levels of hepatitis C virus in blood donors infected with different viral genotypes. International HCV Collaborative Study Group. *J Infect Dis* 1996;173:727-30.
13. Lau JY, Davis GL, Prescott LE, Maertens G, Lindsay KL, Qian K, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen at tertiary referral centers in the United States. Hepatitis Interventional Therapy Group. *Ann Intern Med* 1996;124:868-76.
14. Bonacini M, Govindarajan S, Blatt LM, Schmid P, Conrad A, Lindsay KL, et al. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *J Viral Hepat* 1999;6:203-8.
15. Goedert JJ, Hatzakis A, Sherman KE, Eyster ME. Lack of association of hepatitis C virus load and genotype with risk of end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus coinfection. *J Infect Dis* 2001;184:1202-5.
16. Neau D, Trimoulet P, Winnock M, Le-Bail B, Schvoerer E, Legrand E, et al. Impact of protease inhibitors on intrahepatic hepatitis C virus viral load. *AIDS* 2001;15:1736-8.
17. Torre D, Tambini R, Cadario F, Barbarini C, Moroni M, Basilico C. Evolution of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus patients treated with highly antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2001;33:1579-85.
18. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999;37:1802-8.
19. Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, De Luigi C, et al. Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol* 2001;39:3110-4.
20. Kurtz JB, Boxall E, Qusir N, Shirley J, Coleman D, Chandler C. The diagnostic significance of an assay for total hepatitis C core antigen. *J Virol Methods* 2001;96:127-32.
21. Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, Yamaguchi K, Yagi S, Kiyosawa K, et al. Evaluation of a new enzyme immunoassay for Hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology* 2000;32:388-93.
22. Lagging LM, García CE, Westin J, Wejstal R, Norkrans G, Dhillon AP, et al. Comparison of serum hepatitis C virus RNA and core antigen concentrations and determination of whether levels are associated with liver histology or affected by specimen storage time. *J Clin Microbiol* 2002;40:4224-9.
23. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36:211-8.
24. Mellor J, Hawkins A, Simmonds P. Genotype dependence of hepatitis C virus load measurement in commercially available quantitative assays. *J Clin Microbiol* 1999;37:2525-32.
25. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(Suppl 1):S65-73.
26. Lunel F, Veillon P, Payan C. Hepatitis C virus RNA and HCV core antigen kinetics predict the efficiency of alfa-interferon and ribavirin therapy in naive patients infected by hepatitis c virus genotype 2 or 3 [abstract V-235]. 42nd ICAAC Abstract. American Society for Microbiology, September 27-30, San Diego, p. 426.