

# Original

## Serotipaje del virus de la hepatitis C en Baleares

Matilde Sedeño, Martín Mascaró, Elena Franco, Enrique Girona\*

### Introducción

El VHC es un virus RNA de una sola hélice, encapsulado, que posee una importante homología con la familia flaviridae (1). En 1989, a raíz del aislamiento por parte de la Compañía Chiron de la clona 5-1-1, se introdujo el test anti-VHC de primera generación ( Ortho HCV ELISA test System, HCV 1.0), usando un antígeno recombinante c 100 -3. constituyendo un paso importantísimo en la prevención de la transmisión del VHC por la transfusión de sangre (que resultó ser el agente responsable de la mayoría de hepatitis crónica no A no B) y permitiendo filiar la mayoría de pacientes con hepatitis crónica no A no B. Posteriormente, en 1991, los test de 2ª generación que incorporan ensayos multiantigénicos usando c- 100- 3, c22-3 y c-200 mejoraron la sensibilidad y la especificidad en relación a los de 1ª generación ( Ortho HCV 2.0 ELISA Test System). Finalmente, en 1992, se introdujeron los tests de 3ª generación (ELISA HCV 3.0) usando c22-3, c200 y NS55 mejorando aún más la sensibilidad ( muy cercana al 100%) y la especificidad (73%), acortando el periodo ventana (2).

La prevalencia de VHC en los donantes de sangre es 0,09% según datos registrados por el Ministerio de Sanidad y Consumo en 1997. Mientras, la prevalencia en los donantes de sangre de Baleares fue de 0, 045 en el año 1999.

A partir de diferentes aislados de VHC se encontró que el genoma viral era altamente polimórfico, mostrando que solamente compartían el 68-70% de la secuencia global del genoma. Análisis filogenéticos derivados de secuencias de nucleótidos por parte del gen que codifica proteínas no estructurales (NS-5) probaron la evidencia de la presencia de 6 genotipos mayores en una muestra con 76 VHC (postransfusional y pacientes con hepatitis crónica) procedentes de todas las partes del mundo. La mayoría de estos genotipos se subdividen en subtipos, que llevan finalmente a 11 genotipos posibles. Esto ha sido posible mediante amplificación de la región no codificante 5' (5'NCR) y tipada por RFLP (Restricción Fragment Length Polymorphism). La electroforesis del DNA con Hae III/RSA I y Scr F1/Hinfl permitió identificar genotipos 1,2,3,4y 6 (3).

La necesidad de realizar pruebas de amplificación de nucleótidos de la región NS-5 seguido por secuenciación directa resulta muy complejo y además precisa de mucho tiempo para poder realizar el genotipaje del VHC en un gran número de casos, por lo que se desarrolló una técnica de serotipaje mediante ELISA: Murex HCV Serotyping 1-6 Assay. Existe además otra técnica de serotipaje por Immunoblot (HCV SIA, Chiron). (4,5,6,7,8,9) .

La importancia de determinar el serotipo, parece radicar en la diferente respuesta al interferón de los distintos serotipos (7,10,11,12).

La distribución geográfica de los diferentes genotipos muestra una mayor presencia de genotipos 1,2 y 3 en Estados Unidos, Francia, Italia, Escocia, Holanda y Finlandia. En Japón y Taiwán solamente existió genotipos 1 y2, si bien con posterioridad se ha descrito el genotipo 3 en Japón (4). Mientras en Hong-kong se encontraron 1,2 y 6. En Egipto la más frecuente fue del tipo 4 (3).

### Objetivo

El objetivo principal de este estudio ha sido determinar mediante tipaje serológico,

\*Fundació Banc de Sang i teixits de les Illes Balears

la variabilidad genética del Virus de la Hepatitis C (VHC) en nuestra Comunidad Autónoma, donde el número de turistas multiplica por once la población de derecho de las islas. Al mismo tiempo valoramos la proporción de muestras tipales por el método de serotipado (Murex) por su facilidad de realización (sensibilidad del test).

## Material y métodos

De un total de 37 muestras de donantes de sangre que fueron positivas por la técnica de ELISA (3ª Generación, Ortho Diagnostics Systems) y confirmadas con RIBA III más una muestra RIBA III indeter-

minada, se les ha realizado una técnica de ELISA para serotipaje de VHC 1- 6 (Murex).

De las 38 muestras, 27 corresponden a Mallorca, 5 a Menorca y 6 a Ibiza.

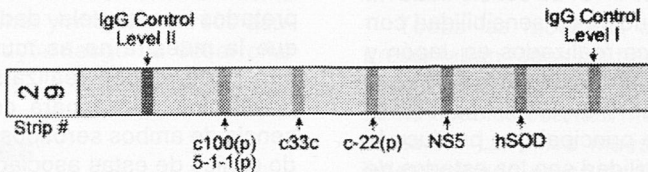
para valorar la técnica, dividimos según el número de bandas del RIBA III (test de confirmación) en 4 grupos:

GRUPO I: En el RIBA III presentaban todas las bandas (23 muestras)

GRUPO II: En el RIBA III presentaban 3 bandas (7 muestras)

GRUPO III: En el RIBA III presentaban 2 bandas (7 muestras)

GRUPO IV: En el RIBA III presentaban 1 banda (RIBA indeterminado) (1 muestra)



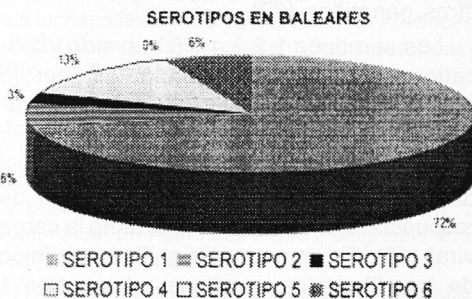
## Resultados

De las 38 muestras analizadas, 31 (81,6%) fueron tipadas, 5 no fueron tipables (13,1%) y 2 no cumplían criterios de validación (retestar con el doble de muestra).

El serotipo más frecuente fue el serotipo 1 (71%), seguido del serotipo 4 (12,9%), serotipo 2 y 6 ambos con 6,4% y finalmente serotipo 3 (3,2%).

Se encontró una asociación muy clara entre el número de bandas en el RIBA III y su posible tipificación, (ver tabla I)

En 7 casos (22,6%) se encontraron diferentes asociaciones de serotipos virales, estando el serotipo 1 presente en todos (Tabla II).



SEROTIPO	SEROTIPO	SEROTIPO	SEROTIPO	NO TIPABLE	RETESTAR
1	2	3	4	(+)	(+)
GRUPO 1	16	1	1	4	0
GRUPO 2	5	0	0	0	1
GRUPO 3	1	1	0	0	1
GRUPO 4	0	0	0	0	0
TOTAL	22 (57,6%)	2 (5,2%)	1 (2,6%)	4 (10,5%)	2 (5,2%)

(\*) A retestar con doble de muestra. No cumple criterios de validación.

SEROTIPO 1	SEROTIPOS 1-2	SEROTIPOS 1-4	SEROTIPOS 1-6
GRUPO 1	10	3	2
GRUPO 2	4	0	0
GRUPO 3	1	0	0
GRUPO 4	0	0	0
TOTAL	15	3	2

Tabla II

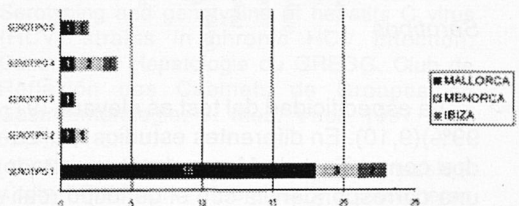


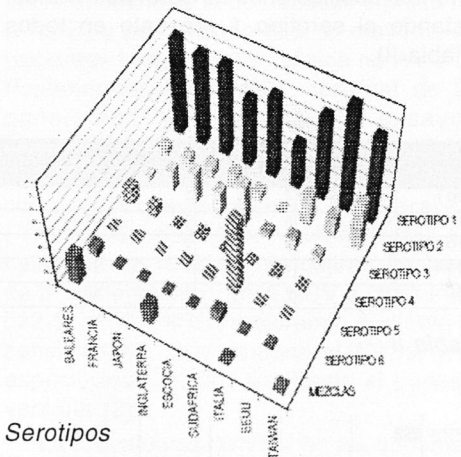
Tabla I

Al estudiar los casos por las Islas encontramos:

	1+2	1+4	1+6
Mallorca	2	1	1
Menorca	1	1	
Ibiza			1

## Discusión

El kit de ELISA para serotipaje 1 - 6 de la casa Murex es un test sencillo y rápido para serotipaje del VHC. La sensibilidad ha sido del 81%, estudios de sensibilidad con esta misma técnica realizados en Japón y Francia arrojaron unos resultados de sensibilidad parecidos (78 y 70% respectivamente). El motivo principal que produce la pérdida de sensibilidad son los estados de inmunodeficiencias, especialmente coinfecciones con HIV (4,5). En nuestro caso, hemos encontrado una relación muy clara entre el número de bandas en el RIBA y el porcentaje de tipables.



Serotipos

La especificidad del test es elevada (97-99%)(9,10). En diferentes estudios realizados con el Test de Murex, ha demostrado una correspondencia con el genotipo realizado por técnicas de amplificación del 97% (13).

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos en otros países, observamos que el serotipo más frecuente es el serotipo 1 (en todos los países estudiados excepto Egipto -mayor frecuencia de serotipo 4- y sudáfrica -más frecuente el serotipo 5-).

También hallamos una frecuencia relativamente alta de serotipos 4 y 6, si bien hemos de tener en cuenta que el número de casos es escaso.

Un hallazgo que nos ha sorprendido ha sido la alta tasa de asociaciones de serotipos (22%), más alta que en otros países de nuestro entorno (superior al 14% de Inglaterra) (3,4,5,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22), si bien, estos resultados deben ser interpretados con cautela, dado por una parte que la muestra no es muy grande, y por otra parte, deben realizarse estudios con predilución previa para confirmar la presencia de ambos serotipos (5). El significado clínico de estas asociaciones se desconoce, si bien, en un estudio realizado sobre pacientes VHC + hemofílicos y no hemofílicos, dió como resultado una mayor tasa de coinfecciones para hemofílicos cuando se compararon con no hemofílicos (21 vs 3%,  $p < 0.05$ ), la conclusión fue que la presencia de anticuerpos específicos contra genotipos múltiples en pacientes con infección persistente por VHC de un solo genotipo puede ser evidencia de superinfecciones ocultas o transitorias con otros genotipos (23).

Los serotipos 1,2,3,4 y 6 han sido implicados en los drogodependientes, por lo que no parece que haya ninguna asociación con un genotipo determinado (24).

La carga viral, el serotipo VHC y la dosis de interferón son factores predictores de respuesta, siendo el más importante la carga viral (10). En cuanto al significado clínico de los diferentes serotipos, el serotipo 1 parece asociarse a altos títulos de VHC-RNA y pobre respuesta a interferón (7). Con el serotipo 2, muy frecuente en países asiáticos, parece asociarse a VHC con afectación inmune, especialmente se asocia a crioglobulinemia y a una mejor respuesta al interferón (11,19), si bien posteriores estu-



dios no lo han confirmado (17,21). En un estudio publicado por Nakamura y cols (25) sobre 114 pacientes con hepatitis crónica, observó que el 78% de los pacientes con serotipo 3 respondieron a interferón comparado con el 21% con serotipo 2 y 12% con serotipo 1. El serotipo 3 ha sido el principal implicado en adictos a droga por vía parenteral en Italia (16). Este serotipo responde mejor a interferón que los serotipos 1 y 2 (21,25). En Francia, el serotipo 4 estuvo presente en las coinfección por HIV (5).

En cuanto a lesión histológica y progresión de la hepatopatía crónica, todos los serotipos producen exactamente el mismo tipo de lesión acinar y ninguna parece asociarse con un mayor riesgo de desarrollar cirrosis (16,17).

## Conclusiones

El serotipo 1 es el más frecuente en nuestra Comunidad, al igual que en otros

países de nuestro entorno (Inglaterra, Francia, Italia, USA, Escocia).

Hemos hallado todos los serotipos posibles exceptuando el serotipo 5 (el más frecuente en Sudáfrica).

En las 3 Islas estudiadas, el serotipo 1 ha sido el más frecuente. En Mallorca hemos encontrado los serotipos 1,2,3,4 y 6 en Menorca los serotipos 1,2 y 4, mientras que en Ibiza los serotipos hallados han sido el 1,4 y 6.

Hemos encontrado un alto número de asociaciones de serotipos (mezclas), si bien dicho hallazgo debe ser interpretado con cautela.

Todas las muestras con RIBA III que presentaban todas las bandas se pudieron tipar. Por el contrario, aumentó el número de no tipables cuantas menos bandas presentaron. La única muestra con RIBA III indeterminada no se pudo tipar.

La sensibilidad del test ha sido 81%.

## Bibliografía

- (1) Hepatitis y SIDA (2ª Edición). Pizaco J, Romero J.
- (2) Mitchell J. Nelles, (Ortho Diagnostics Systems Inc, Raritan, New Jersey): "Improved performance of a third generation multiantigen screening tests for hepatitis C virus". Symposium on Advances in HCV diagnosis and treatment. Barcelona, Spain 1993
- (3) Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, Mc Omish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, urdea MS. "Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region". Symposium on Advances in HCV diagnosis and treatment. Barcelona, Spain 1993
- (4) Kobayashi m, Chayama K, Arase Y, Tsubota A y col. "Enzyme-linked immunosorbent assay to detect hepatitis C virus serological groups 1 to 6". *J. Gastroenterol* 1999 Aug; 34 (4): 505-9.
- (5) Leruez Ville M, Nguyen QT, Cohen P, Cocco S, Nouyou M, Ferriere F, Deny P. "Large-scale analysis of hepatitis C virus serological typing assay: effectiveness and limits". *J. med. Virol.* 1998 May; 55 (1): 18-23.
- (6) Van Doorn LJ, Kleter B, Pike I, Quint W. "Analysis of hepatitis C virus isolates by serotyping and genotyping". *J. Clin. Microbiol.* 1996, Jul; 34(7): 1784-7
- (7) Sherman KE, Mendenhall C, thee DL, O'Brien J, Rouster SD. "Hepatitis C serotypes in nonalcoholic and alcoholic patients". *Dig. Dis. Sci.* 1997 Nov, 42 (11): 2285-91.
- (8) León P, López JA, Elola C, Quan S, Echevarría JM. " typing of hepatitis C virus antibody with specific peptides in seropositive blood donors and comparison with genotyping of viral RNA". *vox Sang* 1997; 72 (2):71-5.
- (9) Halfon P, Ouzan D, Khiri H, Feryn JM. " Serotyping and genotyping of hepatitis C virus (HCV) strains in chronic HCV infection. Commission Hepatologie du GREGG. Club de Reflexión des Cabinets de Groupes en GastroEnterologie. *J. Med. Virol.* 1997 Aug, 52(4):391-5.
- (10) Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, Imazeki F y cols. " Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. tokyoChiba hepatitis Research Group. *Gastroenterology* 1997 Aug; 113(2): 558-66.

- (11) Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M y cols. " Evaluation of a novel serotyping system for hepatitis C virus: strong correlation with standard genotyping methodologies". *J. Clin. microbiol.* 1995 Nov;33 (11): 2978-83.
- (12) preston FE, Jasvis LM, Makris M, Philp L, Underwood JC, Ludlam CA, Simmonds P. " Heterogeneity of hepatitis C virus genotypes in hemophilia: relationship with chronic liver disease". *Blood* 1995 mar 1;85(5):1259-62.
- (13) Gish RG, Qian KP, Quan S, Xu YL Pike I, Polito A, DiNello R, Lau YJ. "Concordance between hepatitis C virus serotyping assays". *J. Viral Hepat.* 1997; 4(6):421-2.
- (14) Tong CY, Hollingsworth RC, Williams H, Irving WL, Gilmore IT. "Effect of genotypes on the quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in clinical samples using the Amplicor HCV Monitor Test and the Quantiplex HCV RNA 2.0 assay (bDNA)". *J. Med. Virol.* 1998, jul;55(3):191-6.
- (15) Webber LM, Els S, Taylor MB, Grabow WO. "Assessment of commercial enzyme immunoassay for hepatitis C virus serotyping". *J. Clin. Pathol.* 1996 Dec; 49(12):994-997.
- (16) Guido M, Rugge M, Thung SN, Chemello L, Leandro G, Alberti A y cols. " Hepatitis C virus serotypes and liver pathology". *Liver* 1996 Dec, 16(6):353-7.
- (17) Romeo R, Colombo M, Rumi M, Soffredini R, Del Ninno E, Donato MF, Russo A, Simmonds P. " lack of association between type of hepatitis C virus, serum load and severity of liver disease". *J. Viral. Hepat* 1996 Jul; 3 (4): 183-90.
- (18) Mizoguchi N, Mizokami M, orito E, Shibata H, Shibata H. " Serologically defined genotypes of hepatitis C virus among Japanese patients with chronic hepatitis C". *J. Virol. Methods.* 1996 Apr 26;58 (1-2): 71-9.
- (19) Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, Mellor J, Yahhia MB, André C, Voisin MC, Intrator L, Zafrani ES, Duval J y cols. "Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes". *Ann Intern Med* 1995 Feb 1, 122 (3): 169-73.
- (20) Apichartpiyakul C, Mijajima H, Doi H, Mizokami M, Homma M, Hotta H. "Frequent detection of hepatitis C virus subtype 3<sup>a</sup> (HCV-3<sup>a</sup>) isolates in Thailand by PCR using subtype-specific primers". *Microbiol. Immunol.* 1995,39(4):285-9.
- (21) Horiike N, Masumoto T, Michitaka K, Kurose K, Akbar SM, Onji M. "Response to interferon in chronic hepatitis C due to mixed genotype infection ". *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1996, Apr, 11(4):353-7.
- (22) Jarvis LM, Watson HG, Mc omish F, Peutherer JF, Ludlam CA, Simmonds P. " Frequent reinfection and reactivation of hepatitis C virus genotypes in multitransfused hemophiliacs ". *J. Infect. Dis.* 1994 Oct;170 (4): 1018-22.
- (23) Toyoda H, Fukura Y, Hayakawa T, Kumada T, Nakano S, Takamatsu J, Saito H. " Presence of multiple genotype-specific antibodies in patients with persistent infection with hepatitis C virus (HCV) of a single genotype: evidence for transient or occult superinfection with HCV of different genotypes. *Am. J. Gastroenterol* 1999 Aug; 94(8): 2230-6.
- (24) Pawlowska M, Halota W, Bulik F, Topczewska-Staubach E. " Hepatitis C virus (HCV) serotype in the asymptomatic HCV- infected patients from selected groups". *Arch.Inmunol. Ther. Exp. (Warsz)* 1997, 45 (5-6): 455-7.
- (25) Nakamura H, Kako M, Aikawa T, Mayumi M, Kanai K. " HCV serotype and IFN response". *Nippon Rinsho* 1994 Jul; 52 (7): 1734-7.