

Dificultades en la detección de infecciones con múltiples genotipos del virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (HCV) fue identificado por primera vez en los EE.UU. en el año 1989 como el mayor causante de las llamadas hepatitis no A no B post transfusionales. En aproximadamente el 85% de los casos, el sistema inmune no es capaz de erradicar la infección y el virus persiste en el individuo. Los individuos con infección crónica tienen un riesgo elevado de desarrollar enfermedades hepáticas crónicas con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen la cirrosis y el hepatocarcinoma¹.

El virus de la hepatitis C presenta una variabilidad genética muy amplia que da como resultado la existencia de diversos genotipos y subtipos virales.

A pesar de que el genotipo de HCV no predice la progresión de la infección, se correlaciona con la respuesta al tratamiento de manera independiente y determina la duración y la dosis de droga a administrar². Como predictor independiente de la respuesta a la terapia antiviral, se han propuesto distintos regímenes terapéuticos en relación con el genotipo infectante. El genotipo 1 está asociado a una menor respuesta, por lo cual son necesarias mayores dosis y tiempos de tratamiento más prolongados. Por el contrario, los genotipos 2 y 3 necesitan menores dosis y son suficientes tiempos más cortos para lograr la respuesta al antiviral².

La ausencia de inmunidad protectora luego de la exposición inicial al virus posibilita las reinfecciones con otras cepas de HCV. En consecuencia, en poblaciones de individuos con mayor riesgo de exposición (drogadictos endovenosos, hemofílicos, pacientes en hemodiálisis) es frecuente observar infecciones mixtas de HCV o con múltiples genotipos del virus³⁻⁶.

En presencia de infecciones mixtas, algunas cepas pueden prevalecer sobre otras y desplazarlas, resultando estas últimas indetectables por las técnicas utilizadas habitualmente en la genotipificación. Sin embargo, determinadas presiones de selección pueden traer aparejado el resurgimiento de la cepa desplazada, que puede influir en la respuesta a la terapia antiviral^{3,4}. En consecuencia, la detección de infecciones con múltiples genotipos de HCV tiene relevancia clínica y puede ser importante para la elección de un régimen terapéutico adecuado, pues existe la posibilidad de que alguna cepa minoritaria de HCV responda desfavorablemente a la terapéutica y altere la respuesta al tratamiento.

Diversas técnicas han sido propuestas para poder detectar las infecciones en las que intervienen múltiples genotipos. Entre ellas se pueden mencionar las técnicas con sondas de hibridación específicas (*INNO-LIPA Innogenetics*)^{3,6}, cortes de productos de amplificación obtenidos por PCR con enzimas de restricción específicas para cada genotipo (RFLP)^{7,8}, PCR con *primers* específicos para los distintos genotipos⁹, el clonado de productos de amplificación con posterior análisis de secuencias¹⁰ y la serotipificación⁴, entre otras. Todas ellas varían en la sensibilidad y capacidad para detectar las cepas minoritarias, por lo que se observa una amplia variación en los datos informados de prevalencia de infecciones mixtas por HCV^{6,8}.

El principal inconveniente de las técnicas de genotipificación que se utilizan hasta el momento está constituido por la imposibilidad de detectar con la misma habilidad distintos genotipos presentes que se hallen en diferente proporción en la muestra^{4,7,8}. Todas las técnicas de genotipificación requieren un paso inicial de amplificación de material genético a través del cual se generan cantidades de virus

adecuadas para realizar el estudio. El análisis se realiza luego de una amplificación por PCR de las especies virales presentes en el plasma/suero del individuo infectado. Desde un principio, distintas características de la técnica de PCR y los *primers* elegidos para realizarla determinarán las especies virales que se amplifiquen para ser genotipificadas posteriormente. La información generada por estos procedimientos estará siempre limitada o circunscrita por la elección de la técnica de genotipificación utilizada.

En el caso de individuos infectados con múltiples genotipos virales, el material genético amplificado puede haber sido generado por la especie predominante, aquella de mayor concentración en el plasma, por aquella especie de mayor afinidad por los *primers* elegidos para la amplificación, o por la especie que haya sido favorecida por las características de la técnica desarrollada (métodos de extracción de ARN, retrotranscripción, temperaturas, etc). Asimismo, a pesar de que la secuenciación de distintas regiones del genoma es la técnica que brinda mayor exactitud y precisión acerca del genotipo viral, siempre involucra un paso previo de amplificación por PCR que estará condicionado por las ventajas y desventajas asociadas a esta técnica.

Por cualquiera de estas causas, el análisis del genotipo podría no estar reflejando la verdadera situación del individuo, y la información clínica generada podría resultar equívoca y provocar una falla terapéutica.

Recientemente, un grupo de investigadores aplicó una metodología en la cual, eliminando la cepa predominante amplificada mediante cortes específicos con enzimas de restricción, purifica y concentra los amplificados que no fueron digeridos y realiza un clonado de los mismos para identificar los genotipos mediante un análisis de sus secuencias¹¹. Sin embargo, el límite de sensibilidad sumado a determinadas combinaciones de genotipos que no pueden ser discriminadas y las distintas proporciones en que se encuentran los distintos genotipos sigue siendo una limitación que dificulta revelar las infecciones mixtas.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que las especies virales que se determinan en el plasma provienen mayoritariamente del hígado, pero que existen sitios extrahepáticos de replicación viral que podrían actuar como reservorio. A pesar de que las células mononucleares periféricas (CMP) no son el sitio principal de replicación del virus, distintas publicaciones indican que existe replicación independiente en estas células¹², incluso con persistencia del virus luego de la desaparición de niveles detectables de viremia en plasma. Se demuestra la presencia de pequeñas cantidades de ARN de HCV persistentes en macrófagos y linfocitos, hasta 60 meses después de terminado el tratamiento exitoso con respuestas virales sostenidas¹³. Los autores advierten sobre el hecho de que estos reservorios pueden constituir una fuente a partir de la cual se propague el virus determinando una reactivación de la enfermedad ya sea espontánea o por finalización del tratamiento. La evidencia de que el HCV es capaz de replicar en CMP de pacientes infectados crónicamente fue creciendo, sustentada, sobre todo, por el hallazgo de la compartimentalización del HCV. Distintos investigadores hallaron en una proporción significativa de individuos, variantes virales altamente divergentes en las CMP, que no fueron halladas en el plasma y que pudieron haber sido adquiridas por coinfecciones o superinfecciones^{14, 15}. Incluso fue posible encontrar genotipos distintos en plasma y CMP en el 9% de los casos estudiados¹⁴. A través de una técnica de cultivo prolongado de CMP derivadas de pacientes hemofílicos con infección crónica por HCV¹⁶, se identificaron especies virales adicionales a aquellas detectadas en plasma. A pesar de no haber estudiado la variabilidad viral, los casos hallados con genotipos discordantes en plasma y cultivos de CMP en nuestros experimentos, también sustentan el hecho de que independientemente de las cepas virales predominantes en hepatocitos, podemos hallar otras cepas que sólo se harán evidentes durante el cultivo (Parodi et al, enviado a *J Clin Microbiol*, 2006).

Sin importar la técnica utilizada, la información del análisis de genotipo obtenida debe ser evaluada en el contexto de cada paciente, de la vía de infección y de las conductas de riesgo, teniendo en cuenta que la especie viral detectada puede estar acompañada por otras especies virales concomitantes. Es lógico plantear si el análisis del genotipo viral necesita ser repetido por la posibilidad de que la cepa detectada varíe debido a cambios en el entorno del paciente, durante el tratamiento o durante la progresión de la enfermedad.

Por lo anteriormente expuesto, encontrar la manera de desenmascarar la presencia de estas cepas minoritarias en las infecciones por HCV constituye un desafío de gran trascendencia e importancia clínica, sobre todo cuando el estudio involucra poblaciones de individuos que fueron expuestos al virus en repetidas ocasiones.

Cecilia Parodi, Patricia Baré

Instituto de investigaciones Hematológicas,
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

e-mail: pbare@hematologia.anm.edu.ar

1. Lauer GM and Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.
2. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al; PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-55.
3. Eyster 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.
4. Schroter M, Feucht HH, Zollner B, Schafer P, Laufs R. Multiple infections with different HCV genotypes: prevalence and clinical impact. *J Clin Virol* 2003; 27: 200-4.
5. Preston FE, Jarvis LM, Makris M, et al. Heterogeneity of hepatitis C virus genotypes in hemophilia: relationship with chronic liver disease. *Blood* 1995; 85: 1259-62.
6. van Asten L, Prins M. Infection with concurrent multiple hepatitis C virus genotypes is associated with faster HIV disease progression. *AIDS* 2004; 18: 2319-24.
7. Quarleri JF, Bussy MV, Mathet VL, et al. In vitro detection of dissimilar amounts of hepatitis C virus (HCV) subtype-specific RNA genomes in mixes prepared from sera of persons infected with a single HCV genotype. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2727-33.
8. Qian KP, Natov SN, Pereira BJ, Lau JY. Hepatitis C virus mixed genotype infection in patients on haemodialysis. *J Viral Hepat* 2000; 7: 153-60.
9. Hu YW, Balaskas E, Furione M, 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.
10. Devereux H, Telfer P, Dusheiko G, Lee C. Hepatitis C genotypes in haemophilic patients treated with alpha-interferon. *J Med Virol* 1995; 45: 284-7.
11. Buckton AJ, Ngui SL, Arnold C, et al. Multitypic hepatitis C virus infection identified by real-time nucleotide sequencing of minority genotypes. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2779-84.
12. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000; 181: 442-8.
13. Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 106-14.
14. Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005; 79: 6349-57.
15. Zehender G, De Maddalena C, Bernini F, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus quasispecies in blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemic syndrome. *J Virol* 2005; 79: 9145-56.
16. Baré P, Massud I, Parodi C, Belmonte L, et al. Continuous release of Hepatitis C virus by peripheral blood mononuclear cells and B- lymphoblastoid cell line cultures, derived from HCV infected patients. *J Gen Virol* 2005; 86: 1717-27.