

Caracterización molecular del virus de la hepatitis C en Montevideo-Uruguay

*Lic. Rodney Colina¹, Dres. María Cristina Mogdasy²,
Juan Cristina³, María del Rosario Uriarte⁴*

Resumen

Introducción: las hepatitis causadas por el virus de la hepatitis C (VHC) se han transformado en uno de los principales problemas asociados a las infecciones emergentes. El VHC posee una alta variabilidad genética identificándose desde su descubrimiento a la fecha seis tipos principales y un número creciente de subtipos virales asociados a diferente respuesta al tratamiento y a la evolución natural de la enfermedad.

Objetivo: contribuir al diagnóstico, al seguimiento de los infectados y al conocimiento de la epidemiología a través del análisis molecular determinando el genotipo y la carga viral.

Material y método: se analizaron las muestras de 175 pacientes referidos entre marzo de 1997 y junio de 2001 para el diagnóstico de infección por VHC. En todos los casos se realizó determinación de anticuerpos por enzima inmuno análisis (ELISA) e inmunoblot y amplificación del genoma de VHC mediante técnicas de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). A una submuestra de pacientes PCR positivos se determinó el genotipo y carga viral.

Resultados: se estableció viremia en 125 pacientes de un total de 175 (173 con serología positiva y dos casos con serología negativa para VHC). El análisis de los polimorfismos de restricción (RFLP's) y de la secuencia nucleotídica en 51 portadores crónicos mostró la siguiente distribución de genotipos y sus correspondientes subtipos: a) genotipo 1: 35 casos [subtipos 1a (17), 1b (16), variante (Mon1 y Mon2)]; b) genotipo 2: 3 casos [(subtipos 2a (1) y 2b (2)) y c) genotipo 3: 13 casos [subtipos 3a (13)].

Conclusiones: en el presente trabajo se muestra la importancia de la implementación de técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico y seguimiento de portadores de HVC, constituyendo una nueva herramienta, altamente precisa, sensible y específica. La gran capacidad analítica, a través de la secuenciación automática y el posterior análisis filogenético, nos ha permitido identificar en dos pacientes una nueva variante genética de HCV que no había sido descrita, y que plantea nuevas interrogantes. Estas fueron publicadas e ingresadas al Gen-Bank con los nombres Mon 1 y Mon 2. Con respecto a la determinación de la carga viral no se evidenció ningún tipo de correlación entre el genotipo infectante y el valor de carga obtenido, siendo por ello la viremia genotipo independiente.

Palabras clave: HEPACIVIRUS - genética.
HEPATITIS C - genética.
HEPATITIS C - virología.
GENOTIPO.
URUGUAY.

1. Licenciado en Biología. Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos y Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

2. Médico Microbiólogo, Jefe Médico del Laboratorio de Análisis Clínicos y Consultante de Enfermedades Infecciosas de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos.

3. Doctor en Ciencias Biológicas. Director del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN). Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

4. Doctor en Ciencias Biológicas. Investigador de PEDECIBA.

Responsable del Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos.

Departamentos e Instituciones Responsables: Laboratorio de Biología Molecular. Asociación Española Primera de Socorros Mutuos. Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Correspondencia: Lic. Rodney Colina
Charrúa 1831/201. Montevideo, CP: 11100
e-mail: rcolina@asesp.com.uy

Recibido: 13/12/01.

Aceptado: 12/04/02.

Introducción

Las hepatitis causadas por el virus de la hepatitis C (VHC) se han transformado en uno de los principales problemas de enfermedades infecciosas emergentes, estimándose a nivel mundial 170 millones de individuos infectados⁽¹⁾. No existen datos en nuestro país sobre la prevalencia de la infección por VHC en la población general. Los estimados por tamizaje en bancos de sangre muestran una seroprevalencia menor a 2%⁽²⁾. El VHC es reconocido como la principal causa de hepatitis crónica constituyendo 70% de las mismas y 20% de las hepatitis agudas. De las hepatitis crónicas, 20% evoluciona a la cirrosis hepática y 4% al carcinoma hepato-celular, siendo por ello una de las razones más frecuentes de indicación de trasplante⁽¹⁾.

La infección ocurre mayoritariamente luego de la exposición directa parenteral o percutánea. De acuerdo con ello, los receptores de sangre o sus derivados, los usuarios de drogas intravenosas, los pacientes en hemodiálisis así como los que sufren accidentes por punción con agujas contaminadas, representan los grupos de mayor incidencia. Su vía de transmisión reconocida es fundamentalmente sanguínea.

El VHC pertenece a la familia Flaviviridae y fue descubierto en 1989 mediante técnicas de clonación y secuenciación ya que hasta la fecha no ha podido ser aislado en cultivos celulares⁽³⁾. El genoma viral está constituido por una monocadena positiva de ácido ribonucleico (ARN) de aproximadamente 9.400 nucleótidos caracterizada por una alta variabilidad genética como otros virus de ARN. Los aislamientos de VHC indican la presencia de distintos niveles de variabilidad genética: tipo, subtipo y quasiespecies⁽⁴⁾. Basándose en esta variabilidad el VHC ha sido clasificado en seis tipos mayoritarios (del 1 al 6) y dentro de cada uno de estos en subtipos denominados 1a, 1b, 2a, 2b, etcétera. La literatura indica que la distribución de los genotipos se presenta en forma diferencial dependiendo de la región geográfica. Los genotipos también han sido asociados a la diferente respuesta al interferón (IFN)⁽⁵⁻⁷⁾ y a la combinación IFN/ribavirina⁽⁸⁾.

La metodología diagnóstica utilizada hasta el presente para el tamizaje diagnóstico es la serología. Ella permite la detección de anticuerpos e indica la exposición previa del paciente al virus, pero no brinda información sobre la actividad replicativa del mismo. Las técnicas de biología molecular que analizan los ácidos nucleicos (ADN y ARN) han sido la herramienta que ha permitido conocer la existencia del VHC a través de la identificación de su genoma. A nivel diagnóstico han contribuido a la determinación de la persistencia del virus en la persona infectada, a establecer su genotipo así como a cuantificar el virus circulante^(9,10).

Con el fin de contribuir al diagnóstico clínico y a una mejor comprensión de la epidemiología de la infección por

VHC en Uruguay, se implementó una metodología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la identificación directa del genoma de VHC y su posterior tipificación con gran especificidad y sensibilidad⁽¹¹⁻¹³⁾. En el presente trabajo se exponen los resultados de la detección molecular del VHC mediante la técnica de PCR en 175 pacientes y la tipificación a través del análisis de los polimorfismos de restricción (RFLP's) y secuenciación, en una muestra preliminar, de 51 portadores crónicos de dicho virus.

Material y método

Muestra estudiada: en el período comprendido entre el 1° de abril de 1997 al 30 de junio de 2001 se analizaron 341 muestras de sueros provenientes de 175 pacientes enviados al Laboratorio de Análisis Clínicos-Sección Biología Molecular de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos (AEPSM) procedentes de ésta y de otros centros asistenciales de Montevideo, Uruguay.

Estudios serológicos y moleculares: a todos los pacientes se les determinó la presencia de anticuerpos para VHC mediante test de Elisa y se confirmó a través de inmunoblot (Lia Tek, Organon Teknica). En todos los casos se realizó la amplificación del genoma del virus de VHC mediante las técnicas de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

A una submuestra de pacientes PCR positivos para VHC se determinó el genotipo y la carga viral.

Desarrollo de metodología molecular para el diagnóstico y tipificación del virus de VHC: se implementó la técnica de transcripción reversa (RT)-PCR para la amplificación del genoma viral seguida del análisis de RFLP's y la secuenciación nucleotídica para la tipificación viral.

A) Amplificación del genoma de VHC mediante RT-PCR: partiendo de 100 µl de plasma se aisló ARN total por el método del Trizol y se realizó la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN copia) mediante transcripción reversa. Se amplificó a través de la técnica de nested-PCR (PCR anidado) una región compartida por todos los tipos de VHC (región conservada del genoma denominada 5' Non-Coding Region o 5'NCR) utilizando los iniciadores específicos 209, 939 y 211, 940 como ha sido descrito previamente por Chan y colaboradores en 1992⁽¹¹⁾. A efectos de evitar resultados falsos positivos o negativos se tomaron las siguientes precauciones en el laboratorio: se establecieron dos áreas independientes: 1) una de preamplificación donde se realizó la extracción de ARN, la síntesis del ADNc y la preparación de las soluciones de los reactivos para la reacción de PCR; 2) en el área de posamplificación se localizó el termociclador (modelo Perkin-Elmer 9600 y

2400) y se realizaron las electroforesis en geles de agarosa, las digestiones de los productos amplificados y la secuenciación (ABI 310 Perkin Elmer); 3) en cada experimento se utilizó, como mínimo, un control negativo de amplificación proveniente de un paciente sano y un control negativo de la reacción.

Los productos de la amplificación por nested-PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3%, observándose en los casos positivos una banda de 250 pares de bases (pb) correspondientes al genoma de VHC. Se determinó la especificidad de la técnica de RT-PCR amplificando inicialmente muestras de ARN provenientes de sueros de 15 pacientes positivos y 10 pacientes negativos para VHC, que fueron previamente evaluados por al menos dos reactivos comerciales. Dicha especificidad fue confirmada por el análisis y comparación de las secuencias nucleotídicas de los productos de PCR obtenidos, con secuencias del banco de datos pertenecientes a la región 5'NCR de VHC. La sensibilidad de la misma se determinó amplificando diluciones seriadas de sueros de cuatro muestras PCR positivos previamente cuantificados (VHC monitor 2.0 Roche), que representando los genotipos encontrados fueron seleccionados por el número de copias que poseen.

B) Tipificación de VHC a través del análisis de polimorfismos de restricción (RFLP's: Restriction fragments length polymorphisms) y secuenciación automática:

La tipificación del virus VHC se realizó a través del análisis de polimorfismos de restricción y secuenciación automática del producto de 250 pb previamente obtenido por RT-PCR.

Los productos del nested-PCR provenientes de 51 casos VHC positivos fueron sometidos a dos digestiones simultáneas con las siguientes enzimas de restricción: a) HaeIII y RsaI y b) BstI y HinfI. En los casos en que estas digestiones identificaron los genotipos 1, 2 o 3, se realizó una tercera digestión a partir del producto de PCR con las enzimas ScaFI o Bst I para establecer el subtipo. Las reacciones se realizaron a 37°C durante cuatro horas de acuerdo a lo descrito por Davidson y colaboradores en 1995⁽¹³⁾. Los productos de la digestión fueron resueltos en gel de agarosa al 4% teñido con una solución de bromuro de etidio de 0,5 (g/ml, visualizados bajo luz UV y analizados en el procesador de imágenes Pharmacia Biotech (modelo Image Master VDS).

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados bidireccionalmente mediante el método del dideoxínucleótido en un secuenciador automático ABI 310 PE. Las secuencias obtenidas de cada paciente fueron comparadas con secuencias correspondientes a cepas de VHC de distintos tipos aisladas en diversas regiones geográficas del mundo. Las secuencias fueron primeramente alineadas utilizando el programa Clustal W. A continua-

ción se creó una matriz de distancias genéticas por el modelo Kimura-dos parámetros que se utilizó en la generación de árboles filogenéticos mediante el método de Neighbour-Joining. Estos métodos fueron implementados utilizando el programa Mega⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. El ARN del VHC fue cuantificado en los 51 pacientes mediante el uso de un kit comercial VHC monitor 2.0 Roche (COBAS Amplicor) con una linealidad de 650-850.000 UI/ml de plasma⁽¹⁷⁾.

Resultados

Se estudiaron 175 pacientes. La distribución por sexo en la muestra fue de 72,5% del sexo masculino y 27,5% del sexo femenino con un promedio de edad de 35,1 años en el caso de los hombres y 46,5 años en las mujeres. Cuatro pacientes fueron detectados por tamizaje en bancos de sangre; dos cursaban un episodio agudo de hepatitis; seis con antecedentes de drogadicción, VIH positivos y con enzimas normales y los restantes presentaban elevación de los niveles de transaminasas.

Serología: 1) Los 175 pacientes analizados correspondieron a: 173 pacientes con serología reactiva para virus C; 2) dos pacientes que mostraron modificaciones enzimáticas hepáticas y hepatomegalia tenían serología no reactiva. De ellos, 125 fueron PCR positivo para VHC, incluyendo los dos pacientes con serología negativa. En tanto 50 no presentaron amplificación del genoma correspondiente a dicho virus. La región 5'NCR del genoma de VHC se evidenció en los casos positivos por una banda de 250 pb luego del PCR anidado (figura 1). Nuevas muestras de 70 pacientes PCR positivos se obtuvieron en el

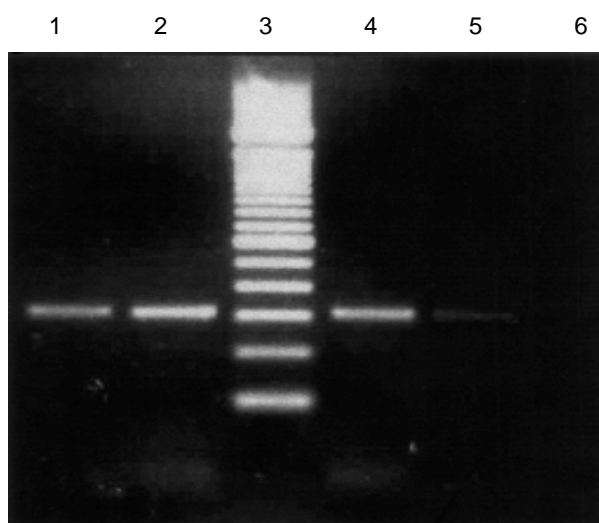


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR para el virus de la hepatitis C. Carriles: 1=control (+); 2, 4 y 5 = pacientes HCV (+); 6=control (-); 3: ADN de 100 pb.

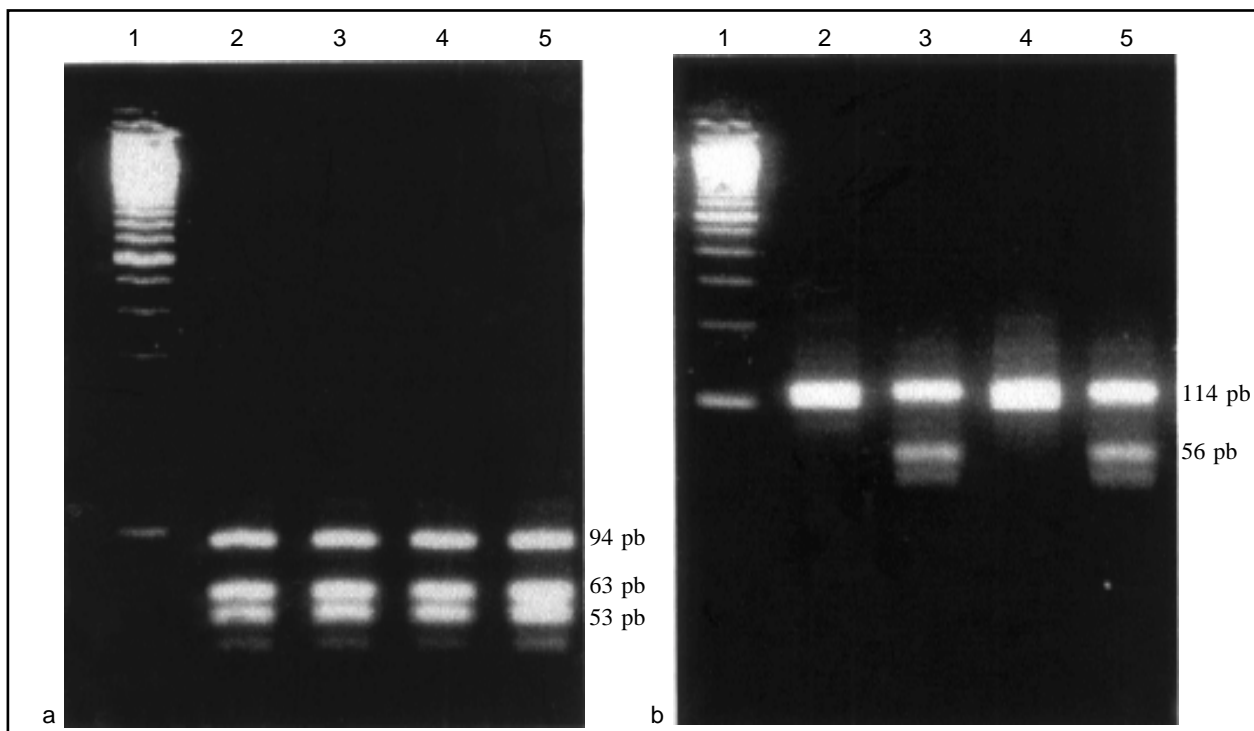


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR digeridos con las enzimas de restricción: a) BstO1 – Hinfi y b) HaeIII – RsaI de cuatro pacientes HCV positivos (carriles 2, 3, 4 y 5). Carril 1: peso molecular de 100 pb. Casos 2 y 4 muestran patrón de restricción correspondiente al genotipo 1; los casos 3 y 5 indeterminados.

curso del estudio, repitiéndose la positividad en todos los casos con una banda de 250 pb. El análisis de las 15 secuencias nucleotídicas iniciales junto con los resultados de las 36 restantes correspondió a cepas de VHC, confirmando la especificidad de la técnica. La sensibilidad de la técnica desarrollada en nuestro laboratorio es de 100-500 copias por mililitro de plasma.

De los 125 pacientes PCR positivos, 51 fueron tipificados mediante el análisis de RFLP's y secuenciación. Los resultados obtenidos por ambas metodologías mostraron la siguiente distribución de genotipos y sus correspondientes subtipos: a) genotipo 1: 35 casos (68,6%) [subtipos 1a(17), 1b(16), indeterminado(2)]; b) genotipo 2: 3 casos (5,8%) [subtipos 2a(1) y 2b(2)], y genotipo 3: 13 casos (25,5%) [subtipos 3a(13)] (figura 2, tabla 1). En los dos casos, con genotipo 1 y subtipo indeterminado, el estudio de la secuencia mediante el análisis filogenético confirmó que ambos pertenecen al genotipo 1 representando una nueva variante del mismo. Estas variantes genéticas han sido registradas en el Gen Bank con el número AJO12831 y AJO12832 y denominadas Mon1 y Mon2 respectivamente^(18,19).

Los seis pacientes coinfectados con VHC y VIH correspondieron al genotipo 1, distribuyéndose entre los subtipos 1a y 1b.

La metodología de determinación de la carga viral para

Tabla 1. Correlación entre subtipo y su correspondiente carga viral

N	Subtipo	Carga viral	
		Promedio	Desvío STD#
17	1a	584.920 UI*	837.951
16	1b	618.130 UI	624.126
13	3a	268.760 UI	307.612
1	2a	850.000 UI	–
2	2b	182.000 UI	313.259

*UI. Unidades internacionales / ml de plasma.
1 Desvío estándar

VHC fue efectiva en la detección del número de copias en los pacientes evaluados. No se encontró correlación entre los valores de carga viral y genotipo tal como se muestra en la tabla 1.

Discusión

Las técnicas serológicas utilizadas en el diagnóstico de VHC detectan anticuerpos contra el virus pero no establecen actividad replicativa del mismo, lo cual tiene interés dado la tendencia de VHC a establecer infección crónica

en un alto porcentaje de casos una vez que infecta a un individuo⁽²⁰⁾.

Hemos implementado un método directo de detección del ARN de VHC en suero o plasma humano basado en la amplificación mediante la técnica de PCR de una región conservada y por tanto presente en todos los genotipos virales, lo que evita la obtención de resultados falsos negativos y confirma la viremia⁽¹³⁾.

De los 175 pacientes analizados en nuestro laboratorio reviste especial interés el caso de dos pacientes con serología negativa para VHC en quienes el diagnóstico fue establecido luego de la amplificación positiva por la técnica de PCR, reiterada en muestras sucesivas.

Estos hallazgos, junto con la reiteración de la positividad del PCR en muestras sucesivas de los pacientes y la confirmación de la viremia a través de la cuantificación establecida por la carga viral, evidencian la especificidad y sensibilidad de la metodología molecular. Asimismo, confirman la importancia de la misma en el diagnóstico de los casos serológicamente positivos como negativos. Eventualmente se presentan pacientes con serología positiva y PCR negativo, pudiendo estos, durante la evolución, presentarse con PCR positivos.

En los 50 casos analizados en este trabajo que tuvieron serología positiva y PCR negativa, la negatividad se determinó en una sola muestra. La negatividad del PCR podría corresponder a una de las siguientes situaciones: a) recuperación de la infección; b) viremia intermitente, en el curso de una infección crónica, y c) viremia por debajo del límite de detección de la técnica.

Como todo virus de ARN, el VHC se caracteriza por su alta variabilidad genética siendo por ello de fundamental importancia analizar una región conservada que permita la identificación y posterior tipificación de las diferentes estirpes virales^(4,21). Estudios realizados sobre la variabilidad genética en genomas completos de VHC establecieron que la región 5'NCR del mismo es la más conservada y contiene un alto grado de información⁽¹³⁾. Nuestro ensayo de PCR y la posterior genotipificación tienen como blanco la amplificación de la región 5'NCR, indicando que nuestros resultados son confirmatorios de lo ya comunicado en la literatura internacional⁽¹¹⁻¹³⁾.

En la población analizada se estableció el genotipo en 51 pacientes VHC positivos mediante las técnicas de RFLP's y secuenciación. El presente trabajo muestra que ambas metodologías son efectivas y sus resultados concordantes en la mayoría de los infectados. Si bien la técnica de RFLP's es internacionalmente aceptada y adoptada por los laboratorios de biología molecular como una herramienta de tipificación muy eficiente, esta metodología puede presentar patrones de digestión que impiden la asignación de un genotipo. En tanto la secuenciación de la región 5'NCR del genoma viral nos brinda mayor infor-

mación y es más precisa en el análisis y en la correcta asignación del genotipo problema. Tal es la situación en los dos casos en los cuales los RFLP's establecieron un genotipo indeterminado y el análisis filogenético a través de la secuencia permitió asignar los mismos a una forma hasta ahora no descrita del genotipo 1, a las que se denominaron Mon 1 y Mon 2 por ser descritas por primera vez por nuestro grupo de trabajo en Montevideo^(18,19). La combinación de ambos métodos fue lo que permitió la asignación de los genotipos y subtipos al total de la muestra analizada hasta el momento.

La distribución de los genotipos en nuestra muestra es similar a la descrita por los grupos de Estados Unidos⁽²²⁾, Europa⁽⁸⁾, Australia⁽²³⁾ y de la región⁽²⁴⁻²⁷⁾ observándose una predominancia de los genotipos 1 y 3, pero diferente de la presente en el este asiático^(9,28). Sin embargo, con respecto a los pacientes coinfectados con VHC y VIH nuestros resultados, a diferencia de lo comunicado en la serie europea⁽⁸⁾, muestran una predominancia del genotipo 1. Russi y colaboradores⁽²⁹⁾ determinaron, por técnicas serológicas indirectas, la distribución de serotipos del VHC en población de dializados y donantes de sangre. Nuestros resultados de genotipificación coinciden con los encontrados en esta última población.

Con respecto a la determinación de la carga viral se evidenció que no hay una relación entre el genotipo infectante y el valor de carga viral obtenido pretratamiento, siendo por ello la viremia genotipo independiente tal como ha sido señalado por distintos autores⁽²⁾.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten arribar a las siguientes conclusiones:

Las técnicas moleculares (RT-PCR) brindan un diagnóstico directo, rápido y sensible de actividad viral de VHC. Ello es relevante en los casos serológicamente negativos, confirmando la negatividad o estableciendo el diagnóstico, así como en pacientes en los que interesa determinar actividad viral.

En nuestra muestra de 175 pacientes con serología positiva, 71,8% tuvo actividad replicativa del virus demostrada por PCR positivo.

El análisis de los genotipos mediante las técnicas de RFLP's y secuenciación automática muestra en la mayoría de los casos resultados similares, siendo la secuenciación muy relevante para la identificación de nuevas variantes y para caracterizar molecularmente al VHC.

El establecimiento de los diferentes genotipos virales, así como el descubrimiento de la existencia de una nueva variante genética del VHC, aportan los primeros datos sobre la epidemiología molecular de la infección por VHC en el país.

Agradecimientos

A la MSc. María Noel Cortinas por su colaboración en la técnica de secuenciación y al técnico Jorge Cardozo por la realización de las técnicas serológicas.

Summary

Background. Hepatitis C virus infection appears to be as one of the main problems associated with emerging infectious diseases. VHC has considerably genetic plasticity; since its categorisation, six primary strains (and an increasingly high number of types) associated with treatment responses and the natural progress of the disease have been identified.

Objectives. To improve diagnosis and follow up for patients with VHC, and to broad epidemiological knowledge using molecular analysis in determining genotype and viral charge.

Methods. We analysed samples of 175 patients with VHC infectious disease referred from March 1997 to June 2001. All patients underwent ELISA, immunoblot and amplification of VHC through reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Genotype and viral charge were determined in a sub-sample of patients positive for PCR.

Results. Viremia was found in 125 out of 175 patients (173 positive serology for VHC and 2 negative serology for VHC). Analysis of restriction polymorphism (RFLP's) and nucleotide sequence in 51 chronic carriers showed the following distribution of genotypes and types:

a) genotype 1: 35 cases [type 1a (17), 1b (16), variants (Mon1 and Mon2)]; b) genotype 2: 3 cases [(type 2^a (1) and 2b (2)], and c) genotype 3: 13 cases [type 3a (13)].

Conclusions. Molecular techniques applied to diagnosis and follow up of patients with HVC infectious disease showed to be a new, specific and highly precise tool. Through automatic sequential ordering and the subsequent philological analysis two HCV variants have been described. They were been entered at the Gen-Bank as Mon 1 and Mon 2. As there was not been found any association between infectious genotype and viral charge, viremia was genotypically non-dependent.

Résumé

Introduction: Les hépatites provoquées par le virus C (VHC) sont devenues un des principaux problèmes associés aux infections émergentes. Le VHC possède une haute variabilité génétique; jusqu'à nos jours, on a identifié six types principaux et un nombre croissant de sous-types viraux associés à une réponse différente au traitement et à l'évolution naturelle de la maladie. *But:* contribuer au

diagnostic, au suivi des infectés et à la connaissance de l'épidémiologie au moyen de l'analyse moléculaire qui détermine le génotype et la charge virale. *Matériel et méthodes:* on analyse les échantillons de 175 patients entre mars 1997 et juin 2001 pour le diagnostic d'infection par VHC. à tous les cas, on réalise une détermination d'anticorps par enzyme immuno analyse (ELISA) et immunoblot et amplification du génome de VHC au moyen de techniques de transcription reverse et réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR). A un sous-échantillon de patients PCR positifs on a déterminé le génotype et la charge virale. *Résultats:* on a constaté virémie chez 125 patients d'un total de 175 (173 ayant sérologie positive et 2 cas à sérologie négative pour VHC). L'analyse des polymorphismes de restriction (RFLP's) et de la séquence nucléotide chez 51 porteurs chroniques, a révélé la distribution de génotypes et leurs sous-types correspondants suivante: a) génotype 1:35 cas [sous-types 1a (17), 1b (16), variante (Mon1 et Mon2)]; b) génotype 2:3 cas [sous-types 2a (1) et 2b (2)] et c) génotype 3:13 cas [sous-types 3a (13)].

Conclusions: dans ce travail, on signale l'importance de l'emploi de techniques moléculaires appliquées au diagnostic et au suivi des porteurs de HVC, qui sont un nouvel instrument, très précis, sensible et spécifique. La grande capacité analytique, à travers le séquençement automatique et l'analyse phylogénétique postérieure, nous a permis d'identifier chez deux patients une nouvelle variante génétique de HVC qui n'avait pas été décrite et qui pose de nouveaux questionnements. Ils ont été publiés e inclus à la Gen-Bank sous le nom Mon 1 et Mon 2. En ce qui concerne la détermination de la charge virale, aucune relation entre le génotype infestant et la valeur de charge obtenue n'a été mise en évidence, restant alors la virémie génotype indépendante.

Bibliografía

1. **European Association for the Study of the Liver.** International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus statement. *J Hepatol* 1999; 31: 3-8.
2. **Sociedad Uruguaya de Gastroenterología.** Consenso Nacional de Hepatitis C. Montevideo: 2001. *Rev Med Uruguay* 2002 (en prensa).
3. **Chao QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Broderly DW, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
4. **Bukh J, Miller RH, Purcell R.** Genetic heterogeneity of hepatitis C virus quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63.
5. **Lau JY, Davis GL, Prescott LE, Maertens KL, Lindsay K, Simmonds P, 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. *Ann Intern Med* 1996; 124: 868-76.

6. **Dusheiko GM, Simmons P.** Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J Viral Hep* 1994; 1: 1-13.
7. **Simmons P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al.** A proposed system for a nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4.
8. **Manns MP, Wedemeyer H.** Hepatitis C Infection - Optimizing Treatment, Patient Management and Basic Aspects. 36th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). *Gastroenterology* 2001; 3(3): 423-34.
9. **McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett AC, Seed AJ, Keller AJ, et al.** Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 884-92.
10. **Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, Hashimoto E, Hayashi N, Nakamura A, et al.** Quantitative assays for hepatitis C virus in serum as predictors of the long-term response to interferon. *J Hepatol* 1997; 27: 437-44.
11. **Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, et al.** Analysis of a new hepatitis C type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131-41.
12. **Murphy D, Willems B, Delage G.** Use of 5' non-coding region for genotyping hepatitis C virus. *J Infec Dis* 1994; 169: 473-5.
13. **Davidson F, Simmons P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett AC, et al.** Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1995; 76: 1197-1204.
14. **Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ.** Using clustal for multiple sequence alignments. *Methods Enzimol* 1996; 266: 383-402.
15. **Felsenstein L.** Phylogeny inference package, version 3.5. Seattle: Department of Genetics. University of Washington, 1993.
16. **Kumar U, Monjiardino J, Thomas HC.** Mega: Molecular Evolutionary Genetic Analysis for microcomputers. *Comput Appl Biosc* 1994; 10: 189-91.
17. **Zeuzem S, Lee JH, Franke A, Ruster B, Prummer O, Herrmann W, et al.** Quantification of initial decline of serum hepatitis C RNA and response to interferon alfa. *Hepatology* 1998; 27: 1149-56.
18. **Colina RH, Uriarte MR, Mogdasy C, Azambuja CJ, Cristina JC.** Evidence of genetic diversification in isolates of Hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1999; 80: 1377-82.
19. **Vega I, Colina R, García L, Uriarte MR, Mogdasy C, Cristina J.** Diversification of Hepatitis C Viruses in South America reveals a novel genetic lineage. *Arch Virol* 2001; 146: 1626-9.
20. **Thomas DL, Stanley M.** Hepatitis C. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5^a ed. New York: Churchill Livingstone, 2000: 1736-176.
21. **Nakao T, Enomoto N, Takada A, Date T.** Typing of hepatitis C virus (HCV) genomes by restriction fragments length polymorphisms. *J Gen Virol* 1992; 72: 2105-12.
22. **Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Pershing DH.** Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 1996; 125: 634-9.
23. **McCaw R, Moaven L, Locarnini SA, Bowden DS.** Hepatitis C virus genotypes in Australia. *J Viral Hepat* 1997; 4: 351-7.
24. **Puyol FH, Loureiro CL, Devesa M, et al.** Determination of genotypes of hepatitis C in Venezuela by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1870-2.
25. **Oubina JR, Quarleri JF, Rudzinski M, Parks C, Badia I, Gonzalez-Cappa SM.** Genomic characterization of hepatitis C virus isolates from Argentina. *J Med Virol* 1995; 47: 97-104.
26. **Picchio GR, Nakatsuno M, Boggiano C, et al.** Hepatitis C (HCV) genotype and viral titter distribution among Argentinean hemophilic patients in the presence or absence of human immunodeficiency virus (HIV). *J Med Virol* 1997; 52: 219-25.
27. **Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, et al.** Hepatitis C virus genotypes in Southern Brasil. *Braz J Med Res* 1996; 29: 1629-3.
28. **Kanistanon D, Neelamek M, Dharakul T, Songsivilai S.** Genotypes distribution of hepatitis C virus in different regions of Thailand. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1772-6.
29. **Russi J, Gadola L, Verdaguer C, Labella M, Chiparelli H, Alonso G, et al.** Serotipificación de virus de Hepatitis C en pacientes en Hemodiálisis. *Rev Nefrol* 1998; 18: 227.