

El virus de la hepatitis C como patógeno emergente I: diagnóstico mediante métodos de laboratorio

Rafael M. Gordillo
Juan Gutiérrez
Manuel Casal

Servicio
de Microbiología
y Parasitología
Hospital Universitario
Reina Sofía
de Córdoba

Resumen

La infección por el virus de la hepatitis C se ha convertido en una enfermedad emergente en la población de pacientes VIH+/SIDA. En los últimos años se han desarrollado multitud de técnicas de laboratorio para permitir un diagnóstico más precoz así como permitir un mejor seguimiento de la enfermedad y su respuesta al tratamiento. Es por eso que se hace necesario realizar una revisión de todos los ensayos disponibles y ajustar sus indicaciones.

Palabras clave: VIH. Hepatitis C. Diagnóstico.

Summary

Hepatitis C virus infection has become in an emerging disease in HIV+/AIDS population. In last few years many laboratory assays have been developed to allow the most appropriate approach to diagnose HCV infection and monitor infected patients. For that reason, we think that it's necessary to review the available test for the diagnosis and monitoring of HCV infection and adjust their indications.

Key words: HIV. Hepatitis C. Diagnosis.

Introducción

Entre las enfermedades emergentes de la actualidad, la hepatitis C ha pasado a tener una gran importancia no sólo en la población general o donantes de sangre, sino de manera especial constituye la primera infección en enfermos VIH+/SIDA donde ha desplazado a otras como la tuberculosis.

Por ello consideramos de gran interés el poner al día este tema para lo que hacemos una revisión del mismo en sus conocimientos actuales. En este primer trabajo se revisan los sistemas de laboratorio para su diagnóstico.

Ensayos de laboratorio para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus RNA perteneciente a la familia *Flaviviridae* que no precisa de artrópodos para su transmisión, siendo la vía parenteral la forma ideal para su propagación¹. Es un virus que provoca una infección aguda en la mayor parte de los casos asintomática y cuya peculiaridad estriba en la alta tasa de cronicidad (considerada como la no eliminación completa del virus en más de 6 meses) que se estima según las series entre un 55 y un 85%².

El virus de la hepatitis C presenta un genoma consistente en una molécula de ARN monocatenario lineal de sentido positivo de 9,5 Kb, lo que le otorga la capacidad para codificar una poliproteína de alrededor de 3000 aminoácidos, resultado de la traducción de la secuencia completa del genoma. Posteriormente, se produce una rotura proteolítica provocada por una proteasa codificada por el propio virus³.

Las secuencias correspondientes a las proteínas estructurales cápside y envuelta, se sitúan en el tercio 5' mientras que el resto, corresponde a proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4, NS5). Las tres primeras, NS2, NS3 y NS4, son enzimas que participan en la replicación del genoma y en el procesamiento de la poliproteína resultante. Por otra parte, la proteína no estructural NS5, corresponde a la RNA polimerasa viral⁴.

En los extremos 5' y 3' se encuentran secuencias reguladoras no codificantes de proteínas y que se encuentran altamente conservadas en todas las cepas de VHC. El resto de genoma viral, presenta una variabilidad genética más o menos regular que permite agrupar las cepas de virus C en diferentes

Correspondencia:
Manuel Casal Román
Servicio de Microbiología
y Parasitología
Hospital Universitario Reina
Sofía de Córdoba
Avenida Menéndez Pidal, s/n
14004 Córdoba
E-mail: mi1carom@uco.es

genotipos. Las secuencias situadas entre las regiones E1 y E2 muestran una variabilidad extrema, constituyendo la región hipervariable (RHV)⁵.

Todas las proteínas codificadas por el genoma viral se pueden comportar como epítomos antigénicos capaces de generar respuesta inmune durante la infección natural³. A lo largo de la historia natural de la infección por virus C, la respuesta inmunológica mayoritaria aparece contra las proteínas core, NS3 y NS4. También, pero en menor medida, contra la proteína NS5⁶. Se considera que la respuesta frente a las proteínas core y NS3 es la más precoz tras producirse la primoinfección^{7,8}, siendo a su vez la respuesta frente al core la más persistente pudiendo ser la única detectable después de una infección anti-gua resuelta^{9,10}.

Se cree muy probable que los principales epítomos involucrados en la neutralización del VHC por anticuerpos, se codifiquen en el extremo 5' de la región E2, que como se ha visto, presenta una gran variabilidad. Esto se traduciría a su vez en una gran variabilidad antigénica que podría ser un mecanismo que utilizara el virus para escapar del sistema inmune y convertirse en un factor importante que explicaría su tendencia a cronificar¹¹.

Son muchas las situaciones en las que interesa realizar un diagnóstico o aproximación al mismo de la infección por virus de la hepatitis C. Así, sería útil como cribado en población de bajo riesgo como pudieran ser donantes de sangre, búsqueda de infección en pacientes que presentan prácticas o factores de riesgo o en pacientes que posean alteraciones analíticas. La exposición al virus de la hepatitis C se determina mediante la detección de anticuerpos IgG anti-VHC específicos en suero; mientras que la infección activa se demostraría por la presencia de RNA del virus en sangre o de proteínas estructurales del mismo.

Las pruebas diagnósticas de laboratorio se dividen clásicamente en métodos de cribado, métodos suplementarios y métodos moleculares. Mención aparte merecen los métodos desarrollados para la determinación del genotipo viral que combinan pruebas serológicas y moleculares.

Métodos de cribado

El enzimo inmunoanálisis (EIA) indirecto y el de micropartículas (MEIA) para la detección de anticuerpos IgG específicos son las técnicas habitualmente utilizadas. El EIA ofrece las ventajas de ser

una técnica relativamente poco costosa, y sobre todo permite su adaptación a sistemas automatizados lo que posibilita el manejo de un gran volumen de muestras en poco tiempo. El primer ensayo EIA se desarrolló en 1990 y utilizaba una sola proteína recombinante como antígeno (c100-3) epítomo de la proteína no estructural NS4¹². Este test, poseía una baja sensibilidad para poblaciones de alta prevalencia (aproximadamente el 80%) y poseía una alta tasa de falsos positivos en poblaciones de baja prevalencia como los donantes de sangre¹³. Además, la seroconversión en pacientes con infección aguda no se detectaba hasta tres meses o más después de la infección¹³. Estas circunstancias guiaron al desarrollo de EIA de segunda generación más sensibles y específicos y que fueron aprobados para su uso por la Food and Drug Administration (FDA) en 1992. Los ensayos de segunda generación incorporaron antígenos recombinantes (c33c y c200) de regiones no estructurales (NS3 y NS4) junto con un antígeno de la región estructural core del VHC (c22-3). Los ensayos de segunda generación detectaron anticuerpos en un 20% más de pacientes con hepatitis no A no B aguda y en un 10% más con hepatitis crónica que los de primera generación y adelantaron el tiempo de detección de anticuerpos en 30 a 90 días¹⁴. La introducción de EIA de segunda generación en bancos de sangre redujo espectacularmente la incidencia de hepatitis C postransfusional. En 1996 la FDA aprobó las pruebas de tercera generación que, a las existentes, añadieron proteínas de la región NS5 y se modificó la proteína de la región NS3 para aumentar aún más su sensibilidad. En algunas series, estos ensayos de tercera generación detectaron anticuerpos una media de 26 días antes en 5 de 21 pacientes con hepatitis C postransfusional¹³ y su sensibilidad es ligeramente superior a los de segunda generación en poblaciones de alta prevalencia¹³. Según otros estudios publicados, en países en vías de desarrollo donde los recursos son escasos y por tanto el uso de métodos suplementarios no es generalmente posible, el uso de pruebas de tercera generación resultaría suficientemente seguro para detectar exposición al VHC sin usar métodos suplementarios¹⁵.

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo inmunoensayo cuantitativo y cualitativo que detecta el antígeno core total de la nucleocápside del virus de la hepatitis C en suero o EDTA plasma en presencia o ausencia de anticuerpos frente al VHC. Las indicaciones de este nuevo ensayo podrían ser: detección de viremia por VHC en infecciones en fase aguda (aun cuando el paciente es seronegativo), detección de viremia por VHC en individuos seropositivos,

monitorización de la respuesta virémica durante el tratamiento y monitorización de las potenciales recidivas postratamiento¹⁶.

Métodos suplementarios

Estas pruebas están diseñadas para conocer qué antígenos virales son los responsables de la reactividad en las pruebas de ELISA convencional. Los sueros que han dado previamente un resultado positivo en la prueba de cribado inicial deben ser en la mayoría de casos confirmados mediante el uso de estas pruebas suplementarias. Estas técnicas de inmunoblot son más específicas que los EIA pero menos sensibles por lo que no deben usarse como método inicial de cribado¹⁵.

La técnica más usada se basa en el formato RIBA (recombinant immunoblot assay), esta técnica, desarrollada inicialmente por Bayer-Chiron, se trata de un inmunoensayo sobre tiras de nitrocelulosa al que se han adherido individualmente los diferentes antígenos utilizados en las pruebas de EIA. Al igual que estas últimas, las pruebas RIBA también se han ido desarrollando en distintas generaciones. La primera versión, contenía unas bandas que comprendían el antígeno original que codificaba 5-1-1 producido por *Escherichia coli* y el antígeno c100-3 producido en células de levadura, así como una banda de SOD (superóxido dismutasa humana). La SOD es la proteína portadora de los antígenos recombinantes y su uso como banda en solitario se utiliza para identificar reacciones inespecíficas. Además estas pruebas de primera generación contenían otras dos bandas de control de las IgG. Esta prueba poseía poca sensibilidad y especificidad por lo que pronto se desarrollaron técnicas de segunda y tercera generación. El RIBA de segunda generación incorporaba dos antígenos, uno del gen no estructural (c33c) y otro del core (c22-3). El RIBA de tercera generación es más sensible y específico ya que se ha añadido a lo anterior una proteína modificada y dos antígenos sintéticos (c100p y c22p), así como la proteína recombinante NS5^{17,18}.

Una prueba de inmunoblot se considera positiva cuando la muestra reacciona frente a dos o más proteínas (sin contar la proteína transportadora SOD); se considera negativa cuando no se detecta reactividad frente a ninguna de las proteínas o sólo lo hace frente a la SOD. El resto de posibilidades se considerará como patrón indeterminado. Los resultados indeterminados, si bien han disminuido en número con las pruebas RIBA de tercera generación, son más frecuentes

en poblaciones de bajo riesgo como puede ocurrir en donantes de sangre. La introducción en estas técnicas de la proteína core disminuyó el tiempo de seroconversión a 6-7 semanas debido a que como se comentó en otro punto los anticuerpos frente a esta proteína son de los primeros en aparecer en la mayoría de personas; sin embargo también es la responsable de la aparición de falsos positivos en las pruebas de cribado como de resultados indeterminados en las pruebas suplementarias.

Hay que considerar que el tener un resultado positivo en un inmunoblot no necesariamente indica infección activa. También hay que tener en cuenta que los inmunodeprimidos, los infectados por el VIH y dializados presentan un alto porcentaje de seronegatividad, por lo que necesitan de técnicas moleculares para ser diagnosticados correctamente.

Las indicaciones para el uso de técnicas suplementarias son en muchos casos controvertidas. A pesar de eso parece haber consenso en que su uso está más justificado en el caso de poblaciones de bajo riesgo (donantes de sangre) con una prueba de cribado inicial positiva, mientras que en poblaciones alto riesgo (pacientes sintomáticos, VIH+ adictos a drogas por vía parenteral) no sería necesario confirmar una prueba de cribado positiva¹⁹.

Métodos moleculares

La replicación del VHC en los hepatocitos provoca la destrucción de los hepatocitos con la consiguiente liberación de partículas virales al torrente sanguíneo. Estas partículas ofrecen diversas dianas potenciales para su detección por diferentes técnicas de laboratorio²⁰.

La presencia de RNA del virus de la hepatitis C en plasma define infección activa y puede ser detectado de 1 a 3 semanas postexposición²¹. Una simple prueba de detección de RNA negativa no excluye la posibilidad de infección activa ya que puede estar en un nivel de viremia por debajo del umbral de detección de la prueba²¹.

Las pruebas cualitativas se usan para confirmar una infección activa por VHC en pacientes seropositivos con resultado dudoso o en pacientes con serología negativa pero con alta sospecha clínica, en los que la infección puede estar en estadios muy precoces. Por otra parte, las pruebas cuantitativas (carga viral) se usan para evaluar la evolución de la enfermedad y monitorizar la respuesta al tratamiento²².

Los laboratorios detectan el RNA viral mediante kits comerciales o mediante técnicas diseñadas por el propio laboratorio según sus necesidades. Debido a la cantidad limitada de RNA de VHC en individuos infectados, es necesario siempre un paso previo de amplificación de la diana o señal. La PCR tras previa retrotranscripción (RT-PCR) y la TMA (Transcription mediated amplification) son métodos que amplifican la diana. La "branched DNA" (bDNA) es una técnica de amplificación de señal.

Para la RT-PCR se requiere un paso previo que transforma el RNA en una cDNA (DNA complementario) que servirá de base para la PCR propiamente dicha²³. Los iniciadores o "primers" tienen como diana la región no codificante 5' (5' UTR) debido a que ésta es la más conservada del genoma²⁴. El sistema AMPLICOR HCV de Roche incluye 37 ciclos de amplificación seguidos de hibridación a una sonda específica para VHC de oligonucleótidos. La versión semiautomatizada de este test utiliza el aparato COBAS para reducir el tiempo de manipulación requerido para la detección²⁵. El test AMPLICOR HCV 2.0 fue aprobado por la FDA en 2001 y posee un límite inferior de detección de 50 UI/ml²⁶. AMPLICOR HCV MONITOR versión 2.0 es la prueba que ofrece Roche para cuantificar la carga viral presente mediante la comparación con unos estándares internos que se añaden a cada reacción. Su límite inferior de detección se estima en 600 UI/ml.

En el método b-DNA de detección de RNA los títulos se informan en equivalentes por mililitro. Tiene una precisión muy alta y es un sistema muy reproducible. Un estudio que comparaba el sistema AMPLICOR (RT-PCR) con el VERSANT (b-DNA) confirmaba un coeficiente de correlación de 0,941 entre ambas²⁷. Se decía también que el sistema AMPLICOR tenía un mayor nivel de cuantificación que el VERSANT para muestras entre 500 y 100.000 UI/ml y subestimaba la cantidad de RNA en muestras con más de 100.000 UI/ml²⁷. Otro estudio comparativo entre ambos test informaba de un acuerdo en conjunto sustancial entre AMPLICOR y VERSANT pero si observaba diferencias significativas cuando el ensayo de utilizaba para determinar si la cantidad estaba por encima o debajo de 800.000 UI/ml que es el umbral que se ha propuesto para determinar la duración del tratamiento con combinación de fármacos²⁸.

Debido a la mayor sensibilidad de los ensayos cualitativos disponibles comercialmente, con respecto a los cuantitativos, el valor de éstos se ha limitado a evaluaciones pretratamiento y determinación en función de ésta de la duración del tratamiento. Por su parte, los ensayos cualitativos deberían utilizarse para

confirmar la existencia de viremia y valorar la respuesta terapéutica hasta que los test cuantitativos con sensibilidades comparables estén disponibles¹⁹.

TMA requiere un conjunto de reacciones más complejo la T7 RNA polimerasa y una retrotranscripción bajo condiciones isotermas para formar niveles detectables de RNA²³. El ensayo cualitativo basado en TMA (VERSANT HCV RNA qualitative assay) detecta niveles de viremia muy por debajo de los detectados por los sistemas RT-PCR, (5 UI/ml) por lo que aunque los ensayos con este método son más reducidos, sí parecen ser prometedores^{29,30}.

Métodos para la determinación del genotipo

Como se expuso anteriormente, debido a su gran variabilidad genética, el virus C se ha dividido en 6 genotipos mayores y al menos 80 subtipos³¹. Tanto los métodos moleculares como serológicos pueden ser utilizados para determinar el genotipo del VHC. Existen test comercializados pero no aprobados por la FDA. Las técnicas moleculares usadas fundamentalmente, se basan en las diferencias de nucleótidos en las regiones altamente conservadas 5' UTR en los diferentes genotipos. El ensayo INNO-Lipa HCV (Innogenetics) usado ampliamente en todo el mundo, usa productos de la PCR de la región 5' UTR que se hibridan con una sonda tipo-específica unida a una tira de nitrocelulosa³². El Trugene HCV 5' noncoding region genotyping kit (Visible Genetics), determina el genotipo por secuenciación directa de la región 5' UTR³³. Tanto los ensayos Trugene como INNO-LiPA pueden realizarse con productos de amplificación procedentes de ensayo AMPLICOR de Roche³³ y un reciente estudio confirma que ambos ensayos presentan similar capacidad para determinar genotipos³³. Mayores dificultades presentan ambas pruebas para la determinación de subtipos, con una exactitud entre el 74 y 76% con respecto a la prueba "gold Standard" que secuencia una región diferente del genoma, NS5B³³. Puesto que el manejo de decisiones se ha hecho en función del genotipo y menos en función del subtipo, la precisión en conjunto de ambos ensayos se ha considerado aceptable.

Los métodos serológicos dependen de la detección de anticuerpos frente epítomos específicos de genotipo en la región NS4 o core. Comparado con los ensayos moleculares, la genotipificación serológica es más fácil de realizar, más barata pero tiene menor sensibilidad y especificidad^{34,35}.

Conclusiones

Si bien hace casi treinta años la mayoría de casos de hepatitis transmitidas por transfusión se debían a HANANB³⁶, en este tiempo, el descubrimiento y profundización en el estudio del virus de la hepatitis C ha llevado al desarrollo de técnicas de cribado de donantes de sangre cada vez más sensibles y con un menor período ventana en la detección de anticuerpos, que ha hecho disminuir de manera espectacular la incidencia de esta hepatitis debida a transfusión. Asimismo, la creciente expansión de técnicas basadas en la biología molecular del virus nos ha provisto de otras técnicas válidas para detectar e incluso cuantificar no sólo anticuerpos sino las propias partículas virales. Estas técnicas abren un nuevo campo tanto en el diagnóstico de la infección como en el seguimiento y respuesta al tratamiento de la misma.

Bibliografía

1. Francki RI, *et al.* Internacional Comitee on Taxonomy of Virus (ICTV). Classification and Nomenclature of Viruses, 5th Report. *Arch Virol* 1991; Suppl. 2.
2. Solá R. Historia natural de la hepatitis C. *Monogr. Gastroenterol Hepatol* 2003;1(2):2-8.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby L, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A, non B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
4. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996;23:205-9.
5. Choo QL, Richman KH, Han JH, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
6. Camps J, Esteban R. Hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995;13(S1):31-9.
7. Nasoff MS, Zedebee SL, Inchauspé G, Prince AM. Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5462-6.
8. Uyttendale S, Claeys H, Mertens W, Verhaeert H, Vermynen C. Evaluation of third - generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994;66:122-9.
9. Dow BC, Coote I, Munro H, *et al.* Confirmation of HCV antibody in blood donors. *J Med Virol* 1993;41:215-20.
10. Lefrère JJ, Guiramand S, Lefrère F, *et al.* Full or partial seroconversion in patients infected by hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1997;175:316-22.
11. Sekiya H, Kato N, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Yamauchi K, Shimotohno K. Genetic alterations of the putative envelope protein encoding region of hepatitis C virus in the progression to relapsed phase from acute hepatitis: humoral immune response to hypervariable region 1. *Int J Cancer* 1994;57:664-70.
12. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A non B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
13. Gretch DR. Diagnostic test for hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl. 1):43S-47S.
14. Alter HJ. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;15:350-3.
15. Abdel-Hamid M, El-Daly M, El-Kafrawy S, Mikhail N, Strickland GT, Fix AD. Comparison of Second and Third Generation Enzyme Immunoassays for Detecting Antibodies to Hepatitis C Virus. *J Clin Microbiol* 2002;40:1656-9.
16. 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.
17. Pawlotsky JM, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, *et al.* Significance of indeterminate third generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996;34:80-3.
18. Pawlotsky JM, Fleury A, Choukroun V, Deforges L, Roudot-Thoraval F, Aumont P, *et al.* Significance of highly positive c22-3 "indeterminate" second generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay (RIBA) and resolution by third generation HCV RIBA. *J Clin Microbiol* 1994;32:1357-9.
19. Richter SS. Laboratory Assays for Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:4407-12.
20. Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. En: Rizzeto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G. *Viral hepatitis and liver disease*. Turin: eds. Minerva Medica, 1997;405-15.
21. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel. Management of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(suppl 1):2S-10S.
22. *City Health Information*. New York: City Department 2000 July;19(2).
23. Tang YW, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999;215-44.

24. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:187-91.
25. Albadalejo J, Alonso R, Antinozzi R, Bogard M, Bourgault AM, Colucci G, *et al.* Multicenter evaluation of the COBAS AMPLICOR HCV assay, an integrated PCR system for rapid detection of hepatitis C virus RNA in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1998;36:862-5.
26. Lee SC, Antony A, Lee N, Leibow J, Yang JQ, Soviero S, *et al.* Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR test for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. *J Clin Microbiol* 2000;38:4171-9.
27. Beld M, Sentjens R, Rebers S, Weegink C, Weel J, Sol C, *et al.* Performance of the new Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantification of hepatitis C virus RNA in plasma and serum: conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor, version 2.0 assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:788-93.
28. Germer JJ, Heimgartner PJ, Ilstrup DM, Harmsen WS, Jenkins GD, Patel R. Comparative evaluation of the VERSANT HCV RNA 3.0, QUANTIPLEX HCV RNA 2.0 and COBAS AMPLICOR HCV MONITOR version 2.0 assays for quantification of hepatitis C virus RNA in serum. *J Clin Microbiol* 2002;40:495-500.
29. Ross R, Viazov SO, Hoffmann S, Roggendorf M. Performance characteristics of a transcription-mediated nucleic acid amplification assay for qualitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Lab Anal* 2001;15:308-13.
30. Sarrazin C, Hendricks DA, Sedarati F, Zeuzem S. Assessment by transcription-mediated amplification of virologic response in patients with chronic hepatitis C virus treated with peginterferon α -2a. *J Clin Microbiol* 2001;39:2850-5.
31. Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med* 1999;107(Suppl 6B):21S-26S.
32. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Van Heuverswyn H, *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993;74:1093-102.
33. Halfson 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.
34. Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. Evaluation and comparison of different hepatitis C virus genotyping and serotyping assays. *J Hepatol* 1997;26:1001-9.
35. Pawlotsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, *et al.* Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:1734-9.
36. Bruix J, Calvet X, Costa J, *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989;II:1004-6.