

González González, Yaime J.<sup>1</sup>  
 García de la Rosa, Iria<sup>1</sup>  
 García Ferrera, Waldo Orlando<sup>2</sup>

## Diagnóstico serológico de la infección por el virus c de la hepatitis (parte II)

## Hepatitis c virus infection, serological diagnosis (part II)

Fecha de aceptación: octubre 2020

### Resumen

Las pruebas serológicas se han convertido en herramientas fundamentales en el diagnóstico y manejo de la infección por el virus de la hepatitis c (VHC). Estas pruebas incluyen la detección de anticuerpos contra el VHC en suero, la detección y cuantificación del ARN-VHC, así como la determinación del genotipo del VHC en suero. Estas pruebas son fundamentales en el diagnóstico y manejo terapéutico de la hepatitis c. En este artículo hacemos una revisión del tema.

**Palabras clave:** *virus de la hepatitis c, pruebas serológicas y virológicas, ARN del VHC.*

### Abstract

Serological examinations have become essential tools in the diagnosis and management of infection with the hepatitis c virus (HCV). These tests include detection of antibodies to HCV in serum, detection and quantification of HCV-RNA, as well as determination of the genotype of HCV in serum. These tests are essential in the diagnosis and therapeutic management of hepatitis c. In this article we make an exhaustive review of the subject.

**Keywords:** *hepatitis c virus, serological, virological tests, HCV RNA.*

## Introducción

En esta segunda parte del artículo referente al diagnóstico serológico de la hepatitis c, haremos mención de los distintos métodos que se usan en los laboratorios de biología molecular para la cuantificación del ARN del virus de la hepatitis c (VHC), así como de las técnicas descritas para realizar el genotipaje de este virus, también se incluye lo referente a la interpretación general de los distintos resultados de estas pruebas.

### Métodos para cuantificar la carga viral del VHC

La cuantificación del ARN vírico en sangre se puede realizar de diferentes formas: 1) PCR competitiva, 2) TMA (amplificación mediada por transcripción), y 3) detección de ARN mediante ADN ramificado.

La cuantificación del ARN viral mediante PCR competitiva realiza una amplificación del molde viral y de un estándar sintético adicionado en cada tubo de reacción en concentración conocida. A ambos se les unen los mismos

cebadores, con lo que se produce una competencia en el proceso de amplificación y se favorece la especie que esté en mayor cantidad en el tubo de reacción, por lo que sólo se amplificará más el estándar sintético en la medida en que haya menos VHC en la muestra. Se calcula la relación entre las señales de los amplicones de la muestra viral y del estándar interno; los resultados se obtienen mediante interpolación de estos datos en una curva construida con el logaritmo de la relación y el logaritmo de la concentración de estándares cuantitativos determinados en paralelo con las muestras.<sup>1</sup>

Más recientemente se han desarrollado las técnicas de PCR en "tiempo rea".<sup>2,3</sup> Su principio se basa en la detección del amplicón sintetizado para deducir la cantidad del genoma viral de la muestra clínica de partida, más que la cantidad al final de la reacción de PCR. Este método es teóricamente más sensible que la técnica clásica de amplificación de la diana y no es propenso a la contaminación. Su rango dinámico de cuantificación es muy extenso, lo que lo hace particularmente útil para la cuantificación del rango total de carga viral observada en los pacientes tratados y no tratados con la infección por VHC.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Departamento de Gastroenterología, Sección de Hepatología, Hospital Universitario Calixto García, La Habana, Cuba

Correspondencia: Dr. Waldo Orlando García Ferrera  
 Calle 17 núm. 907, entre B y C, Vedado. C.P. 10400, La Habana, Cuba.

Dirección electrónica: garciaferrera63@gmail.com

La detección de ARN mediante ADN ramificado es el único procedimiento que no necesita de una amplificación previa y, por lo tanto, tiene una sensibilidad inferior a la PCR. Es discutible si esto es importante o no a la hora de monitorear los tratamientos.<sup>4</sup> Es probable que no todos los genomas detectados correspondan a partículas virales realmente infecciosas. De cualquier forma, permite una apreciación indirecta del nivel de replicación viral. La determinación de la carga viral evolutiva en circunstancias patológicas particulares (tratamientos, modificaciones de la inmunidad, entre otros) es mucho más informativa que el

valor observado en una única determinación. Hoy día existen diversas pruebas comerciales para la cuantificación del ARN-VHC en suero, las más utilizadas son las que se basan en las técnicas enunciadas anteriormente. No obstante, debido a la complejidad de estos ensayos, la cantidad de pasos de los mismos, así como la variabilidad en la interpretación de los resultados, hacen muy difícil la reproducibilidad entre ensayos que utilicen principios diferentes.

En la actualidad existen métodos manuales y semiautomáticos para la determinación cualitativa y cuantitativa del ARN-VHC<sup>5</sup> (cuadro 1).

**Cuadro 1.**  
**Ensayos más utilizados para detectar o cuantificar el ARN del VHC<sup>5</sup>**

Ensayos	Principio de ensayo	Productor	Límite de detección o rango lineal (UI/mL)
Cualitativos Amplicor HCV v2.0	RT-PCR (manual)	Roche Molecular Systems	50
Versant HCV RNA Qualitative Assay	TMA (amplificación mediada por la transcripción)	Bayer Diagnostics	10
Umelosa HCV cualitativo	RT-PCR y Nested PCR (manual)	Tecno SUMA Internacional S.A.	100
Cuantitativos LCX HCV RNA Quantitative Assay	PCR competitiva (semiautomático)	Abbott Diagnostics	25-2 630 000
SuperQuant	RT-PCR competitiva (semiautomático)	National Genetics Institute	30-1 470 000
Amplicor HCV Monitor v2.0	RT-PCR competitiva (manual)	Roche Molecular Systems	600-<500 000
Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0	RT-PCR competitiva (semiautomático)	Roche Molecular Systems	600-<500 000
Versant HCV RNA 3.0 Quantitative Assay	Branched-DNA ADN ramificado	Bayer Diagnostics	615

**Cuadro 2.**  
**Factor de conversión de las antiguas unidades no estandarizadas de cuantificación del ARN del VHC a UI en ensayos comerciales<sup>6</sup>**

Ensayos cuantitativos	Factor de conversión
Amplicor HCV Monitor v2.0 (manual)	1 UI/mL = 0.9 copies/ml
Cobas Amplicor Monitor v2.0 (semiautomático)	1 UI/mL = 2.7 copies/ml
Versant HCV RNA 3.0	1 UI/mL = 5.2 copies/ml
LCX HCV RNA	1 UI/mL = 3.8 copies/ml
SuperQuant	1 UI/mL = 3.4 copies/ml

La mayoría de los pacientes con VHC que no han sido tratados tienen de 50 mil UI/mL a 5 millones UI/mL, por lo que las diferencias en el límite de detección no son muy importantes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos han buscado consenso en cuanto a emitir un estándar internacional de ARN del VHC para que cada sistema lo evalúe y relacione sus propias unidades con las unidades internacionales (UI), para de esta manera hacer comparables los resultados que se obtienen entre los distintos grupos de trabajo<sup>6</sup> (cuadro 2).

Hasta ahora las pruebas moleculares se habían realizado para patógenos individuales y en grupos de individuos de alto riesgo, pero en la actualidad se han comenzado a desarrollar nuevas técnicas para llevar a cabo multiensayos para la determinación de diferentes patógenos. Estos multiensayos utilizan PCR múltiple con juegos de cebadores de amplio rango, lo cual abarata su costo y pueden ser utilizados para pesquisajes en bancos de sangre, por ejemplo, de HIV, HCV y HBV simultáneamente en un grupo elevado de muestras. A esta tecnología se le ha llamado "biochip", y en el caso de que se

utilice para estudiar muchas secuencias de ácidos nucleicos, se le denomina "DNA chips" o microarreglos de ADN.<sup>7</sup>

## Métodos para determinar el genotipo del VHC

El genotipo del virus es una característica intrínseca de la cadena del VHC transmitida que no cambia durante la infección<sup>4</sup> Se han descrito seis genotipos con variaciones en su secuencia nucleotídica entre 30 y 50% y más de 50 subtipos (1a, 1b, 2a, etc.) con variaciones entre 15 y 30%.<sup>7,8</sup>

El método de tipaje del VHC se escogerá según la experiencia del laboratorio y el objetivo del tipaje. Para determinar todos los subtipos y para identificar nuevas secuencias, la metodología de elección será amplificación por PCR seguida de secuenciación. Sin embargo, en protocolos de terapia, el objetivo consiste en separar a los pacientes infectados con genotipo 1 de aquellos que padecen cualquier otro, tarea que puede ser cumplimentada con cualquiera de los métodos mencionados.<sup>9</sup>

Se ha demostrado una asociación entre la infección con el genotipo 1b y enfermedad hepática más severa y agresiva que la producida por otros genotipos.<sup>9-11</sup> De ahí que conocer el genotipo permite predecir la respuesta virológica a la terapia, la duración de la misma, así como la dosis a emplear.<sup>12,13</sup> Entre los distintos genotipos del VHC la secuencia de la región 5' NC está relativamente conservada, y es la que se aplica con mayor frecuencia para el diagnóstico por PCR de la infección por el VHC. Por el contrario, las secuencias de las regiones NS3, NS5 y core son más variables y, por tanto, se usan con frecuencia para definir y distinguir entre los genotipos del VHC. Previo al tratamiento, el médico deberá determinar tanto el genotipo como la carga viral (especialmente para el genotipo 1), con el objetivo de proveer el tratamiento más efectivo al paciente, ya que existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica, la resolución de la enfermedad y la respuesta a la terapia entre los distintos genotipos. Son necesarios métodos de genotipado confiables, para los que se han desarrollado procedimientos moleculares y serológicos.<sup>13,14</sup>

## Determinación molecular del genotipo del VHC

La prueba de oro (y la más definitoria) para el genotipaje del VHC es la secuenciación directa de las regiones NS5b y E1 obtenidas por PCR a partir de la muestra del paciente, seguida de un alineamiento de secuencia con aquéllas de referencia y estudios filogenéticos.<sup>15</sup> Otras regiones del genoma viral a estudiar por este procedimiento son el core, NS5 en su totalidad y 5' NC. Este método es impracticable a gran escala debido a la complejidad del procedimiento. Aun con la introducción de los métodos de secuenciación automática, que no requieren de isótopos radiactivos, son pocos los laboratorios que cuentan con el equipamiento que se necesita para realizarlo regularmente. Además, la secuenciación del ADN amplificado no suele identificar infecciones mixtas de dos genotipos distintos.<sup>16</sup> El serotipaje tiene ventajas que lo hacen apropiado para grandes estudios epidemiológicos: bajo riesgo de contaminación y sencillez del ensayo; pero carece de especificidad y sensibilidad, lo cual limita su utilidad.<sup>16</sup>

Otros métodos dependen principalmente de la amplificación de ARN-VHC de muestras clínicas, seguida de un proceso de reamplificación con cebadores tipo-específicos, o hibridación con sondas tipo-específicas,<sup>17-19</sup> o por digestión de los productos de PCR con endonucleasas de restricción que reconocen sitios de corte específicos para cada genotipo.<sup>20</sup> Para este último método se han empleado las regiones NS5 y 5' NC.<sup>21</sup>

En la práctica, el genotipaje del VHC se realiza mediante hibridación reversa a una sonda oligonucleotídica específica para un genotipo, por análisis de secuenciación directa o mediante análisis de restricción por la técnica del RFLP (*restriction fragment length polymorphism analysis*).<sup>22,23</sup>

Existen diversos estuches comerciales para la determinación genotípica del VHC basados en la amplificación de la región 5' no codificadora mediante PCR. Uno de ellos consiste en la secuenciación directa de los amplicones obtenidos por PCR, seguida de la comparación de secuencias con las ya existentes en base de datos: Trugene HCV 5' NC Genotyping (Visible Genetics, Toronto, Ontario, Canadá).<sup>24</sup> El otro se basa en la hibridación reversa de los amplicones obtenidos por PCR a una membrana de nitrocelulosa recubierta por sondas oligonucleotídicas específicas para genotipo, y posterior revelado colorimétrico de los híbridos: INNO-LIPA HCV II (Innogenetics, Gante, Bélgica).<sup>24,25</sup> Estos dos estuches que describimos identifican los seis genotipos y un gran número de subtipos, el INNO-LIPA distingue los subtipos 1a, 1b, 2a al 2c, 3a al 3c, 4a al 4h, 5a y 6a.<sup>25</sup>

Otro método usado es el 1300 Hepatitis C Genotyping (hcvg) de ViraCor Laboratories, que permite la distinción entre los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 y 6 a través de un ensayo de PCR en tiempo real a partir del ARN-VHC. Se extrae el ácido nucleico del plasma y se realiza una RT-PCR al ARN diana. Los genotipos del 1 al 6 se detectan mediante la utilización de oligonucleótidos cebadores y sondas específicos para los distintos genotipos, aplicando la técnica de PCR en tiempo real (Taq-Man®).<sup>25</sup>

En 2005 Roche Molecular Systems (Branchburg, NJ, Estados Unidos) lanzó el estuche Linear Array HCV Genotyping Test para la determinación del genotipo del VHC. Se basa en la amplificación por RT-PCR del ARN objetivo para generar ADNc, hibridación de los amplicones con sondas oligonucleotídicas que permiten la identificación independiente de los seis genotipos del VHC y finaliza con la detección de los productos amplificados fijados a las sondas mediante determinación colorimétrica.<sup>26</sup>

Todos estos métodos son capaces de identificar correctamente los principales grupos genotípicos, pero sólo la secuenciación nucleotídica directa permite discernir eficientemente entre los subtipos. En general todos se basan en la técnica de la PCR: caros, de larga duración y requieren de equipamiento especializado para ser ejecutados con precisión y sin contaminaciones. Su fiabilidad se afecta por la pérdida del ARN del suero o plasma debido a un mal manejo en el laboratorio o durante el almacenamiento, o si estaba ausente de la circulación durante la colecta de la muestra. Sus ventajas incluyen su alta confiabilidad si se realiza con precisión, así como la capacidad para brindar información relevante para la patogénesis molecular del VHC.<sup>16</sup>

### Determinación serológica del genotipo del VHC

Los anticuerpos específicos para el genotipo pueden emplearse como marcadores indirectos del genotipo del VHC.<sup>27</sup> Entre los métodos comerciales disponibles se encuentra el RIBA SIA (Chiron Corporation, Emeryville, California, Estados Unidos), que contiene secuencias peptídicas específicas para serotipos: cinco provenientes de la región NS4 y dos de la región core de los genomas del VHC de los genotipos 1, 2 y 3.<sup>28</sup>

Un método de serotipaje basado en EIA competitivo es el estuche Murex HCV Genotyping 1-6 Assay (Murex Diagnostics, Dartford, Reino Unido). Detecta anticuerpos específicos para genotipos dirigidos a los epítomos codificados por la región NS4 de los genomas de los seis genotipos (1-6). Permite obtener resultados interpretables en el 90% de los pacientes inmunocompetentes con hepatitis C crónica, aunque su sensibilidad es baja en pacientes hemodializados o inmunodeprimidos.<sup>29,30</sup>

Se ha observado concordancia entre ambos métodos (mayor de 96% para los genotipos 1-3) y con los

métodos de genotipaje molecular, pero la fiabilidad del serotipaje puede variar de acuerdo con la distribución de los genotipos en un área geográfica específica.<sup>31</sup>

### Interpretación de las pruebas de diagnóstico y seguimiento del virus C de la hepatitis

La interpretación de las pruebas de hepatitis C depende de la sensibilidad y la especificidad de las técnicas que se utilicen en el diagnóstico. Éstas, a su vez, dependen de la prevalencia de la infección en la población de estudio, así, por ejemplo, la mayoría de los pacientes de bajo riesgo con ELISA positivo, pero RIBA negativo, no son virémicos, y por tanto no presentan infección por el VHC.<sup>32</sup> En el cuadro 3 se muestran algunos ejemplos.

En pacientes con resolución espontánea de la infección la respuesta anti-VHC puede persistir a lo largo de la vida, o disminuir ligeramente mientras permanece detectable, siendo simplemente portadores de una huella serológica, o desaparecer de forma gradual después de varios años.<sup>32</sup>

**Cuadro 3.**  
Interpretación de las pruebas de hepatitis C<sup>32</sup>

Anti-VHC	RIBA	ARN-VHC	Posibles interpretaciones
Negativo	Negativo	Negativo	No hay infección
Positivo	Positivo	Positivo	Hay infección por VHC
Positivo	Positivo	Negativo	Infección resuelta Paciente tratado, ARN por debajo de los límites de detección (verificado con PCR cualitativa de ARN-VHC)
Positivo	Negativo	Negativo	Falso positivo a anti-VHC (<1%)
Negativo	Negativo	Positivo	Infección presente (en general en pacientes inmunodeprimidos o hemodializados)
			Infección aguda, periodo de ventana de anticuerpos
			Falso positivo o contaminación del ensayo de ARN-VHC

### Pruebas serológicas en personas asintomáticas

Las pruebas para detectar la infección por VHC en personas asintomáticas pueden traer varios beneficios, incluida la evaluación de una posible enfermedad hepática crónica y la instauración del tratamiento correspondiente. El resultado de las pruebas permite, a su vez, emitir consejos por parte de los profesionales para evitar el uso del alcohol y de medicamentos hepatotóxicos, los cuales podrían acelerar la evolución del daño hepático.

Se deben considerar diversas cuestiones al seleccionar a las personas para las pruebas. Es posible que los pacientes no cambien sus prácticas de alto riesgo o el consumo de alcohol basándose en el conocimiento de los resultados de sus pruebas, no se sabe si el tratamiento de pacientes infectados por el VHC asintomáticos da como resultado una menor morbilidad o una supervivencia más

prolongada. Además, las pruebas de detección de la infección por el VHC pueden causar una ansiedad considerable, porque la divulgación de los resultados de las pruebas a otras personas puede resultar en relaciones personales interrumpidas. En estos casos se debe informar a los pacientes que se realizarán pruebas de infección por VHC, que los resultados serán confidenciales y se ofrecerá el asesoramiento y la derivación adecuados si los resultados son positivos.

#### Conflicto de intereses

Los autores de este manuscrito no tienen conflictos de intereses por revelar.

#### Fuentes de financiamiento

No hubo financiamiento de institución o empresa para este fin.

## Referencias

1. Strader, D.B., Wright, T., Thomas, D.L. y Seeff, L.B., "Diagnosis, management and treatment of hepatitis c", *Hepatology*, 2004, 39 (4): 1147-1171.
2. Komurian-Pradel, F., Paranhos-Baccala, G. *et al.*, "Quantitation of HCV ARN using real-time PCR and fluorimetry", *J Virol Methods*, 2001, 95 (1-2): 111-119.
3. Halfon, P., Bourliere, M. *et al.*, "Real-time PCR assays for HCV ARN quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection", *J Clin Microbiology*, 2006, 44 (7): 2507-2511.
4. Pawlotsky, J.M., "Molecular diagnosis of viral hepatitis", *Gastroenterology*, 2003, 122: 1554-1568.
5. Carey, W., "Tests and screening strategies for the diagnosis of hepatitis c", *Cleveland Clin J Medicine*, 2003, 70 (4): 7-13.
6. Pawlotsky, J.M., "Use and interpretation of virological tests for hepatitis c", *Hepatology*, 2002, 36 (5): s65-s73.
7. Sun, Z.H., Ma, W. y Zheng, W., "Microarrays development in the diagnosis of HBV and HCV", *Med J Chin PLA*, 2003, 28: 375-376.
8. Bukh, J., Miller, R.H. y Purcell, R.H., "Genetic heterogeneity of hepatitis c virus: quasispecies and genotypes", *Semin Liver Dis*, 1995, 1 (15): 41-63.
9. Zein, N.N., "Clinical significance of hepatitis c virus genotypes", *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13: 223-225.
10. Lau, J.Y., Davis, G.L., Prescott, L.E., Maertens, G., Lindsay, K.L., Qian, K., Mizokami, M. *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: 868-876.
11. Noursbaum, J.B., Pol, S., Nalpas, N., Landais, P., Berthelot, P., Brechot, C. y Collaborative Study Group, "Hepatitis c virus type 1b (ii) infection in France and Italy", *Ann Intern Med*, 1995, 122: 161-168.
12. Michinori, K., "Hepatitis c virus genotypes 1 and 2 respond to interferon-alpha with different virologic kinetics", *J Infectious Dis*, 1995, 172 (4): 934-938.
13. Qu, D., Li, J.S., Vitvitski, L., Mechai, S., Berby, F., Tong, S.P., Bailly, F. *et al.*, "Hepatitis c virus genotypes in France: comparison of clinical features of patients infected with HCV type I and type II", *J Hepatol*, 1994, 21: 70-75.
14. Davis, G., "Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis c", *Hepatology*, 2002, 36 (5): s145-s151.
15. Simmonds, P., "Viral heterogeneity of the hepatitis c virus", *J Hepatol*, 1999, 31 (1): 54-60.
16. Zein, N.N., "Clinical significance of hepatitis c virus genotypes", *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13: 223-225.
17. Li, J.S., Vitvitski, L., Tong, S.P. y Trepo, C., "Identification of the third major genotype of hepatitis c virus in France", *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 199: 1474-1481.
18. Hane, Y., Sugai, Y. *et al.*, "Typing hepatitis c virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources", *J Gen Virol*, 1992, 73: 673-679.
19. Widell, A., Shev, S., Mansson, S., Zhang, Y.Y., Foberg, U., Norkrans, G. *et al.*, "Genotyping of hepatitis c virus isolates by a modified polymerase chain reaction assay using type specific primers: epidemiological applications", *J Med Virol*, 1994, 44: 272-279.
20. McOmish, F., Chan, S.W., Dow, B.C., Gillon, J., Frame, W.D., Crawford, R.J., Yap, P.L. *et al.*, "Detection of three types of hepatitis c virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities", *Transfusion*, 1993, 33: 7-13.
21. Nakao, T., Enomoto, N., Takada, N., Takada, A. y Date, T., "Typing of HCV genomes by restriction fragment length polymorphism", *J Gen Virol*, 1991, 72: 2105-2112.
22. Stuyver, L., Wyseur, A., Van Arnhem, W., Lunel, F., Laurent-Puig, P., Pawlotsky, J.M., Kleter, B. *et al.*, "Hepatitis c virus genotyping by means of 5'-UR/core line probes assays and molecular analysis of untypeable samples", *Virus Res*, 1995; 38: 137-157.
23. Stuyver, L., Wyseur, A., Van Arnhem, W., Hernández, F. y Maertens, G., "Second-generation line probe assay for hepatitis c virus genotyping", *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 2259-2266.
24. Ansaldi, F., Torre, F., Bruzzone, B.M., Picciotto, A., Crovari, P. e Icardi, G., "Evaluation of a new hepatitis c virus sequencing assay as a routine method for genotyping", *J Med Virol*, 2001, 63: 17-21.
25. Maertens, G. y Stuyver, L., "Genotypes and genetic variation of hepatitis c virus. The molecular medicine of viral hepatitis", en T.J. Harrison y A.J. Zuckerman (eds.), Chichester, Gran Bretaña, John Wiley & Sons, 1997, pp. 182-233.
26. "Manual de instrucciones del estuche Linear Array Hepatitis c Virus Genotyping Test", Roche Molecular Systems, 2005.
27. Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Maki, N., Ohta, Y., Miki, K., Mizokami, M., Ohba, K.I. *et al.*, "Antigenicity of group I and II hepatitis c virus polypeptides-molecular basis of diagnosis", *Virology*, 1993, 192: 430-437.
28. Dixit, V., Quan, S., Martin, P., Larson, D., Brezina, M., DiNello, R., Sra, K. *et al.*, "Evaluation of a novel genotyping system for hepatitis c virus: strong correlation with standard genotyping methodologies", *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2978-2983.
29. Kobayashi, M., Chayana, K., Arase, Y., Tsubota, A., Saitoh, S., Suzuki, Y., Ikeda, K. *et al.*, "Enzyme-linked immunosorbent assay to detect hepatitis c virus serological groups 1 to 6", *J Gastroenterol*, 1999, 34: 505-509.
30. Leruez-Ville, M., Nguyen, Q.T., Cohen, P., Cocco, S., Nouyou, M., Ferriere, F. y Deny, P., "Large-scale analysis of hepatitis c virus serological typing assay: effectiveness and limits", *J Med Virol*, 1998, 55: 18-23.
31. Gish, R.G., Qian, K.P., Quan, S., Xu, Y.L., Pike, I., Polito, A., Di-Nello, R. *et al.*, "Concordance between hepatitis c virus serotyping assays. J Viral Hepatol 1997; 4: 421-422.
32. Lefrere, J.J., Guiramand, S., Lefrere, F.F., Mariotti, M., Aumont, P., Lerable, J., Petit, J.C. *et al.*, "Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis c virus", *J Infect Dis*, 1997, 175: 316-322.