

Expertos Invitados

DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD MENINGOCOCICA POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA



Columnista Experta de SIIC
Dra. Carmen Muñoz Almagro

Responsable Unidad Microbiología Molecular, Barcelona, España

Introducción

La enfermedad meningocócica es un grave problema de salud pública. *Neisseria meningitidis* es el agente causal de esta enfermedad que puede presentarse de forma endémica o epidémica. Actualmente, los brotes epidémicos suelen presentarse en los países en vías de desarrollo, donde alcanzan tasas de ataque superiores a los 500 casos por 100 000 habitantes.¹ En los países industrializados en que la enfermedad es endémica, *N. meningitidis* es –dada su prevalencia y alta letalidad,² que puede oscilar entre 4% y 10% de los casos³⁻⁵– la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa en niños. La incidencia de la enfermedad meningocócica varía entre países y regiones del mismo entorno. Así, en Europa se calcula una tasa promedio de 1.3 a 1.7 casos anuales por 100 000 habitantes, pero se encuentran variaciones tan amplias como 0.3 casos por 100 000 habitantes, en Italia, o 3.6 casos en Inglaterra o Gales.⁶ En Cataluña, la incidencia anual estimada es de 2.4 casos por 100 000.⁷

Uno de los factores que pueden influir en las diferencias de los casos informados, podría ser la falta de uniformidad de los distintos sistemas de declaración utilizados. La probabilidad de que todo caso de enfermedad meningocócica sea notificado y la probabilidad de que todo caso notificado sea verdaderamente una enfermedad meningocócica puede variar si los métodos de diagnóstico no son adecuadamente sensibles y específicos. Es conocida la amplia diferencia entre los casos declarados por sospecha clínica y los casos confirmados en el laboratorio de microbiología. La diferencia se debe fundamentalmente a la baja sensibilidad del cultivo tradicional, dado que *N. meningitidis* es un organismo muy lábil. Esta baja sensibilidad se incrementó en los últimos años debido a la administración generalizada de antibióticos en forma temprana, antes de remitir al paciente al centro hospitalario. Esta intervención es actualmente recomendada,⁸ por tanto es previsible que el número de pacientes remitidos al hospital de referencia con antibioticoterapia ya instaurada se incremente en los próximos años.

Las técnicas de amplificación molecular permiten la identificación de *N. meningitidis* con elevada sensibilidad y especificidad, incluso en muestras de pacientes previamente tratados con antibióticos. En los últimos años estas técnicas se generalizaron no sólo para la identificación del microorganismo sino también para su caracterización precisa: identificación serológica de subgrupos,⁹ estudio de relaciones clonales¹⁰ y relación de la carga bacteriana con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.¹¹

Presentamos la contribución de las técnicas moleculares en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad meningocócica en pacientes pediátricos atendidos en el Hospital Universitario de Sant Joan de Déu, de Barcelona, España.

Período de estudio

Se incluyen todos los pacientes menores de 18 años con diagnóstico clínico de enfermedad

meningocócica invasiva atendidos en el Hospital Universitario Sant Joan de Déu desde enero de 2001 hasta diciembre de 2005.

El Hospital Sant Joan de Déu, es un hospital de referencia pediátrico (menores de 18 años) con 345 camas, 14 de ellas de cuidados intensivos, ubicado en el área metropolitana de Barcelona. La población pediátrica de esta área se estima en 200 000 habitantes. Debido a su condición de centro de alta tecnología muchos de los pacientes con enfermedad meningocócica son remitidos desde otras áreas geográficas. El Servicio de Urgencias atiende a más de 70 000 niños al año y la sección de Cuidados Intensivos ingresa 1 000 pacientes al año.

Definiciones

Se consideró el diagnóstico de enfermedad meningocócica según la definición y clasificación del *Departament de Salut* de Catalunya,¹² disponible en la web www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/html/ca/professionals/spvemdo1.htm. En esta clasificación se considera caso sospechoso un cuadro clínico compatible sin confirmación por el laboratorio. El caso confirmado considera el cuadro clínico compatible con aislamiento del microorganismos o detección del ADN de muestras normalmente estériles como sangre, líquidos cefalorraquídeo, pleural, sinovial, pericárdico o líquido vesicular de las lesiones purpúricas. La enfermedad se clasificó como fulminante, aguda y subaguda según su evolución desde el inicio de los síntomas hasta la presentación del *shock* séptico con asistencia hospitalaria:⁴ fulminante cuando el *shock* aconteció en las primeras 8 horas; aguda, entre 9 y 24 horas, y subaguda, más 24 horas, sin *shock*.

Identificación de los pacientes

Los pacientes se identificaron por revisión de los sistemas informatizados de resultados analíticos del Hospital y de la codificación de los informes de alta (CMBDAH con CIM-9-MC). En estas dos bases de datos se incluyen de forma sistemática todos los resultados analíticos (tipo de muestra, resultado del cultivo y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sensibilidad antibiótica, serogrupo), así como datos epidemiológicos (edad, sexo, fechas de ingreso y de alta) y clínicos (diagnóstico al ingreso, intervenciones, comorbilidad, evolución clínica, diagnóstico al alta).

Estudios microbiológicos

El aislamiento por cultivo y serogrupo de *N. meningitidis* se realizó según métodos bioquímicos y serológicos tradicionales. La sensibilidad a los diferentes antimicrobianos se analizó con el método E-Test (AB Biodisk). Los criterios de sensibilidad fueron acordes con lo establecido por los *Clinical Laboratory Standards Institute*.¹³

Estudio por técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Durante el período 1999-2000 evaluamos una técnica de PCR con hibridación del producto amplificado en placa ELISA y comprobamos la excelente sensibilidad y especificidad de la técnica.¹⁴ En el año 2001, la PCR se incorporó como estudio rutinario en los pacientes ingresados con sospecha de enfermedad meningocócica. Inicialmente se utilizó como diana un fragmento de la secuencia de inserción IS1106. En enero de 2004 se sustituyó esta PCR tradicional por otra PCR en tiempo real (PCR-TR) con detección simultánea de *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* usando sondas TaqMan y *primers* del gen *CtrA* (específico de *N. meningitidis*) y del gen de la neumolisina (específico de *S. pneumoniae*).¹⁵ Para el diseño de los *primers* se utilizó el software Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). La duración de la técnica PCR-TR desde la recepción de la muestra en el laboratorio de microbiología molecular es de 3 horas.

Análisis estadístico

Se determinaron las tasas de incidencia de enfermedad meningocócica según los casos diagnosticados sobre la población pediátrica (menores de 18 años) del Hospital Sant Joan de Déu. La población de referencia de esta misma franja de edad se estimó según datos del censo publicado en la página web del Instituto Catalán de Estadística. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo del cultivo y de la PCR considerando como referencia el diagnóstico clínico de alta hospitalaria. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de χ^2 cuando se cumplían las condiciones para su aplicación; en caso contrario, se usó la prueba exacta de Fisher. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 12.0 para

Windows.

Resultados

Datos generales

Durante el período de estudio, se declararon 148 casos de enfermedad meningocócica en 63 niñas y 85 niños. La edad media de los pacientes fue de 4.7 años, con un intervalo de 1 mes a 17 años. De los 148 casos, 70 residían en el área de referencia del Hospital y fueron incluidos para el estudio de incidencia. El resto de los pacientes fueron remitidos desde otras áreas geográficas. La incidencia media anual por 100 000 niños menores de 18 años en nuestra área geográfica fue de 7.4 casos al año, destacándose en el año 2002 un pico de 11 casos por 100 000 niños (tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas, epidemiológicas y serogrupos de *N.meningitidis* en pacientes con Enfermedad Meningocócica atendidos en el Hospital Sant Joan de Déu

Año	Nº Pat	Tasa anual por 100000 <18 años	media edad	Sexo niños (%)	Presentación clínica			Ingreso en UCIP	Exitus	Presentación de la Enfermedad al Ingreso. n=144			Serogrupos identificados (n=62)			
					sepsis (%)	mening. (%)	sepsis con mening. (%)			fulminante	aguda	sub aguda	B (%)	C (%)	W135 (%)	A (%)
2001	22	5,7	5,4	14	8	5	8	15	2	5	13	4	6	2	0	0
2002	30	11,1	5,1	15	11	8	11	10	3	2	21	0	13	4	0	0
2003	30	5,9	4,7	23	19	6	5	13	2	4	19	6	7	2	0	0
2004	29	6,8	4,3	14	8	3	18	15	0	4	10	8	10	0	1	1
2005	37	7,5	4,5	19	13	7	17	27	1	3	27	6	16	0	0	0
Tota	148	7,4	4,8	85 (57,4)	59 (39,8)	29 (19,5)	59 (39,8)	90 (60,8)	8 (5,4)	18 (12,5)	98 (66,6)	30 (20,8)	52 (83,8)	8 (13)	1 (1,6)	1 (1,6)

*1 caso adicional de artritis meningocócica

Antes del ingreso en nuestro centro hospitalario 59 pacientes habían recibido antibioticoterapia. La presentación clínica del total de casos atendidos fue: sepsis meningocócica en 59 pacientes (39.86%), meningitis en 29 (19.59%), sepsis con meningitis en 59 (39.86%) y, en un caso (0.67%), artritis meningocócica. Noventa pacientes requirieron ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos: 38 pacientes con clínica de sepsis, 5 con meningitis y 47 con sepsis y meningitis. En 144, la historia clínica reflejaba el tiempo libre de síntomas hasta la presentación del shock con requerimiento de asistencia hospitalaria. En 18 de los 144 casos (12.5% del total) la presentación de la enfermedad fue fulminante, con un intervalo libre de síntomas hasta la presentación de shock séptico o signos meníngeos menor de 8 horas; en 96 casos (66.67%), la presentación fue aguda, y en 30 (20.83%), subaguda. Globalmente, fallecieron 8 pacientes (tasa de letalidad del 5.4%). Los pacientes con evolución subaguda de la enfermedad fueron los que presentaron la tasa de letalidad más alta (6.6%). La evolución de los serogrupos de los casos confirmados muestra un amplio dominio del serogrupo B, 83.8% del total de casos, se destaca en los dos últimos años la desaparición del serogrupo C y la presencia de serogrupos no habituales en nuestra área geográfica como el A y el W135.

Confirmación microbiológica de los casos declarados. Contribución de la técnica de PCR

A pesar de la disponibilidad de la técnica de PCR para el estudio rutinario de todos los pacientes con sospecha de enfermedad meningocócica, solo 100 de los 148 pacientes fueron estudiados tanto por PCR como por cultivo. La confirmación microbiológica en nuestro centro de los 48 pacientes estudiados únicamente por cultivo se logró sólo en 22 casos (45.8%), mientras que en los 100 pacientes en los que se agregó la PCR, el diagnóstico microbiológico se alcanzó en 78 casos (78%). Cinco pacientes tuvieron resultados positivos sólo del cultivo, 38 sólo por PCR y 35 por cultivo y PCR. El incremento del diagnóstico microbiológico en este grupo al añadir la técnica de PCR fue del 38% p < 0.01 (tabla 2). El incremento del diagnóstico al comparar el grupo de pacientes estudiados sólo por cultivo con el estudiado por las dos técnicas fue del 32.2%.

Tabla 2. Resultados del estudio Microbiológico por Cultivo y PCR en 100 pacientes diagnósticos de Enfermedad Meningocócica

Diagnostico Clínico	N° Pacientes	Diagnostico Microbiológico			
		Cultivo		PCR	
		Resultados Positivos	Sensibilidad %	Resultados Positivos	Sensibilidad %
Enfermedad Meningocócica	100	40	40	73	73
Sepsis Meningocócica	41	13	31,7	23	56
Meningitis	16	10	62,5	15	93,7
Sepsis con Meningitis	43	17	39,5	35	81,3
<i>Presentación fulminante</i>	15	5	33,3	11	73,3
<i>Presentación aguda</i>	68	28	41,1	50	73,5
<i>Presentación Subaguda</i>	16	7	43,7	11	68,7
Pacientes Expuestos a betalactámicos	37	5	13,5	25	67,5
*Sepsis Meningocócica	13	2	15,3	7	53,8
*Meningitis	5	2	40	5	100
*Sepsis con Meningitis	19	1	5,2	13	68,4
<i>Presentación fulminante</i>	3	0	0	2	66,6
<i>Presentación aguda</i>	28	3	10,7	18	64,2
<i>Presentación Subaguda</i>	6	2	33,3	5	83,3
Pacientes no expuestos	63	35	55,5	48	76,1
*Sepsis Meningocócica	28	11	39,2	16	57,1
*Meningitis	11	8	72,7	10	90,9
*Sepsis con Meningitis	24	16	66,6	22	91,6
<i>Presentación fulminante</i>	12	5	41,6	9	75
<i>Presentación aguda</i>	40	25	40	32	80
<i>Presentación Subaguda</i>	10	5	50	6	60

Es de destacar un caso de sepsis meningocócica con meningitis en el que se detectó por PCR coinfección por *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*, por cultivo sólo se aisló el meningococo. Estos resultados fueron reproducibles en muestras consecutivas.

Se comparó la sensibilidad de la PCR y el cultivo según el antecedente de toma de antibióticos previa a la extracción de la muestra para estudio microbiológico. De los 100 pacientes estudiados por PCR y cultivo, en 37 existía el antecedente de antibioticoterapia previa a la extracción de las muestras para estudio microbiológico. La sensibilidad del cultivo en los pacientes pretratados fue del 13.5% (5 casos) mientras que la sensibilidad de la PCR fue del 67.5% (25 casos). Respecto de los pacientes sin tratamiento previo la sensibilidad del cultivo fue del 55.5% (35 de 63 casos) mientras que la de la PCR fue del 76.1% (48 de 63 casos). No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad de la PCR según el antecedente o no de antibioticoterapia. Como era de esperar, el menor rendimiento del cultivo en los pacientes expuestos fue estadísticamente significativo $p < 0.002$.

Se comparó la sensibilidad del cultivo y de la PCR según la presentación fulminante (15 casos), aguda (68 casos) o subaguda (16 casos). En un caso no se conocía este antecedente. Es de destacar el incremento significativo de la sensibilidad de la PCR frente al cultivo en las formas fulminantes de la enfermedad, con sólo detección positiva por cultivo en cinco casos: 33.3% frente a 73.3% de la PCR (11 casos) $p < 0.0001$. En las formas de presentación aguda la sensibilidad del cultivo fue del 41.1% (28 casos) y la de la PCR 73.5% (50 casos) $p < 0.0001$. En el grupo con enfermedad subaguda observamos un menor incremento diagnóstico de la PCR: 43.7% cultivo (7 casos) y 68.7% PCR (11 casos) (tabla 2).

Discusión

Los datos que presentamos muestran una clara contribución de la detección por PCR del ADN de *N. meningitidis* para la confirmación microbiológica de los casos declarados de enfermedad meningocócica. El incremento encontrado es similar al comunicado en series anteriores.^{14,16,17} Dadas las características pediátricas de nuestra serie es remarcable el escaso volumen de muestra necesaria para obtener este buen rendimiento. Otro aspecto interesante es la rapidez de la prueba. En el caso de la PCR tradicional que utilizamos en los primeros años, la duración de la técnica era de 5 horas, con trabajo manual de 3.5 horas, mientras que la duración por tecnología de PCR-TR se reduce a 3 horas, estando totalmente automatizadas las 2 últimas horas (fases de amplificación

y detección del ADN ya extraído). Actualmente, es posible automatizar también la fase de extracción de ADN con robots con capacidad para procesar en pocos minutos un elevado número de muestras.¹⁸

Un hecho muy interesante en la práctica clínica es que el rendimiento de estas técnicas moleculares no queda significativamente reducido a pesar de la exposición previa a betalactámicos. Este hecho explica que la mayor diferencia encontrada entre la sensibilidad de la PCR y la del cultivo se observe en pacientes que habían recibido antibioticoterapia previa al procesamiento de la muestra (13.5% vs. 67.5%).

Algunos de los clásicos inconvenientes publicados sobre las técnicas moleculares eran su costo económico y la falta de universalidad del procedimiento para la detección en una misma serie de trabajo de las principales bacterias causantes de infección sistémica. Respecto del costo económico, en nuestro caso, los reactivos necesarios para el procedimiento por PCR-TR fueron significativamente más económicos que los tradicionales (30 euros vs. 3 euros). Respecto del segundo inconveniente, la detección simultánea de *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*, nos permitió cubrir los dos principales agentes bacterianos causantes de sepsis y meningitis en el ámbito pediátrico en nuestro país. Sin embargo, otros agentes como *S. agalactiae*, *E. coli*, *H. influenzae* o *Listeria monocitogenes* deberían ser también estudiados. La detección del gen 16sRNA, común y específico de todas las bacterias prometía ser una vía interesante hace unos años, lamentablemente, la presencia de ADN residual bacteriano en el material y reactivos de laboratorio dificulta enormemente la utilidad de esta identificación genérica.^{19,20} La sencillez y automatización de la tecnología PCR-TR abre una interesante vía para el estudio de diferentes genes de un amplio número de patógenos. Destaca en nuestra serie la coinfección en un paciente por *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. Las infecciones mixtas son conocidas desde hace años. En 1987 Downs y col. comunicaban que el 1% de las meningitis eran debidas a más de un patógeno²¹ y otros autores encontraron este hecho y señalaron cómo los métodos tradicionales de cultivo pueden subvalorar estas infecciones múltiples.^{22,23}

Observamos una incidencia estable de la enfermedad, la tasa encontrada en nuestra población infantil es ligeramente superior a la informada por otros autores en la población general (adultos y niños) de nuestra área durante la década del '90. Así, Barquet y col. comunicaron una incidencia media anual de 5.47 casos por 100 000, y Cardeñosa y col., de 4.8.²⁴ Dado que nuestro estudio es estrictamente pediátrico y que es un hecho conocido la mayor incidencia en la población infantil podemos corroborar, como otros autores, la disminución de casos de esta enfermedad en los últimos años. Este descenso lo encontramos a pesar de haber mejorado el rendimiento del diagnóstico microbiológico con la introducción de la PCR en nuestra serie. Una de las causas que pueden explicar esta menor incidencia de la enfermedad respecto de años anteriores es la práctica ausencia del meningococo del grupo C en los últimos años. A mediados de los años '90, la introducción de un clon con fenotipo C:2b:P1.2.5 significó un incremento significativo del serogrupo C que hacía temer una expansión de la enfermedad.^{25,26} Este dato derivó en la recomendación universal de la vacunación contra el serogrupo C en nuestro país. Esta estrategia preventiva es por tanto la principal causa de la ausencia de este serogrupo. Las técnicas de amplificación molecular que hemos utilizado no permitían la clasificación serológica de subgrupos de las muestras positivas y esta deficiencia es un importante inconveniente para la monitorización de la enfermedad. Es por este motivo que en el año 2006 introdujimos la clasificación molecular serológica de subgrupos en muestra directa utilizando sondas y *primers* específicos de genes capsulares²⁷ y constatamos también con esta técnica la práctica ausencia del serogrupo C (datos no mostrados).

El procedimiento de PCR-TR permite cuantificar la carga bacteriana en la muestra si introducimos una serie de estándares de concentraciones conocidas. Diversos autores^{11,16} utilizaron este proceder y detectaron altas cargas bacterianas en los pacientes más graves con cifras de hasta 10⁷-10⁸ copias/ml. Con esta elevada concentración de bacterias y considerando que la PCR tradicional (menos sensible que la PCR-TR) puede detectar < 10 copias/ml es totalmente plausible que la sensibilidad no se reduzca a pesar del tratamiento en los pacientes más graves.¹⁰ Por otra parte, el hecho de que la menor carga bacteriana se encuentre en los pacientes más estables podría explicar el menor incremento de la sensibilidad de la PCR en comparación con el cultivo en el grupo de pacientes no tratados con presentación subaguda (43.7% vs. 68.7%).

En conclusión, el estudio del ADN de *N. meningitidis* en muestra directa por técnicas moleculares es un complemento valioso del cultivo bacteriológico y contribuye a la mejora del diagnóstico

microbiológico de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Woods CW, Armstrong G, Sackey SO, Tetteh C, Bugri S, Perkins BA, Rosenstein NE. Emergency vaccination against epidemic meningitis in Ghana: implications for the control of meningococcal disease in West Africa. *Lancet* 2000; 355(9197):30-3.
2. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001; 344(18):1378-88.
3. Hahne SJ, Charlett A, Purcell B, Samuelsson S, Camaroni I, Ehrhard I, Heuberger S, Santamaria M, Stuart JM. Effectiveness of antibiotics given before admission in reducing mortality from meningococcal disease: systematic review. *BMJ* 2006; 332(7553):1299-303.
4. Barquet N, Domingo P, Cayla JA, González J, Rodrigo C, Fernández Viladrich P, Moraga Llop FA, Marco F, Vázquez J, Sáez Nieto JA, Casal J, Canela J, Foz M. Prognostic factors in meningococcal disease. Development of a bedside predictive model and scoring system. Barcelona Meningococcal Disease Surveillance Group. *JAMA* 1997; 278(6):491-6.
5. Domínguez A, Cardenosa N, Panella H, Orcau A, Companys M, Alseda M, Oviedo M, Carmona G, Minguell S, Salleras L; Working Group on the Study of Meningococcal Disease in Catalonia, 1990-1997. The case-fatality rate of meningococcal disease in Catalonia, 1990-1997. *Scand J Infect Dis*. 2004; 36(4):274-9.
6. Pollard AJ. Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(12 Suppl):S274-S279.
7. Departament de Salut. Resum de les malalties de declaració obligatoria a catalunya durant l'any 2004. *Bull Epidemiol Catalunya* 2005; XXVI (número extraordinari): 152.
8. Meningitis Research Foundation. Meningococcal meningitis and septicaemia. Guidance Notes. www.meningitis.org/docs/GPleaflet.pdf.
9. Borrow R, Claus H, Guiver M, Smart L, Jones DM, Kaczmarek EB, Frosch M, Fox AJ. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. *Epidemiol Infect* 1997; 118(2):111-7.
10. Birtles A, Hardy K, Gray SJ, Handford S, Kaczmarek EB, Edwards-Jones V, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical samples and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12):6007-14.
11. Hackett SJ, Guiver M, Marsh J, Sills JA, Thomson AP, Kaczmarek EB, Hart CA. Meningococcal bacterial DNA load at presentation correlates with disease severity. *Arch Dis Child* 2002; 86(1):44-6.
12. Departament de Salut. Definición de cas de les malalties de declaració obligatoria 9 edició. Direcció General de Salut Pública 2004; 28.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Standards methods for dilution antimicrobial tests for bacterial growth aerobically: approved standard. NCCLS document M7-A5. Villanova PA: NCCLS, 2000.
14. Muñoz Almagro C, Palomeque A, Roca J, Gene A, Palacin E, Latorre C. Diagnóstico de la enfermedad meningocócica por reacción en cadena de la polimerasa. *Med Clin (Barc)* 2003; 120(19):721-4.
15. Frosch M, Edwards U, Bousset K, Krausse B, Weisgerber C. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol* 1991; 5:1251-1263.
16. Simultaneous Approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:855-57.
17. Newcombe J, Cartwright K, Palmer W, McFadden JJ. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1637-40.
18. Ovstebo R, Brandtzaeg P, Brusletto B, Foss Haug KB, Lande Knut, Hoinb EA, Kierulf P. Use of robotized DNA isolation and real-time to quantify and identify close correlation between levels of *Neisseria meningitidis* DNA and lipopolysaccharides in plasma and cerebrospinal fluid from patients with systemic meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2980-2987.
19. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1747-52.
20. Bottger EC. Frequent contamination of Taq DNA polymerase with DNA. *Clin Chem* 1990; 36:1258-59.
21. Downs NJ, Hodges GR, Taylor SA. Mixed Bacterial meningitis. *Rev Infect Dis* 9:693-703.
22. Prasad RS, Khuraijam GS. An unusual case of mixed bacterial meningitis in an immunocompetent adult. *J Infect* 39:98.
23. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1553-58.
24. Carmona G, Cardenosa N, Oviedo M, Orcau A, Panella H, Alseda M, Escatllar N, Company M, Domínguez A. Enfermedad meningocócica en Cataluña. España (1990-1997) *Med Clin (Barc)* 2004; 123(13):486-9.
25. Berron S, De la Fuente L, Martín E, Vázquez JA. Increasing incidence of meningococcal disease in Spain associated with a new variant of serogroup C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:85-89.
26. Latorre C, Gene A, Juncosa T, Muñoz C, González Cuevas A. *Neisseria meningitidis*: evolution of penicillin resistance and phenotype in a children's hospital in Barcelona, Spain. *Acta Paediatr* 2000; 89:651-5.
27. Mölling P, Jacobsson S, Bäckman, Olcen P. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and porA amplification by lightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4531-35.

● CARACTERÍSTICAS DE LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C ENTRE USUARIOS DE DROGAS INYECTABLES. ACTUALIZACIÓN

Columnista Experto de SIIC
Dr. Campbell Aitken

Senior Research Fellow. Illicit Drug Use and Blood Borne Virus Epidemiology, Melbourne, Australia

La combinación de métodos de redes sociales y epidemiología molecular comenzó a utilizarse recientemente en la investigación de enfermedades infecciosas. La utilización conjunta de estas técnicas permite identificar y descifrar patrones de enfermedad en agrupaciones complejas de seres humanos; así, la primera resulta útil para evaluar cómo se transmite la infección, mientras que la segunda se aplica a las relaciones y conductas que posibilitan esta transmisión. A partir del año 2000 comenzamos un estudio en el cual se combinaron por primera vez los métodos de redes sociales con la epidemiología molecular a fin de avanzar en nuestro conocimiento sobre la epidemiología del virus de la hepatitis C (VHC) entre usuarios de drogas intravenosas (UDI), para lo cual reclutamos una cohorte de 199 UDI, de los cuales 138 tenían ARN positivo para VHC, en una zona utilizada para consumo de drogas en Melbourne, Australia. Estudiamos muestras de sangre obtenidas de los participantes, al tiempo que se evaluaron datos informados por ellos, por medio del análisis de redes sociales y análisis moleculares filogenéticos de dos regiones del genoma del VHC. Los hallazgos de este estudio (denominado en lo sucesivo como Redes I) fueron publicados en varios artículos entre 2004 y 2005,¹⁻⁴ sus principales resultados se detallan a continuación:

- hubo una baja correlación entre las relaciones identificadas por técnicas de redes sociales y las que se delinearon por datos filogenéticos;¹
- la distancia social (número de vínculos que separan a los UDI) mostró escasa relación con la distancia genética entre secuencias virales;¹
- el cambio del fenotipo del VHC entre UDI se presenta al menos tan frecuentemente como las infecciones en individuos no infectados previamente, mientras que las tasas de incidencia del VHC calculadas tradicionalmente representan una minoría en la transmisión real del VHC entre UDI;²
- algunos UDI pueden ejercer conductas de alto riesgo para infección por VHC, con frecuencia similar y durante períodos comparables a los de otros UDI, sin presentar marcadores de infección;³
- las infecciones por genotipos mixtos de VHC se presentan en un subgrupo significativo de UDI y no se detectan con facilidad por ensayos de sondas alineadas (*line-probe assay* [LiPA], Bayer Diagnostics), que es el método más común de genotipificación.⁴

Aunque todos los resultados son relevantes, para mantener la claridad y brevedad del presente artículo nos ocuparemos principalmente de los dos primeros, que pueden describirse simultáneamente como mediciones de la correspondencia entre los datos de redes sociales y redes moleculares. Además de explorar los motivos por los que se obtuvieron estos resultados en Redes I, describiremos nuestra investigación actual (Redes II) y mencionaremos algunos de los datos preliminares obtenidos; asimismo, efectuaremos una breve revisión sobre las nuevas investigaciones en este tema, conocidas luego de la publicación de nuestros datos.

Correlación entre redes sociales y datos moleculares

En Redes I se solicitó a los UDI que propusieran o presentaran a nuestros trabajadores de campo a los integrantes de su red, que eran las personas con quienes se inyectaban drogas al mismo tiempo y en igual ubicación, al menos una vez en los 6 meses previos. Nuestros registros reunieron 577 relaciones diádicas o de pares que se inyectan y 66 pares de UDI con infecciones identificadas como posiblemente relacionadas filogenéticamente. Entre los pares de UDI con infecciones por VHC genéticamente relacionadas, sólo el 18.2% estaban socialmente vinculados, mientras que únicamente un 3.4% de los sujetos con ARN positivo vinculados socialmente tenían infecciones relacionadas. El bajo nivel de correlación entre nuestros datos filogenéticos y de redes sociales pudo deberse a una combinación de los siguientes motivos:

- Por parte de la red social, se presenta una situación de captura incompleta de un cuadro complejo;⁵ por lo que nuestra habilidad de rastrear patrones de infección por VHC a través de la

red social de UDI se vio disminuida por las limitaciones prácticas de encontrar y entrevistar a UDI específicos en un escenario callejero rápidamente cambiante.

- La naturaleza epidémica del VHC entre UDI dificulta la reconstrucción de patrones de infección; además, el VHC mantiene una elevada prevalencia entre UDI en Australia, ya que el 61% de los participantes en la encuesta del programa nacional de agujas y jeringas de Australia, tuvieron pruebas para anti-VHC positivas en 2005.⁶ Las mediciones recientes de incidencia entre UDI jóvenes o que se inician mostraron un 133% por año entre australianos que se han inyectado durante menos de 1 año⁷ y 41.8% por año entre UDI británicos menores de 30 años, o que se han inyectado por 6 años o menos.⁸ Los participantes en Redes I se habían estado inyectando durante más de 10 años en promedio y la prevalencia de anticuerpos contra VHC fue cercana al 85%; así, en la mayor parte de los casos, la primera exposición al VHC probablemente había ocurrido años antes de la entrevista, más allá de que para la compleja información de la red social pudo existir algún período mal recordado.

- Nos vimos obligados a confiar en lo informado por nuestros participantes, con respecto al uso de drogas inyectables en los 6 meses previos, a fin de asegurar una recuperación razonable de la información. También trabajamos sobre la base de la presunción de que así se maximizaban nuestras probabilidades de reclutar integrantes de la red de UDI; ya que era probable que las personas con las cuales nuestros entrevistados se hubieran inyectado recientemente podrían encontrarse más cerca que otros que hubieran compartido esta práctica en momentos anteriores. De hecho, estos métodos limitaron el volumen potencial de integrantes de la red, aunque probablemente permanecieron aquellos UDI en los cuales era más probable detectar infecciones relacionadas, debido a una menor cantidad de divergencias entre las secuencias del VHC.

- Las infecciones con genotipos múltiples del VHC no son bien identificadas por el ensayo de sondas alineadas (LiPA),^{9,10} pero pueden constituir una fracción importante de todas las infecciones.⁴ A lo largo del tiempo, el genotipo dominante detectado por LiPA puede variar¹¹ en personas infectadas con más de un genotipo del VHC; por lo que estas personas, que podrían haber sido reconocidas por presentar secuencias relacionadas del VHC, ya no serían identificadas como tales.

Redes II

La consecuencia práctica de haber hallado en Redes I una mala correlación entre nuestros datos sociales y moleculares, además del interesante descubrimiento de UDI expuestos a alto riesgo durante mucho tiempo, pero no infectados, fueron factores determinantes en nuestra decisión de realizar un segundo estudio, basado en los resultados del primero, pero evitando la mayor cantidad posible de errores. La recolección de datos para Redes II se llevó a cabo entre julio de 2005 y agosto de 2006, y en ese período trabajaron 5 investigadores externos que entrevistaron a los participantes y tomaron al menos una muestra de sangre venosa de 319 sujetos (y al menos 2 muestras de 173) que eran UDI actuales. Como se mencionó anteriormente, el reclutamiento se realizó en tres locaciones de la ciudad de Melbourne (capital del estado de Victoria, Australia; población en 2004: 3 592 975 habitantes),¹² cada una de las cuales aloja un escenario de consumo de drogas ilícitas, en las que existen sitios fijos dedicados al programa nacional de agujas y jeringas. Las muestras de sangre para la realización de análisis para VHC, VIH y virus de la hepatitis B fueron obtenidas luego de dar un asesoramiento completo; los resultados se entregaron en privado, también junto con un asesoramiento completo. Se solicitó a los participantes que propusieran o presentaran a los integrantes de su grupo o red (personas con las cuales se hubieran inyectado drogas, en igual ocasión y lugar, con el mismo criterio utilizado para Redes I) para entrevistarlos. La recolección de datos se vio facilitada por el uso de computadoras de mano, sincronizadas con una base de datos central; la mayoría de las entrevistas fueron conducidas, mientras que la extracción de las muestras de sangre se realizó en una camioneta, que también fue utilizada para el transporte de los trabajadores de campo, desde y hacia los sitios de reclutamiento, ampliamente distanciados. Las principales diferencias entre Redes II y Redes I son las siguientes.

Diseño longitudinal en vez de transversal

Redes II es un estudio prospectivo longitudinal, en el cual los UDI serán entrevistados hasta nueve veces durante un período de 2 años, con repetición de las entrevistas aproximadamente cada 3 meses, lo que brinda la posibilidad de observar el espectro completo de la dinámica de la infección

por VHC (infección incidental, remoción del virus, de los anticuerpos o de ambos, desarrollo de cronicidad y sobreinfección). Las entrevistas reiteradas también permiten observar la evolución de las redes, e incrementan nuestra capacidad para detectar nuevas infecciones por VHC; además de rastrear la transmisión, y detectar participantes que adquieren nuevos compañeros de inyección de drogas con ARN positivo para VHC.

Menor énfasis en la densidad de las redes

En Redes II se utilizan tres sitios de reclutamiento ampliamente distanciados entre sí, contra un sitio único en Redes I; además, mientras que en Redes I los trabajadores de campo sólo podían reclutar personas presentadas como integrantes de la red por los entrevistados, en Redes II esa regla fue flexibilizada. El efecto de esos cambios fue una menor densidad y complejidad de las redes, lo que simplificó las relaciones y facilitó el reconocimiento de los patrones de infección; las figuras 1 y 2 muestran cuán diferentes son las estructuras de las redes de relaciones entre usuarios de inyectables, que se produjeron en Redes I y Redes II hasta ahora. La dispersión geográfica de los sitios de reclutamiento tuvo como beneficio adicional la posibilidad de aplicar la epidemiología molecular "clásica", para demostrar cómo las infecciones por VHC son transportadas desde un lugar de la ciudad a otro; así, la investigación de 77 secuencias de la región central del genotipo 1a (derivadas de especímenes de los primeros UDI) nos permitió documentar infecciones por VHC relacionadas genéticamente, en dos pares de UDI que vivían a 40 y 50 km de distancia.¹³

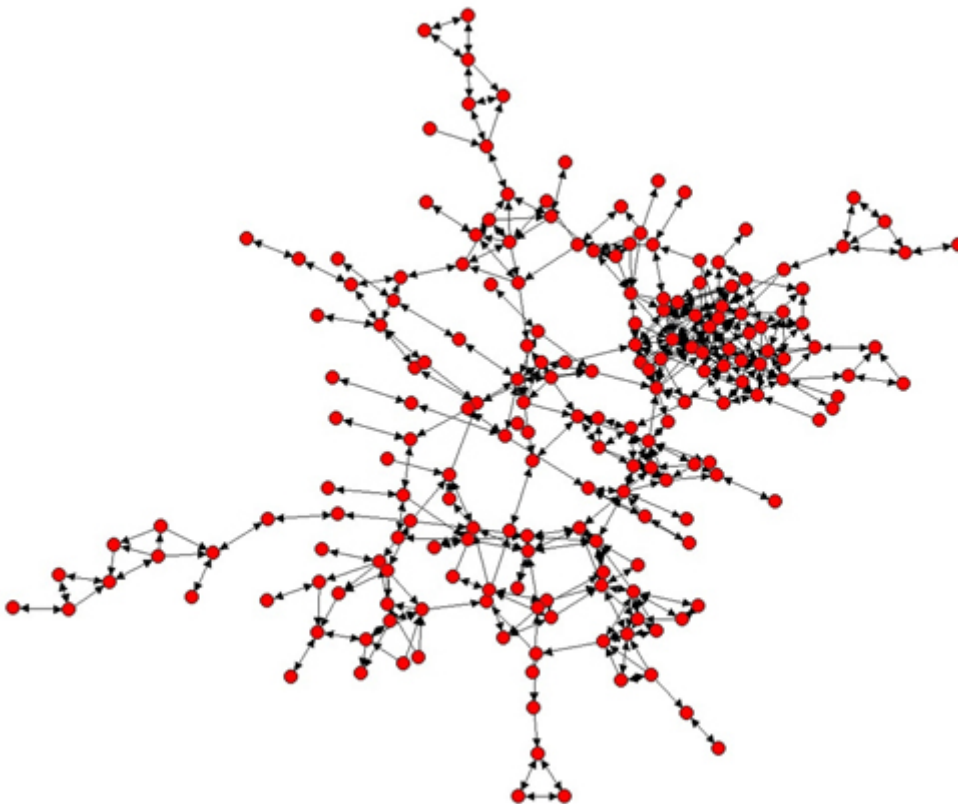


Figura 1. Redes I.

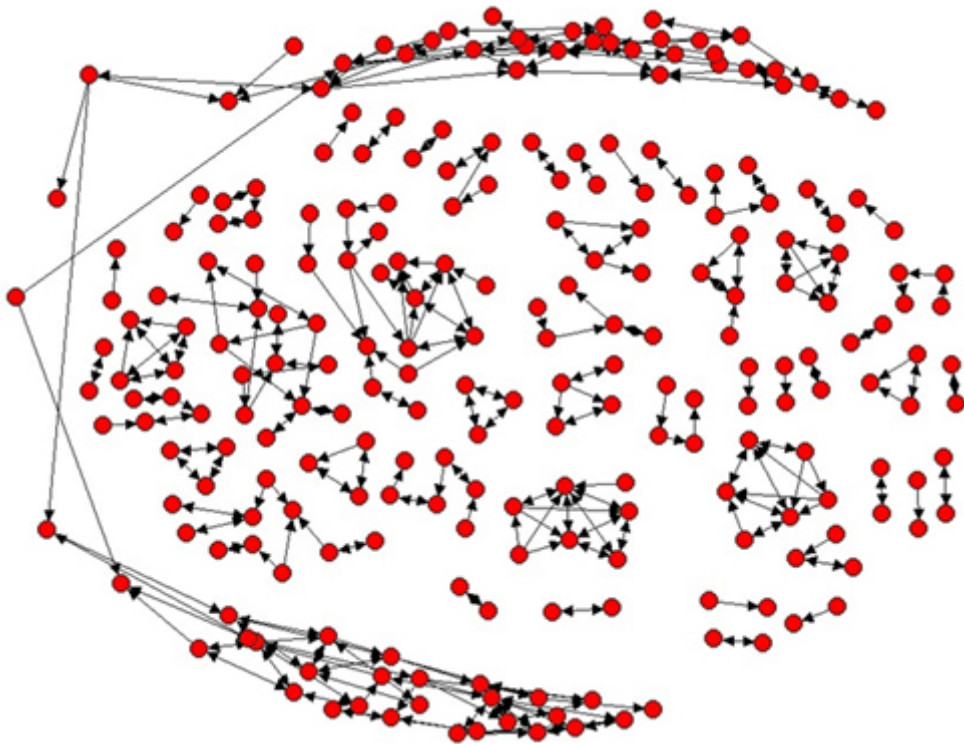


Figura 2. Redes II.

Enfasis en UDI jóvenes o de inicio reciente

En Redes I los UDI fueron reclutados basándose sólo en su identificación como miembros de las redes por otros entrevistados; mientras que en Redes II, las personas menores de 25 años que se habían estado inyectando por menos de tres años fueron reclutados en forma preferencial (denominados participantes primarios, con seguimiento longitudinal). Por su parte, los participantes secundarios no se incluyeron en el seguimiento, salvo que se hubiera probado que no habían estado expuestos al VHC. Se intentó incluir UDI jóvenes o de inicio reciente, a fin de obtener un número suficiente de UDI sin infección por VHC para poder efectuar comparaciones estadísticas con los individuos expuestos (algo que no fue posible en Redes I, ya que se reclutaron sólo 21 UDI no expuestos); además de permitirnos medir en forma más exacta la incidencia, e incluir UDI expuestos al VHC con historias de infección más corta y de menor complejidad, comparadas con las de Redes I. De esta manera, pudimos mejorar nuestra capacidad para detectar infecciones relacionadas por epidemiología molecular; estrategia que parece funcionar bien, ya que logramos identificar 25 casos de infecciones nuevas entre 105 UDI inicialmente negativos para anti-VHC, lo que indica una incidencia de 37.6% anual (95% IC 21.9-64.8). El promedio de uso de drogas inyectables de los individuos seguidos en Redes II fue de 7.8 años (95% IC 7.1-8.4), que resulta significativamente menor que el de Redes I, de 10.2 años (95% IC 9.2-11.3).

Inclusión de la inmunología

Encontramos un subgrupo de participantes de Redes I, que pese a encontrarse en situación de alto riesgo para infección por VHC, no presentaba evidencias de exposición,³ lo que coincide con informes previos de otros autores¹⁴ que plantearon como hipótesis que algunos individuos poseen o pueden adquirir una función inmune que los proteja de la infección por VHC, o bien les permita remover la infección rápidamente, sin producción detectable de anticuerpos. Nosotros comenzamos a colaborar informalmente con los principales inmunólogos australianos hacia el final del estudio Redes I; mientras que la colaboración formal se inició en Redes II. Así, contamos con una gran reserva de muestras de sangre venosa (hasta 50 ml) obtenidas de UDI persistentemente negativos, seroconvertidos y UDI sobreinfectados con ARN positivo persistente; la cual brinda el

material crudo para análisis que permiten el estudio de la inmunidad para VHC innata y adaptativa, y facilitan la creación de posibles vacunas.

Hasta el momento, las respuestas de células T específicas para VHC se identificaron en sujetos seronegativos y ARN negativos, contra determinantes de células T CD8⁺, los cuales también son reconocidos por participantes infectados por VHC, ARN positivos, o ambos. Esto confirma que los UDI persistentemente negativos han estado efectivamente expuestos al VHC, pero muestran una respuesta inmune más poderosa que les permiten frustrar tanto la viremia crónica como la producción de anticuerpos.

Análisis de curvas de fusión de PCR en tiempo real para discriminación del genotipo

En el estudio Redes I realizamos pruebas en una pequeña parte de la cohorte con análisis de movilidad heterodúplex (*heteroduplex mobility assay* [HMA]),⁴ con lo que detectamos que 3.6% de las muestras de UDI con ARN positivo para VHC contenían más de un genotipo viral. Nuestra experiencia subsecuente nos hizo comprender que la cifra real es varias veces mayor y supera probablemente el valor de 7.6% informado por Schroter y col.¹⁵ Mientras que la técnica HMA es útil para detectar genotipos múltiples, no permite discriminar fácilmente entre ellos; por lo tanto, nosotros desarrollamos una prueba que utiliza la curva de fusión en tiempo real, que incrementa significativamente la posibilidad de identificar los genotipos presentes en una infección mixta. Brevemente, la discriminación entre genotipos resulta posible por la implementación de una sonda específica para los productos de PCR de un genotipo, pero es lo suficientemente complementaria como para ligarse a otros; así, en el análisis de las curvas de fusión, la sonda se disocia de los productos de PCR menos específicos a una temperatura característica, menor a la de los específicos, que depende del genotipo.

Investigaciones nuevas luego de Redes I

Podría decirse que la principal razón por la cual los resultados de Redes I mostraron mala correspondencia entre los datos de redes sociales y secuencias del VHC, fue el hecho de que los datos utilizados provenían de UDI con antecedentes de infección por VHC complejos y de larga data. En el diseño de Redes II se buscó enmendar este problema, al enfocarse en usuarios de drogas inyectables más jóvenes o de inicio reciente; estrategia que parece ser exitosa, según se mencionó previamente. Uno de nuestros objetivos al realizar Redes II fue utilizar una combinación de análisis de redes sociales y epidemiología molecular, para comparar directamente la epidemiología social y molecular de pares de UDI que incluían al menos un episodio de infección por VHC. Estas personas, por definición, habrían adquirido la infección en forma reciente de otro UDI que, debido a que el evento de transmisión era reciente, probablemente continuara formando parte de la red social "infectante". Así, podríamos esperar que los vínculos sociales y los datos moleculares muestren una correspondencia mucho mayor que la observada en Redes I, en el cual la cohorte de UDI presentaba infecciones por VHC prevalentes, más que episódicas.

En la realización de un estudio retrospectivo de casos y controles, acerca de UDI con infecciones por VHC incidentales (n = 17) y sin evidencia de exposición (n = 42), Brewer y col.¹⁶ presentaron datos que confirman la lógica del abordaje bosquejado más arriba. En tres de cuatro pares de infecciones encontradas por estos autores, existían relaciones estrechas, y los UDI involucrados habían mencionado cada uno al otro como integrante de la red de usuarios de inyectables; así, aunque el número de casos es pequeño, el concepto mantiene su validez. Resultó llamativo que en el trabajo de Brewer y col.¹⁶ no hayan encontrado correspondencia entre la distancia genética y de red entre sujetos con infecciones nuevas, ya que esto sugiere que la distancia genética entre secuencias del VHC probablemente no sea representativa de la distancia social entre los huéspedes. Nosotros esperamos poder reproducir estos resultados con números superiores de casos nuevos y de controles, antes de la probable finalización de la recolección de datos para Redes II, a mediados de 2007.

Ha surgido mucha información nueva respecto de nuestra comprensión de los aspectos inmunológicos de la infección por VHC y se lograron avances importantes en el trabajo de preparación para la producción de una vacuna. Prince y col.¹⁷ mostraron que en chimpancés recuperados de infecciones previas por genotipo 1a o 1b se produjeron infecciones crónicas luego de una prueba de provocación con genotipos heterólogos, lo que sugiere que se requerirán epitopes de varios genotipos para obtener una vacuna contra el VHC ampliamente efectiva. Encke y col.¹⁸ partieron de un enfoque diferente, en el que vacunaron ratones con células dendríticas con

el *core* del VHC y detectaron importantes respuestas inmunes, tanto de tipo celular como humoral. Los hallazgos de Folgori y col.,¹⁹ quienes indujeron protección de genotipo cruzado para hepatitis aguda en chimpancés mediante una vacuna genética de células T para VHC, son prometedores. Así demostraron que se puede lograr una protección efectiva contra varias cepas del VHC por medio de la estimulación de la inmunidad celular únicamente.

La investigación inmunológica que realizamos en Redes II estuvo concentrada en mejorar nuestros conocimientos acerca de las respuestas efectivas de las células T (determinantes peptídicos específicos, frecuencias de células T, fenotipos funcionales y el repertorio de células T) que conducen a la resistencia al VHC y su remoción; además de identificar determinantes de células T reconocidos por los diferentes genotipos virales. Como ya se mencionó, actualmente existe una evidencia considerable de que las respuestas de inmunidad celular son esenciales en la resolución espontánea de la hepatitis aguda por virus C y para la protección a largo plazo frente a la infección persistente; en consecuencia, las estrategias dirigidas a potenciar las respuestas de células T específicas para VHC pueden cumplir un importante papel en la creación de vacunas. Sin embargo, aunque existen seis genotipos del VHC y numerosos subtipos, la mayor parte de los trabajos publicados se concentraron en el genotipo 1, que corresponde a un 60% de las infecciones en UDI australianos,^{20,21} mientras que unos pocos estudios estuvieron dirigidos al genotipo 3, el siguiente en frecuencia.²⁰ Nosotros estamos trabajando con cohortes protegidas de UDI (negativos para anti-VHC, para PCR y PCR-negativos con anti-VHC positivo), a fin de investigar la correlación entre la inmunidad protectora en la infección por VHC y facilitar el diseño de una subunidad efectiva como vacuna y estrategia inmunoterapéutica. Identificamos nuevos determinantes específicos para VHC en células T CD8⁺, desde el genotipo 3 restringido para un amplio número de alelos de HLA. Combinado con las secuencias del epítipo de linfocitos T citotóxicos (CTL) (publicadas en http://hcv.lanl.gov/content/immuno/tables/ctl_summary.html) del genotipo 1 del VHC, el gran repertorio de péptidos asegura un amplio intervalo de estudio para UDI que muestran alta prevalencia de genotipo 3 y que en muchos casos son portadores de más de un genotipo viral. Nos proponemos efectuar un riguroso análisis longitudinal del repertorio de células T en UDI con resultados clínicos diferentes; principalmente resistencia viral (anti-VHC y PCR negativos), *clearance* o depuración (anti-VHC positivo con ARN negativo), o persistencia (anti-VHC y PCR positivos). Esta comparación revelará la especificidad y frecuencia de las células T CD8⁺ específicas para VHC asociadas con protección y permitirá conocer su composición clonal. Asimismo, los UDI infectados con genotipos del VHC diferentes del 1 (genotipos 2, 3 y 6) serán sometidos a tamizaje en el panel completo de péptidos del VHC a fin de identificar determinantes de células T con reconocimiento cruzado entre genotipos, útiles para la creación de futuras vacunas.

Conclusiones

Por medio de Redes II estamos intentando proseguir con la utilización de métodos de redes sociales y epidemiología molecular para mejorar nuestra comprensión acerca de la epidemiología del VHC, su virología y sus interacciones. Debido a la posibilidad de mapear los patrones de transmisión del virus entre redes y de caracterizar en términos biológicos y de conducta, tanto a la fuente de infección como al huésped, pensamos que este enfoque ofrece una excelente base para las investigaciones sobre la inmunología del VHC que puede resultar útil para facilitar el proceso de creación de una vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken CK, McCaw R, Bowden S, Tracy SL, Kelsall J, Higgs P, Kerger M, Nguyen H, Crofts N. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in a social network of injecting drug users. *Journal of Infectious Diseases* 190(9):1586-1595, 2004.
2. Aitken CK, Bowden S, McCaw R, Jardine D, Hellard M, Higgs P, Nguyen O, Crofts N. Change in hepatitis C virus genotype in injecting drug users. *Journal of Medical Virology* 74 (4):543-545, 2004.
3. Aitken CK, Bowden S, Hellard M, Crofts N. Indications of immune protection from hepatitis C infection. *Journal of Urban Health* 81(1):58-60, 2004.
4. Bowden S, McCaw R, White P, Crofts N, Aitken CK, Detection of multiple hepatitis C virus genotypes in a cohort of injecting drug users. *Journal of Viral Hepatitis* 12:322-324, 2005.
5. Rothenberg R, Baldwin J, Trotter R, Muth SQ, The risk environment for HIV transmission: results from the Atlanta and Flagstaff network studies. *J Urban Health* 78(3):419-432, 2001.
6. National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research. Australian NSP Survey National Data Report 2001-2005. National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, The University of New South Wales, Sydney, NSW, 2006.

7. Maher L, Jalaludin B, Chant KG, Jayasuriya R, Sladden T, Kaldor JM, Sargent PL. Incidence and risk factors for hepatitis C seroconversion in injecting drug users in Australia. *Addiction* 101(10):1499-508, 2006.
8. Judd A, Hickman M, Jones S, McDonald T, Parry JV, Stimson GV, Hall AJ. Incidence of hepatitis C virus and HIV among new injecting drug users in London: prospective cohort study. *British Medical Journal* 330(7481):24-5, 2005.
9. Hu YW, Balaskas E, Furione M, Yen PH, Kessler G, Scalia V, Chui L, Sher G. 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* 38(8):2807-2813, 2000.
10. Giannini C, Giannelli F, Monti M, Careccia G, Marrocchi ME, Laffi G, Gentilini P, Zignego AL. Prevalence of mixed infection by different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 134(1):68-73, 1999.
11. Laskus T, Wang LF, Radkowski M, Nowicki M, Wilkinson J, Rakela J. Exposure of hepatitis C virus-negative recipients to > or = 2 infected blood donors. *Journal of Infectious Diseases* 183(4):666-669, 2001.
12. Australian Bureau of Statistics, National Regional Profile: Melbourne (Statistical Division), 2006. www.abs.gov.au/AUSSTATS/abs@.nsf/Latestproducts/205Population/People12000-2004?opendocument&tabname=Summary&prodno=205&issue=2000-2004&num=&view= (last viewed 2 October 2006).
13. McCaw R, Hellard M, Aitken C, Tray L, Revill P, Bharadwaj M, Bowden S. Virological and epidemiological factors influencing hepatitis C infection in injecting drug users. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses 27-31 August 2006.
14. Mehta SH, Cox A, Hoover DR, et al. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 359(9316):1478-83, 2002.
15. Schroter M, Feucht HH, Zollner B, Schafer P, Laufs R. Multiple infections with different HCV genotypes: prevalence and clinical impact. *J Clin Virol* 27(2):200-4, 2003.
16. Brewer DD, Hagan H, Sullivan DG, Muth SQ, Hough ES, Feuerborn NA, Gretch DR. Social structural and behavioral underpinnings of hyperendemic hepatitis C virus transmission in drug injectors. *Journal of Infectious Diseases* 194(6):764-72, 2006.
17. Prince AM, Brotman B, Lee DH, Pfahler W, Tricoche N, Andrus L, Shata MT. Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model. *Journal of Infectious Diseases* 192(10):1701-9, 2005.
18. Encke J, Findelee J, Geib J, Pfaff E, Stremmel W. Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 142(2):362-9, 2005.
19. Folgari A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R, Nicosia A. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Naure Medicine* 12(2):190-7, 2006.
20. Freeman AJ, Zekry A, Whybin LR, Harvey CE, van Beek IA, de Kantzow SL, Rawlinson WD, Boughton CR, Robertson PW, Marinou G, Lloyd AR. Hepatitis C prevalence among Australian injecting drug users in the 1970s and profiles of virus genotypes in the 1970s and 1990s. *Med J Aust* 172(12):588-91, 2000.
21. McCaw R, Moaven L, Locarnini SA, Bowden DS. Hepatitis C virus genotypes in Australia. *J Viral Hepat* 4(5):351-7, 1997.