

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL, GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC), EN PACIENTES DEL HOSPITAL CIVIL
DE GUADALAJARA "FRAY ANTONIO ALCALDE".

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA ELENA TRUJILLO TRUJILLO.

Las Agujas, Zapopan, Jal., Septiembre, 2012



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-068/2012

**C. MARÍA ELENA TRUJILLO TRUJILLO
PRESENTE**

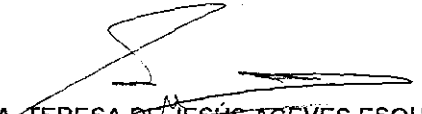
Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **Tesis**, con el título **"DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL, GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC), EN PACIENTES DEL HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA "FRAY ANTONIO ALCALDE"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al **Dr. Arturo Panduro Cerda** y asesora a la **Dra. Montserrat Maldonado González**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 20 de abril, del 2012.



**DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



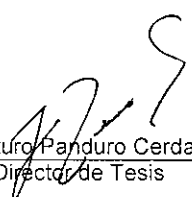
**M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**


Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

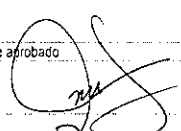

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: "**DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL, GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC), EN PACIENTES DEL HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA "FRAY ANTONIO ALCALDE"**" que realizó la pasante **MARÍA ELENA TRUJILLO TRUJILLO** con número de código **304041186** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

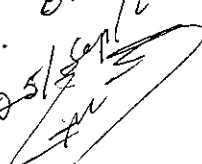
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
Las Agujas, Zapopan, Jal., Septiembre, 2012.


Dr. Arturo Panduro Cerda.
Director de Tesis


Dra. Montserrat Maldonado González.
Asesor de Tesis

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
M. C. Rosa María Domínguez Arias		14/sep/2012
M. C. Verónica Palomera Avalos	Veronica Palomera Avalos	14/Sep/2012
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		14/sep/2012
Dra. Anne Marguerite Helene Santerre	Antheure.	14/09/2012.

V. B. -
25/sep/2012


LUGAR DE TRABAJO

La elaboración del proyecto se realizó en el Servicio de Biología Molecular en Medicina, del hospital civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" bajo la dirección del Dr. Arturo Panduro Cerda, este servicio cuenta con la infraestructura y los equipos para realizar estudios moleculares adecuados para hacerlo posible. Además éste servicio cuenta con los recursos económicos y con expertos en el tema, el equipo de trabajo está formado por investigadores de gran experiencia y disponibilidad para apoyar la investigación que se realizó.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres Donato y María Félix, por su apoyo incondicional, por la confianza que me han otorgado, por la educación y valores transmitidos, los cuales me han permitido sobrellevar las adversidades y alcanzar las metas planteadas.

Los esfuerzos realizados durante el camino recorrido han sido apoyados en su amor y sabio consejo, conforme transcurre el tiempo me doy cuenta que soy muy afortunada por tenerlos como padres, agradezco a Dios el otorgarme ese privilegio, solo espero ser digna hija y responder acorde a lo recibido.

También dedico este trabajo a Jesse Job, por llenar la otra parte de mi corazón y de mi vida. Por caminar conmigo de la mano acompañarme a lo largo del viaje de la vida, la cual presenta gran variedad de matices que nos permiten tomarle sabor, así como descubrir quiénes somos y lo que podemos lograr.

Tu presencia a mi lado ha sido muy importante para mí, nuevos retos se presentaron cuando llegaste a mi vida y mi determinación a superarlos se inspira en ti, la fuerza y el coraje para no dejarme caer se acrecientan, la promesa del futuro y lo que traerá me fortalecen para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida por los triunfos y fracasos que me han permitido ser quien soy. Agradezco a mis padres y hermanos por su apoyo y amor incondicional. Agradezco a mi compañero de viaje por acompañarme en ésta aventura.

Y agradezco de una manera muy particular al Dr. Arturo Panduro por dejar atrás los sinsabores de experiencias pasadas y darme la oportunidad de ser parte de su valioso equipo de trabajo, espero haberme acercado a lo que esperaba obtener de mi estancia académica.

Su disponibilidad y desempeño laboral son inspiradores pero sus palabras nos transmiten conocimiento y pasión por la investigación, nos retan a superarnos a nosotros mismos, seguir adelante y lograr lo impensable.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Montserrat y a la Dra. Sonia, siempre dispuestas a compartir sus conocimientos y experiencias, gracias por el cálido recibimiento que hace sentir en casa.

Doy gracias a mis compañeros de trabajo; Rafael, Omar y Eloy, que a lo largo de este breve periodo se han convertido en grandes amigos, su apoyo no solo ha sido en el plano laboral sino de forma personal compartiendo éxitos y dificultades.

Ciertamente una persona requiere familia que te proporciona seguridad, mentores que te guíen con sabiduría, pero los amigos además de poder elegirlos uno mismo dan sabor a la existencia.

Agradezco a todos y cada uno de ustedes por sus múltiples aportaciones, por ser parte de este trabajo, por ayudarme a crecer en todos los aspectos y por proporcionarme la fuerza para seguir adelante. He aprendido que la medida del éxito que se llegue a obtener uno mismo se la otorga, pero sobre todo he aprendido que cada persona que se cruza en el camino aporta los elementos necesarios para hacerlo posible.

Gracias a todos por ser parte de mi vida y del presente trabajo.

ÍNDICE

	Página
Lista de figuras.....	1.
Lista de tablas.....	2.
Abreviaturas.....	3.
Resumen.....	5.
1. Antecedentes.....	9.
1.1. Historia natural de la enfermedad por VHC.....	9.
1.2. Pronóstico, tratamiento y prevención contra el VHC.....	11.
1.3. Respuesta inmune al VHC.....	12.
1.4. Evaluación de daño hepático ocasionado por el VHC.....	14.
1.5. Descripción histórica de VHC.....	16.
1.6. Taxonomía de VHC.....	16.
1.7. Origen y evolución de VHC.....	17.
1.8. Estructura genómica de VHC.....	21.
1.9. Clasificación de genotipos y subgenotipos de VHC.....	24.
1.10. Distribución geográfica de VHC.....	25.
1.11. Prevalencia de la enfermedad por VHC.....	30.
1.12. Factores de riesgo de VHC.....	32.
1.13. Diagnóstico serológico y molecular de VHC.....	33.
2. Planteamiento del problema.....	35.
3. Justificación.....	36.
4. Hipótesis.....	38.
5. Objetivos.....	39.
5.1. Objetivo general.....	39.
5.2. Objetivos particulares.....	39.
6. Flujograma de actividades.....	40.
7. Diseño metodológico.....	41.
7.1. Tipo de estudio.....	42.
7.2. Determinación de carga viral ARN-VHC.....	42.
7.3. Purificación de ARN viral.....	46.
7.4. Amplificación de ARN-VHC.....	48.
7.5. Determinación de genotipos y subgenotipos de VHC.....	49.
8. Análisis estadístico.....	55.
9. Resultados.....	56.

9.1. Características clínicas y sociodemográficas de pacientes de VHC.--	56.
9.2. Rangos de cargas virales en UI/mL y Logaritmo.-----	58.
9.3. Determinación de genotipos de VHC en el Occidente de México.----	59.
9.4. Análisis comparativo de los estudios de prevalencia de VHC en el Occidente de México.-----	60.
9.5. Correlación de carga viral y genotipos de VHC.-----	62.
9.6. Factores de riesgo y tiempo de exposición en pacientes con carga viral positiva y carga viral indetectable.-----	64.
9.7. Factores de riesgo y tiempo de exposición al VHC por genotipo.----	66.
9.8. Correlación de genotipos de VHC con IMC, consumo de alcohol, drogas y tiempo de exposición.-----	67.
9.9. Correlación de carga viral positiva y carga viral indetectable de VHC y daño hepático.-----	69.
9.10. Análisis de daño hepático y tiempo de exposición al VHC por genotipo.-----	71.
10. Discusión.-----	73.
11. Conclusión.-----	80.
12. Referencias.-----	82.
Anexo.-----	92.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árbol filogenético de VHC de humanos, chimpancés y primates-----	20.
Figura 2. Estructura Genómica de VHC-----	22.
Figura 3. Árbol filogenético de genotipos de VHC-----	25.
Figura 4. Distribución geográfica de genotipos de VHC-----	27.
Figura 5. Prevalencia de genotipos de VHC en Latinoamérica.-----	28.
Figura 6. Distribución geográfica de genotipos de VHC en México-----	29.
Figura 7. Genotipos y subgenotipos de VHC-----	54.
Figura 8. Rango de carga viral expresado en UI/mL y Logaritmo-----	58.
Figura 9. Determinación de genotipos de VHC en el Occidente de México-----	59.
Figura 10. Estudios realizados de prevalencia de genotipos de VHC en el Occidente de México-----	61.
Figura 11. Asociación de carga viral de VHC por genotipo-----	62.
Figura 12. Análisis estadístico de carga viral de VHC por genotipo-----	63.
Figura 13. Correlación de daño hepático y carga viral-----	70.

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características clínicas y sociodemográficas de pacientes infectados con VHC-----	57.
Tabla 2. Factores de riesgo y tiempo de exposición en pacientes con VHC por carga viral-----	65.
Tabla 3. Factores de riesgo y tiempo de exposición en pacientes con VHC por genotipo-----	66.
Tabla 4. Correlación de genotipos con IMC, consumo de drogas y tiempo de exposición-----	68.
Tabla 5. Daño hepático y tiempo d exposición al VHC por genotipo-----	72.

ABREVIATURAS

ADN.	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc.	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ARN.	Ácido ribonucleico.
AST.	Aspartato aminotransferasa.
ALT.	Aspartato-alaninotransferasa.
CD4+.	Clúster de diferenciación 4.
CD8+.	Clúster de diferenciación 8.
CHC.	Carcinoma hepatocelular.
Col HDL.	Lipoproteína de alta densidad.
Col LDL.	Lipoproteína de baja densidad.
Col T.	Colesterol total.
Col VLDL.	Lipoproteína de muy baja densidad.
dUTP.	Deoxi-uridina trifosfato.
EIA.	Inmunoensayo enzimático.
FibroScan™.	Equipo de elastografía de transición.
GGT.	Gamaglutamil transpeptidasa.
HVR1.	Región hipervariable.
IMC.	Índice de masa corporal.
INBODY.	Estudio de bioimpedancia.
LIPA.	Principio de hibridación reversa.
Log.	Logaritmo.
mL.	Mililitro.
m.	Minutos.
mm.	Milímetros.

nm.	Nanómetros.
NOM.	Norma oficial mexicana.
PCR-TR.	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa.
Qs.	Patrón de determinación cuantitativa.
RIBA.	Ensayo inmunoblot recombinante.
s.	Segundos.
SIUVE.	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.
TA.	Temperatura ambiente.
TG.	Triglicéridos.
UTR.	Región no codificante.
UNG.	Uracil-N-glicosilasa.
UI/mL.	Unidades Internacionales sobre mililitro.
µL.	Microlitros.
VHA.	Virus de la hepatitis A.
VHB.	Virus de la hepatitis B.
VHC.	Virus de la hepatitis C.

RESUMEN

ANTECEDENTES: Mediante Biología Molecular se determinó que el Virus de la Hepatitis C, deriva de la familia *Flaviviridae*, conocido como *Hepacivirus*. Su genoma está formado por una cadena simple de Ácido Ribonucleico de sentido positivo, con 9,500-10,000 nucleótidos. Su estructura genómica está formada por tres genes estructurales y seis genes no estructurales. La clasificación del genotipo del VHC está dada por su variabilidad genética la cual corresponde a 6 genotipos (1-6) con una similitud de 66-69%, y los subgenotipos que van de la "a" hasta la "k" con una homología del 78-88%. Los principales factores de riesgo para la transmisión del VHC son las transfusiones y cirugías. La cara viral es la base molecular utilizada para indicar tratamiento antiviral. Los genotipos están relacionados con la respuesta del paciente al tratamiento con antivirales, los genotipos 2 y 3 responden mejor al tratamiento, los que tienen genotipos 1a y 1b la respuesta al tratamiento es menor. En México estos últimos genotipos son predominantes. El VHC afecta principalmente a los adultos de ambos géneros, se estima que alrededor de 170-200 millones de personas en el mundo padecen la enfermedad, mientras que en México se registran de 400,000 hasta 1, 400,000 personas infectadas con el VHC con una prevalencia de 0.7 a 1.5%. En base a los antecedentes mencionados en el presente estudio nos proponemos determinar la carga viral e identificar los genotipos y subgenotipos del VHC y su relación con daño hepático en pacientes que acudan al Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" en el periodo 2010-2011; para determinar la situación actual del VHC en la población del Occidente de México.

METODOLOGÍA: Se aplicó una historia clínica, toma de sangre periférica y exámenes de laboratorio para la evaluación del daño hepático, en suero se determinó la carga viral, los genotipos y subgenotipos del VHC mediante la técnica de PCR-TR e INNOLIPA y se determinó el daño hepático mediante la elastografía de transición (FibroScan).

RESULTADOS: Se analizaron 188 (100%) muestras de pacientes positivos a la serología para VHC, de los cuales 120 (64%) fueron positivos a carga viral y 68 (36%) presentaron carga viral indetectable; predominando las mujeres infectadas con relación 2/1 respecto a los hombres. Las enzimas hepáticas se presentan elevadas en pacientes con carga viral positiva ($P < 0.05$), mientras que el colesterol y triglicéridos los presentan elevados los pacientes con carga viral indetectable ($P < 0.05$). Se determinaron 104 genotipos y subgenotipos del VHC, siendo el 1a el que prevalece con 43.6% (45/104) seguido del 1b y 2 (16/104) con 15.38% y el genotipo 3 con 12.5% (14/104). La frecuencia del genotipo 2b disminuyó, mientras que el genotipo 2 y 3 aumentó con respecto a reportes anteriores. El 88% de los pacientes positivos a la actividad viral de VHC manejan cargas virales por arriba de las 100,000 UI/mL. La carga viral más elevada la presentó el genotipo 2 con respecto del genotipo 3 ($p < 0.05$), al igual que el genotipo 1 con relación al genotipo 3; ($p < 0.05$). Los factores de riesgo predominantes son las cirugías y transfusiones sin embargo están incrementándose los tatuajes, piercing, consumo de drogas entre otros factores asociados a la transmisión del VHC. No hay diferencias por genotipo con relación

a los factores de riesgo y el tiempo de exposición al VHC.

El daño hepático se observó en pacientes con carga viral positiva de los cuales el 45% cursan con cirrosis y el 59% de pacientes con carga viral indetectable cursan por etapas iniciales de fibrosis. Los genotipos 1 y 3 están ocasionando el mismo grado de daño hepático a los pacientes infectados. No se encontraron diferencias por genotipo en cuanto al IMC; los pacientes con genotipo 1 consumen en menor cantidad drogas y alcohol pero llevan más tiempo de exposición, por el contrario los pacientes con genotipo 3 consumen una mayor cantidad de alcohol y drogas pero con menor tiempo de exposición.

CONCLUSIONES: El número de pacientes infectados con VHC ARN positivos es superior con respecto a los estudios realizados en esta misma población del Occidente de México y un porcentaje considerable presentan carga viral indetectable. El genotipo predominante es el 1a, sin embargo el VHC está pasando por una etapa de transición epidemiológica donde el genotipo 2b disminuye y los genotipos 2 y 3 van en aumento. El genotipo que presenta las cargas virales superiores es el genotipo 2, seguido del genotipo 1, y el genotipo 3 con cargas virales menores. Se están incrementando los factores de riesgo para la transmisión de VHC, encontrando un aumento en el consumo de alcohol y drogas además de tatuajes, piercing, procedimientos dentales, acupuntura y la promiscuidad sexual. El daño hepático ocasionado por el VHC se hace presente en pacientes positivos a la carga viral sin encontrar diferencia del daño hepático

que ocasiona entre el genotipo 1 y el genotipo 3; pero también se encontró daño hepático en aquellos pacientes con carga viral indetectable, por lo tanto ambos grupos de pacientes deben ser tratados. El genotipo viral está asociado con la persistencia del virus y su progresión a daño hepático independientemente de los rangos de las cargas virales.

Aprobación de Resumen: _____



Dr. Arturo Panduro Cerda

Director de Tesis.

1. ANTECEDENTES

1.1. Historia natural de la enfermedad por el VHC

La hepatitis es toda aquella enfermedad que causa inflamación del hígado, este término proviene del griego Hepar que significa hígado, y fue utilizado por primera vez en 1710 por Biachi.¹ Otro personaje que hace referencia a la enfermedad es Hipócrates el cual además de contribuir con el juramento de ética medico, describió por vez primera una forma de epidemia de ictericia que fue llamada posteriormente hepatitis.²

Las formas más comunes de hepatitis que afectan a los humanos son causadas por el virus de la hepatitis A (VHA, de ARN sencillo), por el virus B (VHB, de ADN doble), y el virus C (VHC, de ARN sencillo). Tienen en común su gran afinidad por el tejido hepático, esto es, son hepatótrofos y en algunos de los casos el VHB y VHC conducen a cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC).¹

El desarrollo de la hepatitis C aún se desconoce con exactitud, ya que la enfermedad en cada uno de los pacientes presenta factores muy particulares e independientes, podría deberse a la diversidad genética, las características del virus y su tendencia a mutaciones rápidas que previenen su detección por el sistema inmune. La infección pasa desapercibida, hasta que exámenes relacionados con donación de sangre o por cualquier otra indicación descubren niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT), lo que conduce a la determinación del VHC; sin embargo se puede decir que se trata de un virus citopático; el daño que causa indica que también es mediado inmunológicamente.

Cuando el virus invade el organismo reside en la célula hepática, posteriormente el cuerpo produce anticuerpos para destruirlo, sin embargo, la mayoría de las veces no lo hacen con eficiencia y la infección progresa.³

Después del primer contacto con el virus el periodo de incubación oscila entre 2 y 26 semanas. A la fase inicial de la enfermedad se le denomina infección aguda y generalmente desaparece después de 2-12 semanas. En 80% de las personas se detectan anticuerpos 15 semanas después de la exposición al virus; en 90% se detectan en 5 meses y en el 97% de personas infectadas en 6 meses^{1, 4}

Durante la fase aguda de la infección, la enzima ALT puede estar elevada (>400 IU/mL). Los niveles de esta enzima cambian durante el curso de la enfermedad. Aunque estos niveles se mantengan estables no indican la eliminación del virus; ya que pueden volver a elevarse. Sólo el 5% de los individuos presentan ictericia y solo el 1% tiene riesgo de sufrir insuficiencia hepática fulminante.

Del 15% al 25% de las personas eliminan el virus espontáneamente. Sin embargo, del 75% al 85% de los infectados progresa a la fase crónica que se describe como la persistencia del virus en un plazo de 6 meses sin presentar síntoma alguno, con elevaciones de ALT persistentes lo que indica viremia activa.

Se desconocen los factores clínicos o epidemiológicos que determinan qué pacientes progresan a la fase crónica. La mayoría de estos pacientes lo hace lentamente y sin síntomas durante 20 ó 30 años.⁵

Las complicaciones de la etapa crónica son la inflamación y la fibrosis; de 10 a 20% de personas con hepatitis C crónica desarrollan cirrosis y en 1 a 5%, carcinoma hepatocelular (CHC).^{3, 6}

1.2. Pronóstico, tratamiento y prevención contra el VHC

Existen evidencias clínicas que en ciertos casos la infección por VHC es posible resolverla de manera espontánea cuando la dosis del inoculo es baja, debido a una respuesta inmune efectiva principalmente de las células T. Se considera que del 10 al 50% resuelven la enfermedad tanto bioquímicamente como a nivel virológico. Los factores que pueden estar involucrados en la resolución viral son, la vía de infección, la cantidad del inoculo, el genotipo y la coinfección con algún otro virus y el abuso del consumo de alcohol. Aunque la negatividad repetida de la carga viral y de la prueba PCR-VHC-ARN en suero no significa que el virus no se encuentre en el hígado.

El tratamiento con mejores resultados de forma independiente es el interferon alfa, indicado para los pacientes con pruebas serológicas positivas de anticuerpos contra el VHC vinculada con ALT elevadas de manera persistente. La dosis es por vía subcutánea tres veces por semana por un mínimo de tres meses, el 50% de los pacientes responden a este tratamiento, sin embargo al suspenderlo 30% presentan recaída, y solo en el 20% de los pacientes se observa respuesta viral sostenida. Los factores que ocasionan la ineficiencia del interferon son, la enfermedad de larga evolución, la carga viral elevada, la lesión histológica grave, el genotipo 1b y los niveles bajos de ALT. La terapia combinada de ribavirina más interferon alfa da mejores resultados, de igual manera el tratamiento de 24

semanas es considerado para los genotipos 2 y 3, mientras que el genotipo 1 requiere terapia de 48 semanas. Este tratamiento contra el VHC es seguro y efectivo en pacientes pediátricos y adolescentes.⁷

Las recomendaciones para la prevención y control del virus de la hepatitis C son las siguientes: a) evitar la transmisión por sangre y hemoderivados a través de la detección de infectados y penalización del comercio de sangre, b) prevenir la transmisión en consumidores de drogas intravenosas, c) omitir la transmisión sexual o promover las prácticas de "sexo seguro", d) identificar a infectados de VHC y asesorarlos y e) prescribir tratamiento con antivirales e interferon en los enfermos.⁸

1.3. Respuesta inmune al VHC

La replicación del VHC se realiza en las células extraparenquimatosas del hígado que son: células endoteliales, células de Kupffer, células estelares y las células monoclonales de sangre periférica; además se han detectado antígenos del core, E1 y E2 en el citoplasma de los hepatocitos lo que indica que es el lugar de replicación activa del virus. Se ha correlacionado el desarrollo de fibrosis y cirrosis a corto plazo con el incremento de células estelares y fibroblastos. El VHC puede contribuir a modular la función inmune, la fibrosis y la esteatosis en hígado.⁹

El curso de la infección por VHC depende del equilibrio entre la rapidez de la replicación del virus y la eficaz especificidad de la respuesta inmune del huésped.

El virus de la hepatitis C utiliza las mutaciones en sitios antigénicos específicos para evadir el reconocimiento inmunológico del huésped, esto ocurre cuando el

virus se encuentra bajo presión selectiva al actuar los linfocitos B ó T; este mecanismo le permite establecer la persistencia de la infección de VHC.

La respuesta inmune está relacionada con la persistencia o resolución de la infección de VHC; se ha descrito que un número menor de cuasiespecies del virus está relacionado con hepatitis agudas resueltas. Además de una variación antigénica asociada a las partículas virales las beta-lipoproteínas y la infección de células del sistema inmune como los linfocitos B y las células dendríticas, tomando en cuenta que ésta célula es presentadora de antígenos por excelencia e indispensable en la inducción y regulación de la respuesta inmune específica, cuando es modificada por el VHC podría favorecer la persistencia del virus en el huésped.

Una eficiente respuesta de las células T CD4+ se ha relacionado con aquellos pacientes que resuelven la enfermedad, juntamente con las células T CD8+ las cuales participan limitando la replicación viral. Aunque no siempre es determinante para la resolución de la infección. Se ha correlacionado la carga viral presente en el hígado de manera inversa con la respuesta inmunológica; si la respuesta de las células T (CD4+ y CD8+) es inadecuada o insuficiente el ARN-VHC persiste. Por lo tanto estas células son el balance entre la eliminación del virus y el daño hepatocelular.^{10, 11}

1.4. Evaluación del daño hepático ocasionado por el VHC

Una característica de casi todas las enfermedades crónicas del hígado es la fibrosis; la cual es la causa más común originada por las hepatitis virales y la esteatohepatitis por consumo de alcohol y/o la obesidad. La fibrosis se define como el resultado del balance entre la producción y la degradación de las células de la matriz extracelular, lo cual conduce a un cambio del tejido de estas células. La fibrosis es causada por una acumulación excesiva de la matriz extracelular, por una reorganización histológica y molecular de diversos componentes como el colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos, proteínas de la matriz y sus factores de crecimiento. Estos cambios pueden llevar a un deterioro del metabolismo y la síntesis de los hepatocitos, células epiteliales y células estelares hepáticas. La activación de las células estelares es el paso principal que conduce a la fibrosis la cual implica varios cambios en el hígado como la fibrogénesis, la proliferación, la contractilidad, la quimiotaxis, la degradación de la matriz y la liberación de citoquinas. La fibrosis es potencialmente un proceso reversible en las primeras etapas.

La fibrosis progresiva conduce al desarrollo de la cirrosis; aproximadamente del 10-20% de los pacientes con infección crónica por el virus de la hepatitis C tienen cirrosis y hasta un 20-30% de los pacientes que no la tienen finalmente la desarrollarán; las complicaciones que presentan en un periodo de una o más décadas son la insuficiencia hepática, ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía y carcinoma hepatocelular.^{12, 13}

La biopsia hepática es considerada actualmente la principal vía para evaluar la fibrosis. Sin embargo, es un procedimiento invasivo y doloroso, además que la precisión para evaluar la fibrosis es cuestionable debido a errores de muestreo y de interpretación.¹⁴ Por tanto hay necesidad de desarrollar y validar pruebas no invasivas las cuales pueden reflejar con precisión la fibrosis hepática, la cirrosis y su gravedad en las enfermedades hepáticas.

Las técnicas de imagen son capaces de detectar cambios en el hígado y diferenciar entre los diferentes grados de fibrosis. Una técnica de imagen nueva y rápida no invasiva que mide la elasticidad del hígado es la Elastografía de transición (FibroScan), elaborada en París Francia. Este sistema está equipado con una sonda de traductor de sonidos montada en el eje de un vibrador, éste genera una vibración que no ocasiona dolor alguno, posee una frecuencia de 50 Hertz y una amplitud de 2 milímetros generando una onda elástica a través de la piel y tejido subcutáneo en el hígado; donde la velocidad de la onda está directamente relacionada con la rigidez del tejido. Cuanto más blando es el tejido más rápido se propaga la onda y viceversa.

La fibrosis se clasifica en una escala de 0-4: F0, sin fibrosis, F1, fibrosis inicial, F2, fibrosis moderada, F3, fibrosis avanzada y F4 es cirrosis. Informes recientes han mostrado que la medición de la rigidez del hígado mediante el FibroScan ha permitido detectar la fibrosis en pacientes infectados con hepatitis crónica por virus C.¹⁵

1.5. Descripción Histórica

En 1974, Prince y colaboradores; reportaron que 25% de pacientes transfundidos desarrollaban una hepatitis post-transfusional y el 18% de estos fueron negativos a los marcadores serológicos virales para hepatitis A (VHA) y hepatitis B (VHB), con características clínicas diferentes.¹⁶

Sin embargo no fue hasta 15 años después (1989) cuando la corporación Chiron en California, logró aislar el agente causal al utilizar métodos de biología molecular e inmunológicos. Primero se aisló del plasma de chimpancés infectados, con un agente etiológico no caracterizado, en seguida se clonó un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), y se obtuvo de la región NS4 del genoma viral; se realizó una búsqueda en la biblioteca de ácido desoxirribonucleico (ADN) y se localizó un gen que codifica para un antígeno asociado específicamente a la hepatitis no A y no B. Este nuevo agente fue designado como el virus de la hepatitis C y se incluyó entre las enfermedades infecciosas emergentes.¹⁷

1.6. Taxonomía del VHC

Conforme al Comité Internacional para la clasificación de los virus, el VHC pertenece a la familia: *Flaviviridae* cuyos miembros se propagan mediante vectores artrópodos, principalmente garrapatas y mosquitos. En esta familia se agrupan tres géneros:

- *Flavivirus*: que alberga 67 especies de virus que afectan humanos y animales, entre los cuales se encuentra el virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental y el virus del dengue.
- *Pestivirus*: que incluye a las especies del virus de la diarrea bovina y del virus de la peste porcina.
- *Hepacivirus*: en donde la especie virus de la hepatitis C (VHC), constituye su único miembro.¹⁸

1.7. Origen y evolución de VHC

La investigación del origen de los virus es especulativa y limitada por su efímera existencia y la falta de estudios históricos y epidemiológicos a profundidad. Además de que los archivos de muestras clínicas para el aislamiento adecuado de los virus o por PCR, son raros y restringidos a 30 años atrás. La obtención de evidencias directas de los virus que existen en el pasado es difícil ya que no existe registro fósil comparado con plantas y animales, por lo que pasan como invisibles en el registro histórico y geológico.

Probablemente las primeras evidencias arqueológicas sólidas de infección por virus fueron encontradas en esqueletos del periodo Neolítico y le era de Bronce, los cuales están deformados como aquellos que padecieron la poliomielitis en la actualidad, sin embargo no es posible demostrar que la poliomielitis sea realmente la causa que originó las deformaciones físicas. El mejor ejemplo de la existencia de los virus en las civilizaciones humanas es la viruela; se cree que fue originada

después del desarrollo de la agricultura en el Medio Oriente alrededor de 10,000 años atrás. Las lesiones en la piel ocasionadas por la viruela fueron observadas en restos momificados de las dinastías egipcias 18 y 20 (1570-1085 a. C), incluyendo a Ramses V quien murió en 1157 a. C. Otra descripción de la viruela fue encontrada en escritos del griego clásico, tales como los de Atenas en el 430 a. c. La reconstrucción de la historia de los virus para el análisis de su distribución y relación genética es un problema por sus hospederos, los cuales pueden imposibilitar la reconstrucción de los virus que frecuentemente cruzan las barreras de especies a infectar. Los virus se recombinan unos con otros y con las células del huésped infectado, pueden reordenar su genoma y cambiar la estrategia de replicación. La tasa de cambios en la secuencia del virus particularmente de genoma formado por ARN es mucho mayor que la del huésped, esto ocasiona un problema para la reconstrucción evolutiva del virus.

Cada ciclo de infección en una célula toma de 1-3 días, en este periodo el genoma viral desarrolla varias copias, probablemente millones. Durante el periodo evolutivo, relativamente corto, el rápido ritmo de cambio de secuencias borra toda relación genética existente entre antecesores y descendientes. Los virus están sujetos a intensos procesos de selección, lo cual les permite desarrollar mecanismos para evadir la respuesta del sistema inmune, el tratamiento antiviral y la adaptación para infectar a nuevos y diferentes hospederos. Los cambios rápidos de adaptación de los virus se ven favorecidos por el periodo de vida de los organismos infectados permitiendo al virus replicarse varias veces dando origen a las mutaciones.

En 1995 se descubre el virus HGV/GBV-C, descrito como virus de la hepatitis G no se registran evidencias de que cause enfermedad hepática en sus hospederos naturales, los humanos, en el periodo inicial de la infección ni en portadores crónicos. De igual forma este virus es clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* de género *Hepacivirus* al igual que el VHC debido a la similitud de las secuencias enzimáticas de los genes NS3 y NS5b. Aunque no se han encontrado homólogos de las proteínas de envoltura del gen E1 de VHC.

La infección por HGV/GBV-C se describe en población humana con una frecuencia de infección activa y pasiva de 5 a 15%. Esta distribución se encuentra en poblaciones aisladas como las tribus indígenas de Papúa Nueva Guinea, en África al sur del Sahara y el Centro y Sur de América. Variantes de este virus muestran variabilidad limitada entre secuencias de nucleótidos con un máximo de 13%. Basados en estas secuencias se clasificó en cuatro o cinco genotipos distribuidos alrededor del mundo en población indígena; además este virus ya había estado presente en población humana moderna, en los migrantes de África, 100,000 a 150,000 años atrás.

El genotipo 3 se describe en habitantes nativos del Norte y Sur de América, por el contrario en población caucásica, de la India incluso el Norte de África son infectados por el genotipo 2. El genotipo 1 se encuentra distribuido en África y posee la mayor diversidad de secuencias en su genoma. Los variantes más divergentes del virus HGV/GBV-C que aquellos encontrados en humanos también fueron encontrados en chimpancés capturados en el Centro y Oeste de África,

además variantes diferentes del virus fueron encontrados en dos diferentes subespecies de chimpancés, *trogloditas* y *verus* (Figura 1).

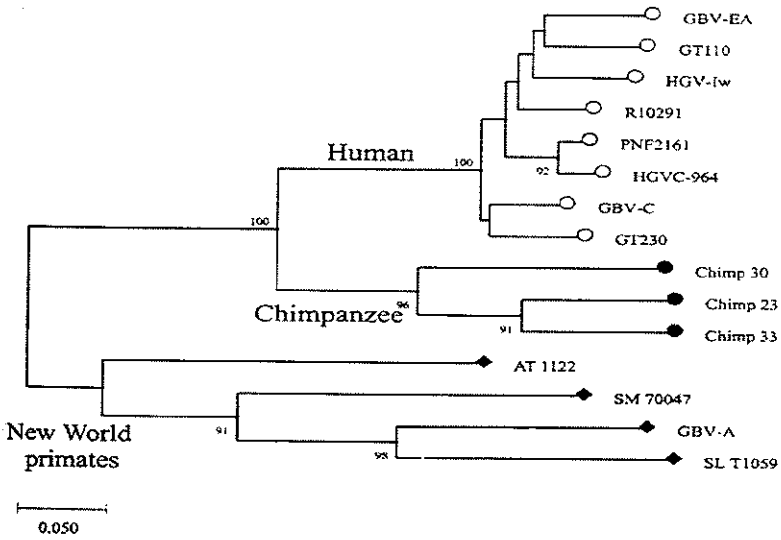


Figura 1. Árbol filogenético de virus de humanos, chimpancés y primates del nuevo mundo. Tomada de Simmonds 2001.

Al comparar las secuencias del virus colectadas durante ocho años de un individuo infectado, indican un rango de 3.9×10^{-4} sustituciones de nucleótidos por sitio por año dentro del genoma, esto es comparable con los virus de ARN como el VHC con 4×10^{-4} sustituciones en la región NS5. Basados en el reloj molecular y extrapolando el rango de cambios en las secuencias en un intervalo de ocho años, la divergencia del virus HGV/GBV-C parece haberse originado de un antepasado común, tan reciente como hace 300 años, mientras que los

chimpancés y primates infectados del Nuevo Mundo se han ido distanciando de los genotipos humanos desde los 600 a 1000 años atrás. Un ejemplo más concluyente se puede obtener de secuencias del virus GB de primates del viejo mundo el cual ocupa una posición filogenética intermedia con un ancestro común entre humanos y chimpancés y la rama principal de las especies de primates del nuevo mundo.¹⁹

1.8. Estructura Genómica de VHC

El genoma del VHC está formado por ácido ribonucleico (ARN) lineal de 32 nanómetros (nm) de longitud, envuelta en una cápside icosaédrica de 60 nm y finalmente por una envoltura lipídica. El VHC pertenece al grupo IV de genoma viral por ser una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva, constituido por 9,400-10,000 nucleótidos (9.6 kilo bases). Posee un único marco de lectura abierto, el cual codifica para una lipoproteína viral con un alto grado de heterogeneidad genética de aproximadamente 3,010 aminoácidos.¹⁷

El genoma del VHC está constituida por tres genes estructurales (De la nucleocápside o proteína "core" y las proteínas de la envoltura viral, E1 y E2); así como seis genes no estructurales (NS2, NS3, 4A, NS4B, NS5a, NS5b). La región NS5 codifica para dos proteínas, NS5a y NS5b, indispensables para la replicación del genoma viral; y la región NS3 tiene actividad enzimática. Una región no codificante denominada UTR (Untranslated region, por sus siglas en ingles), con una alta homología entre los diferentes genotipos del VHC, localizada en el

extremo 5' posee 42 bases muy conservadas y resiste la desnaturalización, en el otro extremo se encuentra la región 3' UTR que contiene los genes de las proteínas no estructurales. Ambas están implicadas en la regulación de la replicación del genoma y la expresión genética, y es por estas características que son utilizadas para realizar estudios moleculares (Figura 2).

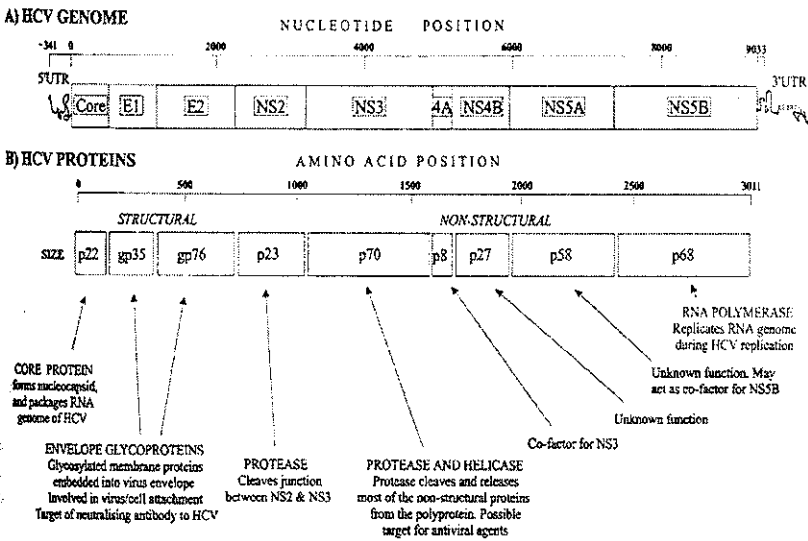


Figura 2. Estructura genómica del VHC, genes estructurales (core, E1 Y E2), genes no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NSSa y NSSb). Tomada de Simmonds 2001.

El RNA viral está envuelto por una nucleocápside, y ambos a su vez cubiertos por residuos de las membranas celulares del huésped, en donde las glicoproteínas del virus son insertadas para iniciar la replicación en los hepatocitos del huésped, para expresar sus proteínas y causar la enfermedad.

Las regiones 5' UTR no codificante y del "core" están presentes en todos los genotipos y juegan un papel importante en la replicación, en cambio, la región variable del genoma viral realiza la síntesis de las proteínas de la envoltura, y difiere en el propio virus. Esta característica le permite al virus evadir los mecanismos inmunes del huésped.

Dentro del genoma viral la variabilidad no es homogénea; generalmente se conserva la región 5' UTR, que posee menos variación con una relación mayor al 98%; su principal función es permitir la unión del ribosoma de las células del hospedero al ARN viral; también se conservan las secuencias de aminoácidos que son codificadas por el núcleo, además de las regiones NS3 y NS4. Las regiones que muestran una mayor variabilidad son los genes E1 y E2/NS1 que codifican las glicoproteínas de la envoltura, las proteínas codificadas por los genes NS2 y NS5 también son variables. Las regiones E1 y E2 albergan una zona denominada HVR1 (hipervariable, por sus siglas en inglés) la cual permite que el virus no sea detectado por el sistema inmune. Se presume que la heterogeneidad en el genoma del VHC está producida por las diferencias que existen en los genes que codifican las proteínas que regulan la replicación del virus.

Esto se origina por la acumulación de mutaciones durante los dos últimos milenios, con una tasa de aproximadamente 4×10^{-4} sustituciones por año;

mientras que los genes de la envoltura que se encuentran en contacto con el sistema inmune del huésped adquieren una rápida evolución.²⁰

1.9. Clasificación de Genotipos y Subgenotipos de VHC

A partir de modelos matemáticos, algunos autores han sugerido que el primer ancestro común del VHC se remontaría a más de 2000 años; para observar una divergencia de genotipos deberían de transcurrir 500 años y las diferencias entre un genotipo y subgenotipo a otro se tendrían después de 300 años. Además para que se pudiera dar el cambio de subgenotipo en un mismo hospedador a partir del virus parental deberían pasar al menos 50-60 años.

Simmonds y colaboradores, han establecido un sistema de clasificación consensado para los genotipos y subgenotipos del VHC, en donde se describe a los genotipos asignándoles números arábigo y a los subgenotipos con letras minúsculas. La variabilidad que se encuentra en el genoma viral da lugar a la clasificación de los genotipos, subgenotipos y aislados. Una homología de 66-69% da lugar a los genotipos, se conocen 6 hasta el momento designados del 1 al 6. Dentro de un mismo genotipo si existe una homología del 77-80% se obtienen los subgenotipos conociéndose más de 50, clasificados desde la "a" hasta la "k". Dentro de los subgenotipos se tiene una homología de 81-90%, se clasifica en aislados. Además como la ARN polimerasa es incapaz de corregir errores en la replicación viral ocasiona que el ARN no esté presente como una única secuencia sino como un conjunto de secuencias parecidas agrupadas junto a una secuencia mayoritaria, con una homología intergenoma del 91-99% lo que es conocido como

cuasiespecies. Los genotipos difieren entre si el 20% y los subgenotipos un 10%²¹
(Figura 3).

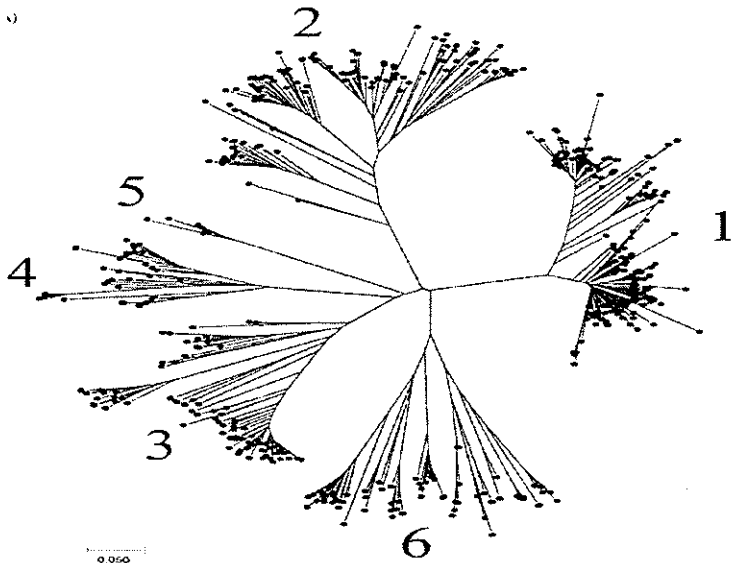


Figura 3. Árbol filogenético de genotipos de VHC conocidos hasta el momento. Tomada de Simmonds 2001.

1.10. Distribución geográfica de VHC

La distribución geográfica de los diferentes genotipos no es homogénea ya que existen diferencias importantes en la prevalencia de todos y cada uno de ellos en las distintas áreas del mundo. Se ha descrito²² que el 90% de todas las infecciones por VHC en América, Europa, China, Rusia y Australia son ocasionadas por los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a del VHC.

En Colombia un 80% de personas están infectadas con VHC, Estados Unidos presenta un 40% de infectados y los genotipos 1a y 1b son los más comunes, seguidos por el 2a y 2b. Europa presenta esta misma prevalencia de los genotipos. En India, Pakistán e Irán el genotipo 3 tiene una alta prevalencia, en Egipto y en África Central el genotipo que prevalece es el 1 y el 4; Sudáfrica tiene el 50% de infecciones por genotipo 5; en el Sudeste Asiático el genotipo 6 es el más frecuente.²³

Los genotipos 1, 2, y 3 tienen una distribución mundial, mientras que el subtipo 1b es predominante en Japón. Aunque los subtipos 2a y 2b son relativamente frecuentes en América, Europa y Japón, el subtipo 2c es encontrado en el Norte de Italia. El genotipo 3a es altamente frecuente en pacientes con abuso de drogas intravenosas en Europa, Estados Unidos y Sureste de Asia.

El genotipo 4 es el de mayor prevalencia en África y en el Medio Este. Los genotipos 5, 3 y 6 están limitados a Sud África y Asia, respectivamente. En Hong Kong, Camboya y Tailandia predominan los genotipos 4, 5 y 6 pero son poco detectados en América.^{24, 25} En el centro de Argentina el genotipo 2c es el más común mientras que en el Este del país predomina el genotipo 1b (Figura 4).

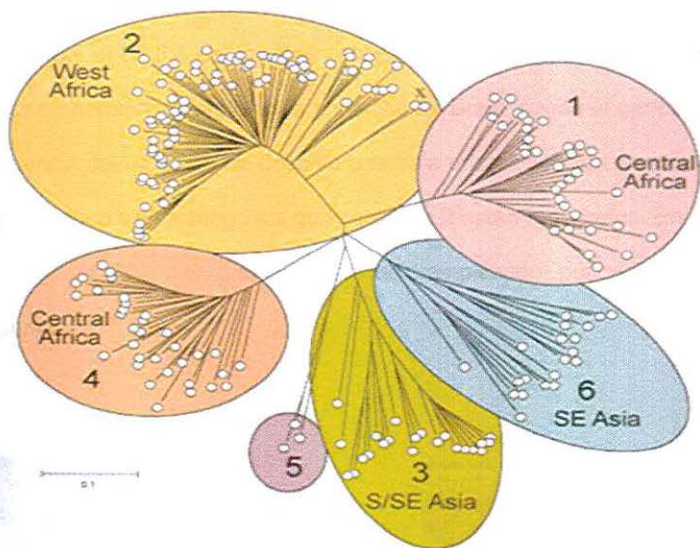


Figura 4. Distribución geográfica del VHC, los genotipos 1, 2 y 4 son frecuentes en África y los genotipos 3 y 6 en Asia. Tomada de Simmonds 2005.

Con respecto a Latinoamérica se ha registrado que el genotipo predominante de VHC es el 1, en Brasil el 93.8% de los infectados poseen genotipo 1, 2 y el 3 aunque con menor proporción, excepto en la zona Sur de Brasil donde el genotipo 3 tiene una prevalencia del 44%. Se ha descrito una baja prevalencia del genotipo 4 en Colombia y Argentina sin embargo los genotipos 1 y 2 están reportados. En el transcurso del 2007 al 2010 el genotipo 1b fue remplazado por el 2, en Venezuela²⁶ (Figura 5).

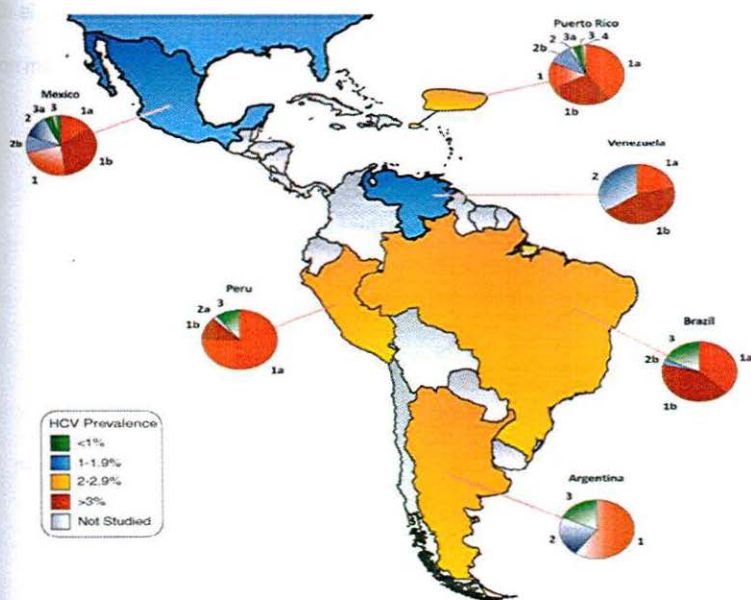


Figura 5. Prevalencia de genotipos de VHC en Latinoamérica. Tomada de Kershenovich D. 2011.

1.11. Prevalencia de la enfermedad por VHC

Se estima que el 3% de la población mundial, lo cual corresponde alrededor de 170 a 200 millones de personas en el mundo están infectados con el VHC, este afecta a todas las razas y edades por igual. La prevalencia del VHC varía de un país a otro, pero en todos se hace presente, en países industrializados es mucho menor comparado con los países en vías de desarrollo.²⁷ Europa cuenta con 9 millones de infectados con una prevalencia de 1%. En Estados Unidos las cifras van de 3.6 a 1.4%, con 4.5 millones de infectados, y cerca de 180,000 casos nuevos por año. De 2.7 a 3.9 millones de personas tienen infección crónica causando 12,000 muertes anuales.

Además está Japón con 350,000 casos nuevos por año. Suecia y Suiza tiene un 0.5%, Francia posee una prevalencia de 1%. En países europeos, como el norte de Italia se reporta un 3.2%, en Bélgica un 0.46% en Alemania 0.4% y un 0.46% en Portugal, Rumania presenta un 3.23% de prevalencia. En el Perú se estima una prevalencia alrededor de 1%. Por lo que, la infección por VHC tiene el potencial para ser la siguiente epidemia global.³⁰

Datos proporcionados por el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SIUVE), en México clasifica las hepatitis por grupo de edad, por lo tanto, el virus de la hepatitis A (VHA) está asociado principalmente a niños, el VHC es diagnosticado en adultos de 40-50 años, mientras que el virus de la hepatitis B (VHB) se hace presente en la población sexualmente activa. Las hepatitis con agente etiológico desconocido afectan a niños y adolescentes, en un

menor número a los jóvenes.³¹ Se ha descrito que en el 2005 la cirrosis hepática se consideró la tercera causa de mortalidad en los hombres y la séptima en las mujeres, esta varía entre 11.6 a 47.4 por cada 100,000 habitantes, con una mayor mortalidad en el área central del país. El promedio de edad es de 50.3 ± 12.0 años.³²

Existen evidencias de que en la población mexicana la infección por VHC se haya propagado a partir de los 60s y 70s, por medio de donaciones de sangre contaminada, aunado a la implementación exagerada de procesos quirúrgicos surgidos en los 70s. La infección por hepatitis C es diagnosticada cuando hay manifestación clínica o complicaciones de la enfermedad. El VHC es considerado el principal causante de la hepatitis crónica y la cirrosis hepática en el mundo.³³

En el 2000 se inició en México el diagnóstico para el VHC en los bancos de sangre; en el periodo 2000-2007 se registraron 192,588 casos de hepatitis. De estos 79% corresponde a VHA, el 3.3% a VHB, el 6% a VHC, y con agente infeccioso desconocido un 11.7%.³⁴ Actualmente, se estima 400,000 a 1,400,000 personas positivas al antígeno anti-VHC, de los cuales 200,000 a 700,000 presentan persistencia del virus. La prevalencia global es 1.4%, sin embargo existe diferencias por zonas del país, en el Norte se presenta un 2.0%, el Sur 1.5%, y en el centro 1.1%.³²

1.12. Factores de riesgo de VHC

Los principales factores de riesgo para adquirir la infección por el VHC son:

- Transfusión de sangre o de sus componentes antes de 1995 (en razón de que la versión definitiva de la NOM-003-SSA2-1993, que determina la detección de anticuerpos de VHC en los bancos de sangre, se dio a conocer hasta el 18 de julio de 1994).
- Trasplante de órganos antes de 1995.
- Uso de drogas vía intravenosa o vía intranasal (se debe investigar la infección por el VHC inclusive en personas que sólo usaron drogas inyectables una sola vez y no se consideran adictos).
- Contacto con sangre de una persona infectada a través de heridas, exudados de heridas y laceración de la piel o mucosas.
- Punciones accidentales al compartir agujas, inyecciones intravenosas o jeringas contaminadas con sangre infectada por el VHC.
- Practicarse tatuajes, piercing, (perforaciones corporales), acupuntura, manicure o podología con instrumentos no esterilizados y que estén contaminados.
- Tratamiento o extracciones dentales sin las condiciones de higiene adecuadas.
- El contagio del VHC puede ocurrir en los hospitales por hemodiálisis, uso de viales multidosis, cirujano infectado por el VHC o endoscopia con toma de biopsia.
- Ser personal de salud expuesto al contacto con sangre infectada por el VHC a través de las mucosas o por punción accidental con agujas infectadas.
- Transmisión vertical (de madre a hijo durante el nacimiento).
- Contacto sexual en caso de múltiples parejas o relaciones de alto riesgo (homosexual o heterosexual) sin protección.³⁵

1.13. Diagnóstico serológico y molecular del VHC

El diagnóstico de infección por VHC se realiza mediante la determinación de anticuerpos anti-VHC y la detección molecular del ARN genómico del VHC en suero. Para determinar los anticuerpos hay dos principales tipos de pruebas, las más utilizadas son los inmunoensayos enzimáticos (EIA), de los cuales existen tres generaciones, el de tercera generación es el más utilizado (EIA-3), detecta los antígenos del core y de los genes no estructurales 3' y 5' del genoma viral con una sensibilidad del 97%.

La otra técnica para determinar los anticuerpos es la valoración de inmunoblot recombinante (RIBA por sus siglas en inglés), que al igual que en los EIA, se conocen tres generaciones diferentes, siendo la más utilizada en la actualidad la de 2ª generación (RIBA-2). El diagnóstico molecular del VHC se realiza principalmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción reversa del ARN (PCR-TR), y es posible detectarlo de una a dos semanas posterior a la exposición al virus. A esta prueba se le denomina detección cualitativa; existen también ensayos cuantitativos que tienen el fin de medir la carga viral que presenta el individuo, cuya sensibilidad es menor a la de los ensayos estándar de PCR-TR.³⁶

La determinación de los genotipos se realiza mediante un ensayo de sonda lineal (LIPA, line probe assay por sus siglas en inglés), se utilizan los productos amplificados de la PCR-TR obtenidos, estos se enfrentan a sondas derivadas de distintos genotipos del VHC fijadas en una banda reactiva montadas en una banda de nitrocelulosa. Un formato comercial de esta técnica es el INNO-LIPA™

VERSANT para VHC. Otra técnica es la secuenciación directa de amplificación de ADNc del genoma viral, mediante PCR y electroforesis capilar automatizada.

Las secuencias obtenidas se comparan con otras que son obtenidas de un banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para genotipificarlas por homología filogenética.⁶

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hepatitis originada por el VHC se ha convertido en uno de los principales problemas de enfermedades infecciosas emergentes. Datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud describen una prevalencia mundial de 3% lo cual corresponde a 170 millones de personas infectadas.³⁶

De los pacientes infectados que desarrollan complicaciones un 27% evoluciona a cirrosis hepática³⁷, y 30% carcinoma hepatocelular.³⁸ En México se registran de 400,000 a 1, 400,000 anti-VHC positivos, de los cuales 200,000 a 700,000 presentan viremia activa, con una prevalencia de 0.7% lo que indica que existen 700,000 mexicanos infectados.³⁸ En Jalisco se ha descrito una prevalencia de 0.2% de infectados con VHC.³⁹ La cirrosis hepática en México es la sexta causa de muerte general y la tercera en hombres de 15 a 64 años de edad, con una tasa de mortalidad de 20.3 defunciones por 100,000 habitantes.⁵⁰

La primera determinación de genotipos de VHC en México se realizó en 1998 donde los genotipos predominantes fueron el 1a y 1b.²⁹ Considerados los genotipos con peor pronóstico de respuesta al tratamiento antiviral.⁴⁰ En base a lo descrito nos preguntamos cuál es el número de pacientes infectados con el VHC que resuelven la enfermedad por sí mismos y cuántos evolucionan a la cronicidad y cuál es la prevalencia de los genotipos de VHC, por lo que nos proponemos determinar la carga viral e identificar los genotipos del VHC en pacientes que acudan al Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" en el periodo 2010-2012.

3. JUSTIFICACIÓN

La hepatitis C, se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y particularmente en México teniendo una prevalencia estimada de 0.7 a 1.5%.

La detección de RNA del VHC y la carga viral es la base molecular para la confirmación del diagnóstico y posterior tratamiento del paciente infectado con el virus de la hepatitis C. Los pacientes con carga viral positiva y persistente llegan a desarrollar cirrosis hepática y en algunos casos carcinoma hepatocelular. Por el contrario en un número indeterminado de pacientes de VHC la carga viral disminuye hasta llegar a ser indetectable, desconociendo las causas que conducen a esta resolución viral. En nuestro país no se sabe qué porcentaje de pacientes llegan a tener resolución de la enfermedad.

Los factores de riesgo asociados a las hepatitis virales se pueden modificar a través del tiempo tanto en una misma población como en generaciones diferentes por lo que es necesario realizar periódicamente estudios epidemiológicos moleculares para conocer el comportamiento del VHC en una población determinada. Conocer el genotipo del VHC es importante puesto que se sabe que existe unos genotipos más resistentes al tratamiento antiviral (genotipo 1a y 1b), que otros (genotipos 2 y 3). Por lo tanto determinar los genotipos del virus podría proporcionar información del genoma viral y de respuesta a tratamiento, lo cual resulta de vital importancia para el paciente y el clínico.

Además los estudios de epidemiología molecular permiten tener un panorama amplio de la evolución del virus y la ruta que éste puede seguir a lo largo del tiempo, ya que actualmente no se ha desarrollado "vacuna" alguna para contrarrestar sus efectos a la infección.

4. HIPOTESIS

El genoma viral (genotipos), y la carga viral (cinética viral) son factores que podrían determinar la persistencia del virus en suero, la cronicidad de la enfermedad y por lo tanto la progresión del daño hepático de pacientes que acudan al Hospital Civil de Guadalajara.

5. OBJETIVOS

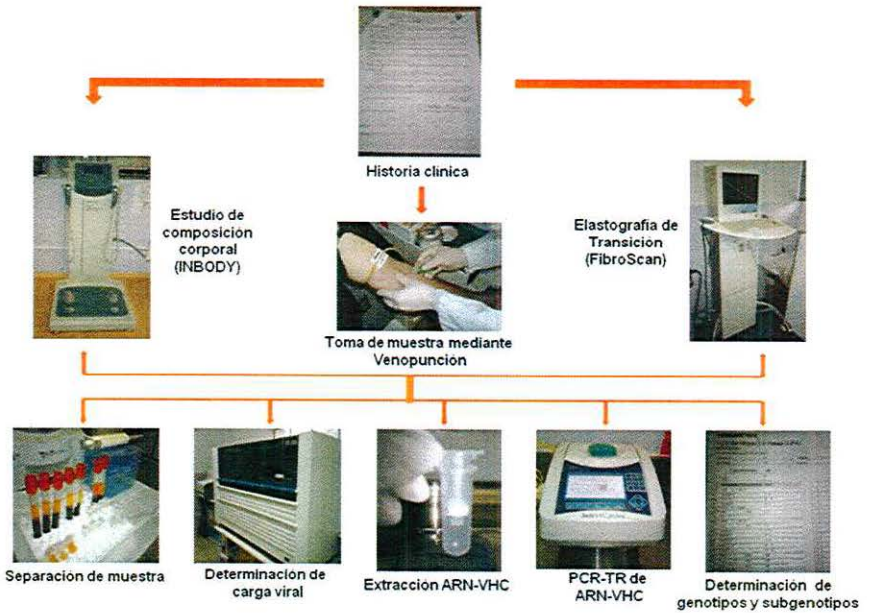
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la carga viral, genotipos y subgenotipos del virus de la hepatitis C (VHC), en pacientes del Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde".

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar pacientes con anticuerpos anti VHC y la actividad viral positiva o negativa de los mismos.
- Determinar los genotipos y subgenotipos del VHC en pacientes con carga viral positiva.
- Relacionar los niveles de la carga viral con el genotipo del VHC.
- Identificar los factores de riesgo en pacientes con VHC.
- Analizar los genotipos del VHC y su asociación con daño hepático.

6. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



7. DISEÑO METODOLÓGICO

Se incluyeron 188 pacientes infectados con VHC a los cuales se les aplicó la historia clínica para recolección de datos previamente diseñada donde se recabó información sociodemográfica, clínica y bioquímica y su respectivo consentimiento bajo información de cada uno de los pacientes.

Se realizó estudio de bioimpedancia magnética (INBODY), para evaluación de composición corporal.

Se realizó la toma de sangre periférica mediante venopunción, para exámenes de laboratorio utilizando espectrofotometría basado en química seca (Vitros); para perfil de lípidos (Col-T, TG, Col- LDL, Col- HDL, Col- VLDL); pruebas de función hepática (AST, ALT, GGT), química sanguínea (glucosa, urea, creatinina); además de obtener muestras sanguíneas para separación de suero y extracción de ADN genómico del paciente.

Se les realizó el estudio de Elastografía de Transición (FibroScan), para detectar el grado de daño hepático que presentan los pacientes con hepatitis C crónica bajo los siguientes criterios:

1. Diagnóstico serológico de VHC.
2. IMC inferior a 30.
3. Que no hayan sido diagnosticados clínicamente con cirrosis.
4. Que el paciente no presente ascitis.
5. Las mujeres que no cursen por periodo menstrual, ni se encuentren en estado gravídico (embarazo).

7.1. Tipo de estudio

Descriptivo, prospectivo y de serie consecutiva de casos.

7.2. Determinación de carga viral ARN-VHC

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHC (Roche) es una prueba de amplificación in vitro del ácido nucleico para la determinación cuantitativa de ARN del VHC en plasma o suero humano. Esta prueba está basada en tres procesos principales que incluyen la preparación de la muestra, transcripción reversa y amplificación del mismo:

A) Preparación de las muestras.

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHC utiliza la preparación automatizada de la muestra en el instrumento COBAS® AmpliPrep mediante una técnica de captura genérica basada en sílice. El procedimiento procesa 850 µL de plasma o suero. Se lleva a cabo la lisis de las partículas víricas del VHC mediante incubación a alta temperatura con una proteasa y un tampón caotrópico de unión/lisis que libera los ácidos nucleicos y protege al ARN liberado del VHC de las RNasas presentes en suero o plasma. Junto con el reactivo de lisis y las partículas magnéticas de vidrio, se introduce en cada muestra la enzima proteasa y un número conocido de moléculas de ARN del patrón de determinación cuantitativa (QS), del VHC (control interno).

Posteriormente se incuba la mezcla, el ARN del VHC y del QS del VHC se unen a la superficie de las partículas magnéticas de vidrio. Las sustancias no unidas, tales

como sales, proteínas y otras impurezas celulares se eliminan al lavar las partículas magnéticas de vidrio. Después de la separación de las perlas y completar los pasos de lavado, se eluye el ácido nucleico adsorbido a temperatura elevada con una solución acuosa. Se añade entonces la muestra procesada, que contiene las partículas magnéticas de vidrio además del ARN liberado del VHC y el ARN del QS del VHC a la mezcla de amplificación que se transfiere al analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48. El ARN blanco del VHC y el ARN del QS del VHC se transcriben (transcripción reversa), amplifican y detectan simultáneamente mediante la escisión de una sonda oligonucleótida doblemente marcada específica del blanco del QS.

B) Transcripción reversa y amplificación mediante PCR.

La reacción de transcripción reversa y amplificación mediante PCR se lleva a cabo con la enzima recombinante ADN polimerasa de *Thermus specie* (Z05). En presencia de manganeso (Mn^{2+}) y bajo condiciones tampón apropiadas, Z05 muestra actividades tanto de transcriptasa reversa como de ADN polimerasa. Esto permite que la transcripción reversa y la amplificación mediante PCR tengan lugar junto con la detección en tiempo real del amplicón.

Las muestras procesadas se añaden a la mezcla de amplificación en tubos de 0.2 mL donde se produce la transcripción reversa y la amplificación mediante PCR. La mezcla de reacción se calienta para permitir que un iniciador descendente o antisentido hibride específicamente con el ARN blanco del VHC y con el ARN del QS del VHC.

En presencia de Mn^{2+} y un exceso de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), con inclusión de trifosfatos de deoxiadenosina, doxiguanosina, deoxicitidina y deoxiuridina, la polimerasa Z05 extiende los iniciadores hibridados formando una cadena de ADN complementaria al ARN blanco.

- Amplificación del VHC.

Tras la transcripción reversa del ARN blanco del VHC y del ARN del QS del VHC, se realiza en el termociclador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48, este calienta la mezcla de reacción para desnaturalizar el híbrido ARN:ADNc de VHC y exponer las secuencias blanco específicas del iniciador. A medida que la mezcla se enfría, los iniciadores hibridan al ADN blanco. La enzima ADN polimerasa termoestable de *Thermus specie* Z05, en presencia de Mn^{2+} y dNTPs extiende los iniciadores hibridados a lo largo de la plantilla del blanco para producir una molécula de ADN bicatenario denominada amplicón. El equipo antes mencionado repite automáticamente este proceso un número de ciclos predeterminado, con el fin de duplicar en cada ciclo la cantidad de ADN del amplicón.

- Amplificación selectiva.

La amplificación selectiva del ácido nucleico de la muestra se logra en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHC mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa) y trifosfato de deoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen deoxiuridina, no del ADN que contiene deoxitimidina. El ADN natural

carece de deoxiuridina, sin embargo está siempre presente en el amplicón debido al uso de trifosfato de deoxiuridina como uno de los dNTP en el reactivo de mezcla maestra; por lo tanto, sólo el amplicón contiene deoxiuridina.

La deoxiuridina hace que el amplicón contaminante sea susceptible de ser destruido por la enzima AmpErase antes de la amplificación del ADN. Del mismo modo, la enzima destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar tras la activación inicial de la mezcla maestra por el manganeso. La enzima AmpErase que se incluye en el reactivo de mezcla maestra, cataliza la escisión del ADN que contiene deoxiuridina en los residuos de deoxiuridina abriendo la cadena de deoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la deoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no pueda amplificarse. La enzima permanece inactiva durante largos periodos de tiempo una vez expuesta a temperaturas superiores a los 55° C, es decir, durante los pasos del ciclo térmico y, por consiguiente, no destruye el amplicón formado tras la reacción PCR.

C) Detección de los productos de la PCR en una prueba COBAS® TaqMan®

Las pruebas COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® VHC utiliza tecnología de PCR en tiempo real. El uso de sondas fluorescentes doblemente marcadas permite detectar en tiempo real la acumulación de productos de la PCR monitorizando la intensidad de emisión de los productos fluorescentes (reporteros) liberados durante el proceso de amplificación. Esta prueba incluye sondas oligonucleótidas del VHC y del QS del VHC con un control primario y un control

fluorescente. En estas pruebas las sondas del VHC y del QS del VHC están marcadas con distintos productos fluorescentes. Cuando las sondas están intactas, la proximidad del control inhibe la fluorescencia del control primario debido a efectos de transferencia de energía tipo Forster. Durante la PCR, la sonda hibrida con una secuencia blanco y se escinde por la actividad nucleasa 5' – 3' de la ADN polimerasa Z05 termoestable. Una vez que el control primario y el control se liberan y separan, cesa la actividad inhibidora y aumenta la fluorescencia del control primario.

La amplificación del ARN del VHC y el ARN del QS del VHC se miden de forma independiente a distintas longitudes de onda. Este proceso se repite durante un número de ciclos predeterminados, aumentando en cada ciclo la intensidad de emisión de cada uno de los reporteros individuales, lo que permite la identificación del ARN del VHC y del ARN del QS del VHC. El ciclo de PCR en el que la curva de crecimiento adquiere forma exponencial está relacionado con la cantidad de material de partida presente al inicio de la reacción de PCR. Este sistema tiene un límite de detección de 15 VHC-RNA UI/mL y un rango lineal de 43 UI/mL a $6.90E+07$ VHC-RNA UI/mL⁴¹ (Los reactivos utilizados para esta prueba se encuentran en anexo).

7.3. Purificación de ARN Viral para genotipificación

Se utilizan los reactivos que provee QIAamp Viral RNA Mini Kit. Este paquete puede purificar ADN o ARN viral simultáneamente.

El procedimiento para la purificación de ARN utilizado es el siguiente:

- En tubo eppendorf de 1.5 mL, se coloca 560 μ L del tampón AVL (tiocianato de guanidina).
- Se añaden 5.6 μ L del ARN acarreador.
- Se añaden 140 μ L de plasma o suero en la solución anterior.
- Se mezcla perfectamente durante 15 s.
- Se centrifuga con un pulso para quitar la solución de la tapa.
- Se incuba a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 m.
- Se añaden 560 μ L de etanol (96-100%) a la muestra, se mezcla durante 15 s y se centrifuga con un pulso.
- Cuidadosamente se pasa 660 μ L de la solución anterior a la columna con su correspondiente tubo recolector de 2 mL.
- Se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 m.
- Se repite los dos pasos anteriores.
- Se añaden 500 μ L del tampón AW1 (hidrocloruro de guanidina)
- Se centrifuga a 8000 rpm durante 1 m.
- Añadir 500 μ L de tampón AW2, se centrifuga a 20,000 x g (14,000 rpm) durante 3 m.
- Se coloca la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL, y se añaden 60 μ L de tampón AVE (conservador, **azida de sodio**), se incuba a temperatura ambiente durante 1 m y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 m. Se almacena a -20°C.⁴²

7.4. Amplificación del ARN-VHC

utiliza el kit HCV Amplification 2.0 kit (LIPA, VERSANT).

Este paquete provee todos los reactivos para la transcripción reversa y la amplificación de las regiones 5'UTR y la core del VHC.

La PCR se realiza en presencia de deoxiuridina trifosfato (dUTP) para generar amplicones que puedan ser degradados por tratamiento con Uracil-N-glicosilasa (UNG) y calor. La UNG corta el enlace glicosídico entre la base uracil y la ribosa creando un sitio abásico susceptible al calor.

La mezcla para la PCR-TR por muestra, se compone de 26 μL de la mezcla de amplificación que contiene transcriptasa reversa de ambos sentidos, *Taq* polimerasa y Uracil-N-Glucosilasa; y 4 μL de mezcla de enzimas la cual se compone de oligonucleótidos sintéticos con dNTP/dUTP, MgCl_2 y RNAsa.

- Se homogeniza la mezcla brevemente y se centrifuga con un pulso.
- Se agregan 30 μL de la mezcla de PCR a cada tubo de reacción.
- Se agregan 20 μL del RNA extraído al tubo de reacción.
- Se colocan los tubos de reacción a temperatura ambiente durante 10 min antes de la amplificación para permitir la degradación de cualquier ADN uracil contaminante.

- Para la amplificación mediante PCR se utilizan las siguientes condiciones:

ETAPAS	TEMPETATURA	TIEMPO
Transcripción Reversa	50 \pm 0.5°C	30 m
Activación inicial PCR	95 \pm 0.5°C	15 m
40 ciclos de:		
Desnaturalización	95 \pm 0.5°C	30 s
Alineamiento	50 \pm 0.5°C	30 s
Extensión	72 \pm 0.5°C	15 s
Extensión final	72 \pm 0.5°C	2 m
	4 \pm 0.5°C	Máximo 2 hrs y almacenar a -20°C

7.5. Determinación de genotipos y subgenotipos de VHC

Se utilizó el kit VHC Genotype 2.0 Assay (LIPA).

Este paquete comercial se compone de cuatro etapas principales todas y cada una de ellas son de gran importancia para un buen procesamiento de las muestras y la obtención de resultados confiables.

A) Desnaturalización de la muestra.

- Es importante tener un baño María con agitación a una temperatura no mayor de 50 \pm 0.5°C, la cual es crítica durante el proceso y para los resultados.

- Se identifican las muestras sobre la tira solamente con lápiz ya que las soluciones pueden borrar la tinta.
- Se añaden 10 μL de solución DENAT (contiene 1.7% de hidróxido de sodio), en la esquina superior de cada canal de la bandeja.
- Se agregan 10 μL de la muestra o controles en cada canal, y se mezcla perfectamente.
- Se incuban a temperatura ambiente durante 5 m, para permitir la desnaturalización.

B) Hibridación de la muestra.

- Cuidadosamente se agregan 2 mL de solución HYB/SW (cloruro de sodio, citrato de sodio, detergente y conservantes), a cada canal, cuidando de no contaminar otros canales.
- Se mezclan los reactivos de los canales evitando contaminarlos.
- Se colocan las tiras en el canal correspondiente identificadas previamente, sumergirlas por completo en la solución.
- Se coloca la bandeja en el baño María a $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$, si es necesario inmovilizar la bandeja.
- Se ajusta el baño María a 80 rpm y se incuba durante 60 m, asegurándose de que la tira permanezca sumergida totalmente y en movimiento constante. Se remueve la bandeja al completarse el tiempo de hibridación.

C) Lavado de las tiras reactivas.

- Se aspira la solución del canal utilizando una pipeta inclinando ligeramente la bandeja para que el líquido se almacene en un extremo.
- Se agregan 2 mL de solución HYB/SW a cada canal y se mezcla balanceando la bandeja por 30-90 s a TA.
- Se aspira la solución y se repite el paso anterior.
- Se aspira la solución y se agregan 2 mL de solución HYB/SW a cada canal, se coloca la bandeja en el baño María a $50 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ con agitación de 80 rpm e incubar durante 30 m.

NOTA: durante este lapso de tiempo se preparan 8 mL de solución de enjuague, RINSE SOLN 5X (0.5% de fosfato, 2-clorocetamida, NaCl, detergente y conservadores), diluido en agua inyectable por cada canal y 10 mL extra por dilución. También se preparan 2 mL del CONJ 100X (estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina < 0.1%, 2-cloroacetamida, proteínas estabilizadoras y conservadores), diluido en solución CONJ (fosfato < 0.1%, 2-cloroacetamida, proteínas estabilizadoras y conservadores), por cada canal más 2 mL extra.

- Se remueve la bandeja al completarse el tiempo.

D) Desarrollo de color.

- Se aspira la solución de cada canal.
- Se agregan 2 mL de solución de enjuague (RINSE 5X) a cada canal,

se mezcla balanceando la bandeja por 60-90 s a TA.

- Se aspira la solución y se repiten los pasos anteriores.
- Se añaden 2 mL del conjugado diluido (CONJ DIL) a cada canal, se coloca la bandeja en el agitador a 60 rpm por 30 m a TA.

NOTA: se preparan 2 mL del sustrato diluido SUBS BCIP/NBT 100X diluido en SUBS BUF por cada canal y 2 mL extra.

- Se remove la bandeja al concluir el tiempo de incubación y se aspira la solución de cada canal.
- Se agregan 2 mL de solución de enjuague a cada canal y se mezcla balanceando la bandeja por 60-90 s a TA.
- Se aspira la solución y se repite el enjuague nuevamente.
- Se añade 2 mL de SUBS BUF (tampón Tris < 0.1%, 2-cloroacetamida, $MgCl_2$, NaCl y conservadores), a cada canal y se mezcla balanceando la bandeja por 30 m a TA.
- Se aspira la solución, y se agregan 2 mL de sustrato diluido (SUBS BCIP/NBT) (1.6% de 5-Bromo-4-Nitroasul de tetrasodio y 83% dimetilformamida), a cada canal y se mezcla balanceando la bandeja por 30 m a TA. Se remueve la bandeja del agitador y se aspira la solución.
- Se agregan 2 mL de agua inyectable a cada canal y se agita durante 3 ó 4 m.
- Se remueve la bandeja, se aspira y se repite el paso anterior.
- Utilizando pinzas se remueve cada banda de la bandeja y se coloca

la banda marcador (banda verde) de frente sobre papel absorbente.

- Se dejan secar las bandas antes de leer los resultados.

E) Control de calidad.

- Se fijan las bandas a la hoja de reporte de datos.
- Se utiliza la tarjeta de lectura correctamente alineada; banda marcador verde con el MKR LN.
- Una banda es considerada positiva cuando una banda clara púrpura/café aparece sobre la tira, al finalizar el procedimiento de desarrollo de color.
- El control negativo sólo tiene positivo una banda (L1) CONJ CTRL, e indica que la tira fue procesada correctamente.
- El control positivo tiene las siguientes bandas: CONJ CTRL (L1), AMPL CNTRL1 (L2) e indica la presencia de ADN-VHC de la región UTR 5' biotinilado producto de la PCR. Las bandas 13, 14, 15, AMPL CNTRL 2 (L23), esta es positiva cuando el ADN-VHC biotinilado de la región core producto de la PCR está presente; y L24. Si las bandas no corresponden la corrida es invalidada y debe repetirse (Figura 7).

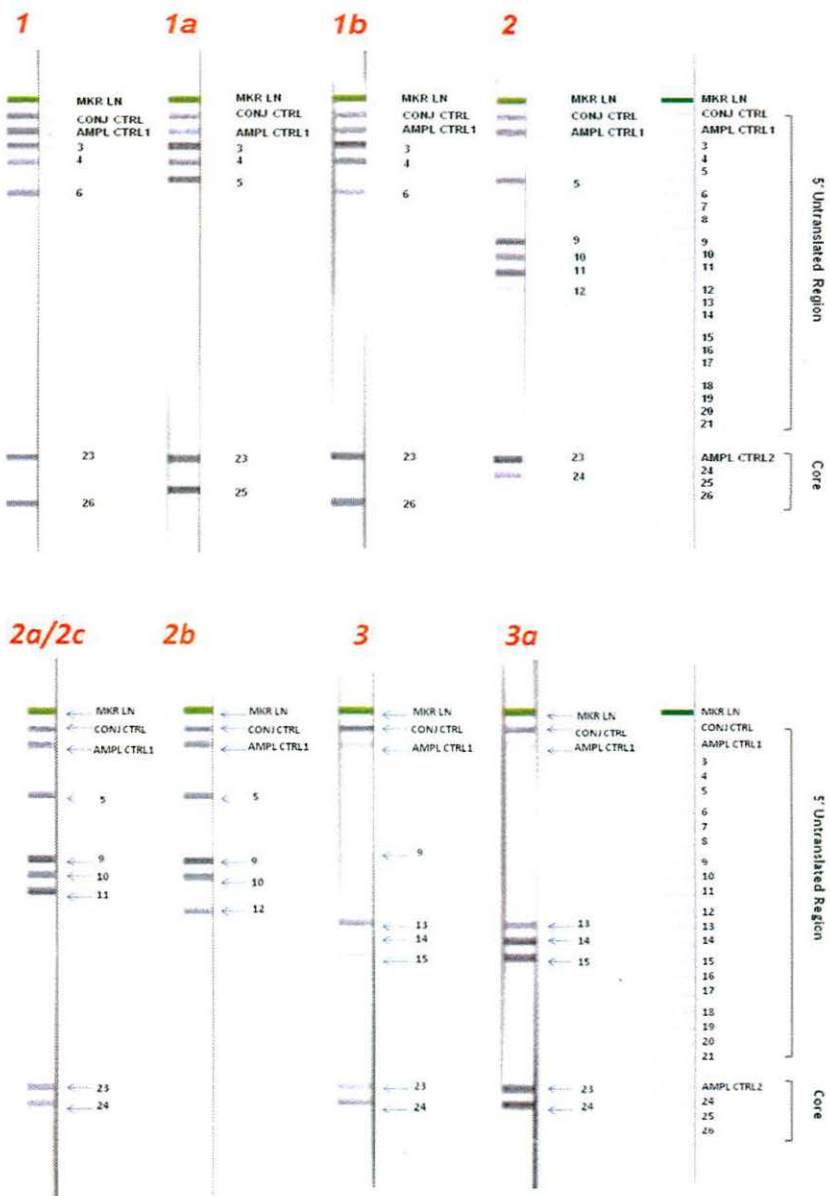


Figura 7. Genotipos y subgenotipos de VHC hibridados en bandas de nitrocelulosa, en la población del Occidente de México.

8. Análisis Estadístico.

Los datos se agruparon como media y desviación estándar y/o rangos. Se analizaron utilizando la distribución t de Student y la probabilidad ji cuadrada para identificar diferencia estadística en los parámetros evaluados. Todos los valores fueron considerados significativos al presentar una $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1. Características clínicas y sociodemográficas de pacientes infectados con VHC

Se analizaron 188 muestras de pacientes infectados con VHC, en el periodo 2010-2012, que acudieron al Servicio de Biología Molecular en Medicina.

De las 188 muestras analizadas, el 64% (120/188), tuvieron carga viral positivas y el 36% (68/188) restante tuvieron carga viral indetectable (< 15 ARN-VHC, UI/mL).

Del total de pacientes estudiados, 67 de ellos fueron de género masculino y 121 de género femenino. La edad promedio en ambos grupos fue de 50 años, predominando las mujeres, dedicándose principalmente al hogar y con una escolaridad básica (primaria y secundaria).

Los estudios de laboratorio indican una elevación significativa de las enzimas hepáticas [ALT, 77 ± 59.5 (16-461) u/L], en los pacientes de carga viral positiva ($p < 0.05$), mientras que los pacientes de carga viral indetectable presentan un incremento con relación a los triglicéridos ($p < 0.05$), no se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de glucosa en ambos grupos de pacientes.

Los factores de riesgo asociados a pacientes infectados con VHC con carga viral positiva e indetectable son los mismos, principalmente las cirugías y transfusiones, sin embargo los pacientes con carga viral indetectable poseen un incremento en el consumo de alcohol y drogas. Además en estos pacientes se suman a la transmisión del virus otros factores de riesgo como son los tatuajes,

procedimientos dentales, y la acupuntura. Cabe mencionar que solamente la prevalencia de transfusiones en los pacientes positivos a la carga viral fue significativa ($p < 0.05$), al igual que en los pacientes de carga viral indetectable se presenta el piercing ($p < 0.05$), (Tabla 1).

	VHC	VHC C.V. (+)	VHC C.V. (-)
η (%)	188 (100)	120 (64)	68 (36)
Genero H/M	67/121	40/80	27/41
Edad \pm D.E. (Rango)	50 \pm 12 (19 – 78)	51 \pm 11 (27 – 71)	49 \pm 13 (19 – 78)
Ocupacion: Hogar/Desempleo/Oficio/Profesion	85 / 6 / 57 / 13	54 / 4 / 40 / 6	31 / 2 / 28 / 7
Escolaridad: Nula/ Basica /M. Sup. / Sup.	10 / 117 / 15 / 29	7 / 72 / 8 / 16	3 / 45 / 7 / 13
Bioquimicos			
AST	56 \pm 39.1 (13 – 217)	70.3 \pm 41.8 (13 – 17)	33.2 \pm 18.8 (15 – 108)
ALT	60.3 \pm 53.1 (6 – 461)	77 \pm 59.5 (16 – 461)	34.3 \pm 24.7 (6 – 149)
GGT	62.3 \pm 65.7 (2 – 362)	74 \pm 72.5 (11 – 362)	43.4 \pm 47.9 (2 – 250)
Colesterol	165.2 \pm 51 (54 – 298)	151.8 \pm 48.1 (54 – 298)	188 \pm 47 (85 – 291)
Trigliceridos	144 \pm 71.5 (33 – 431)	129.2 \pm 63.4 (33 – 364)	170 \pm 77.5 (62 – 431)
Glucosa	104.5 \pm 40.2 (59 – 458)	104 \pm 42 (59 – 458)	104 \pm 36 (53 – 239)
DM2 n= (%)	20 (10.6)	13 (11)	7 (10)
Factores de riesgo			
Cirugias H/M (%)	136 (72)	22/61 (69)	16/37 (78)
Transfusión H/M (%)	104 (55)	12/60 (60)*	11/21 (49)
Prom. sexual H/M (%)	49 (26)	20/8 (23)	15/1 (24)
Tatuajes H/M (%)	38 (20)	13/12 (21)	9/4 (19)
Proc. dental H/M (%)	35 (19)	7/17 (20)	3/8 (16)
Acupuntura H/M (%)	18 (9.5)	4/8 (10)	1/5 (9)
Piercing H/M (%)	9 (4.8)	0/3 (2.5)	5/1 (9)*
Alcohol H/M (%)	61 (32.4)	20/13 (27)	19/9 (41)
Otras drogas H/M (%)	30 (16)	15/3 (15)	11/1 (18)
Drogas IV H/M (%)	16 (8.5)	7/3 (8)	6/0 (9)

* $p < 0.05$ entre C. V (+) Y C. V (-).

Tabla 1. Características clínicas y sociodemográficas de pacientes con VHC.

9.2. Rangos de Cargas Virales del VHC expresadas en UI/mL y Log.

Para un mejor manejo de la información se dividieron los valores de las cargas virales por rangos, menor de 4,000, entre 4,001-10,000; entre 10,001-100,000 y mayor de 100,000 UI/mL y expresados en logaritmos. Los niveles de cargas virales encontrados en el presente trabajo son variables, encontrando un 3% con carga viral menor a 4,000 UI/mL (Log menor a 3.7); 2% poseen carga viral entre 4,000-10,000 UI/mL (Log de 3.8-4.0); 7% presentan un rango de 10,000-100,000 UI/mL (Log de 4.1-5.0), y lo más sobresaliente es que el 88% de los pacientes infectados con VHC manejan un rango mayor de 100,000 UI/mL y la carga viral más elevada fue de 96,000,000 de UI/mL (Log. de 5.1-7.74)³⁸ (Figura 8).

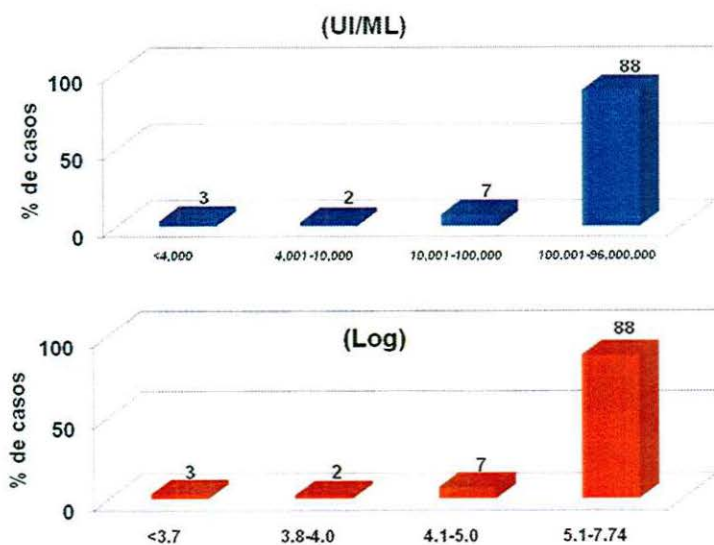


Figura 8. Rangos de la carga viral expresadas en UI/mL y Logaritmos, de pacientes infectados con VHC, n = 120.

9.3. Genotipos de VHC en el Occidente de México

De las 120 muestras con carga viral positiva, 104 de estos pacientes se les determinó el genotipo y subgenotipo del VHC, encontrándose predominantemente los genotipos 1, 2 y 3 en la población de estudio. Al determinar los subgenotipos correspondientes del VHC y su prevalencia, se observó que el genotipo 1a (n= 45) es el de mayor prevalencia con un 43.26%, seguido de los genotipos 1b y 2 (n=16) con 15.38%; y con menor prevalencia están los genotipos 3a (n = 13) con 12.5%, 2b (n= 8) con 7.69%, 2a/2c (n=3) con 2.88% y finalmente los genotipos 1 (n=2) con 1.92% y el genotipo 3 (n=1) con 0.96%^{29,43} (Figura 9).

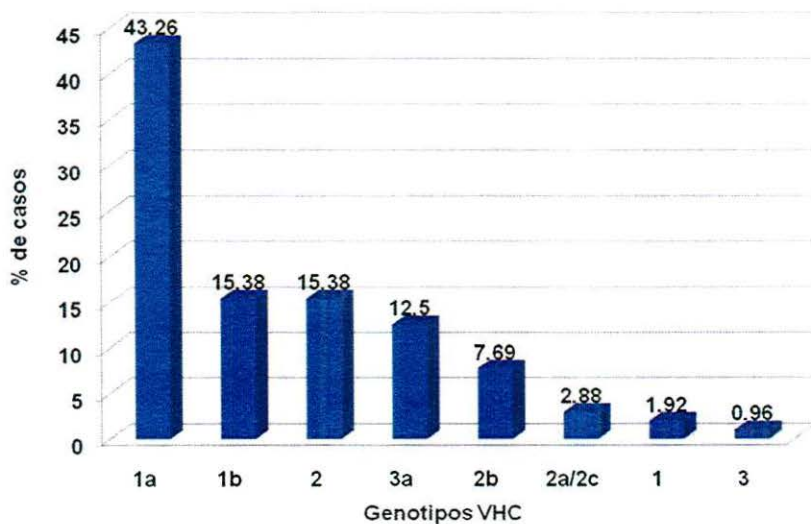


Figura 9. Determinación de genotipos y subgenotipos de VHC en el Occidente de México, n = 104.

9.4. Análisis comparativo de los estudios de VHC realizados en el Occidente de México

Al comparar los resultados obtenidos de los genotipos de VHC del presente trabajo con los antes realizados en el Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" y en la población del Occidente de México,^{29, 43} podemos observar que el genotipo 1a predominaba antes y lo sigue haciendo en la actualidad, sin embargo el genotipo 1b presenta una disminución, mientras que los genotipos 2 y 3a han aumentado considerablemente con respecto a los estudios anteriores.

Por lo que podemos observar que en un periodo de catorce años han cambiado los genotipos de VHC y su prevalencia en la población de estudio. Considerando así encontrarnos en una etapa activa de transición epidemiológica que presenta el virus y sus genotipos, sugiriendo que esto es debido a los nuevos factores de riesgo que están presentando los pacientes infectados con VHC, siendo estos el abuso en el consumo de drogas, lo cual ya se ha descrito en la literatura donde correlacionan los genotipos 2 y 3 con el consumo de drogas.

Por lo que se sugiere considerar estos resultados obtenidos como un indicador para que el sector salud tome las medidas adecuadas y se considere aplicación estrategias oportunas para que no siga en aumento la propagación de la infección viral (Figura 10).

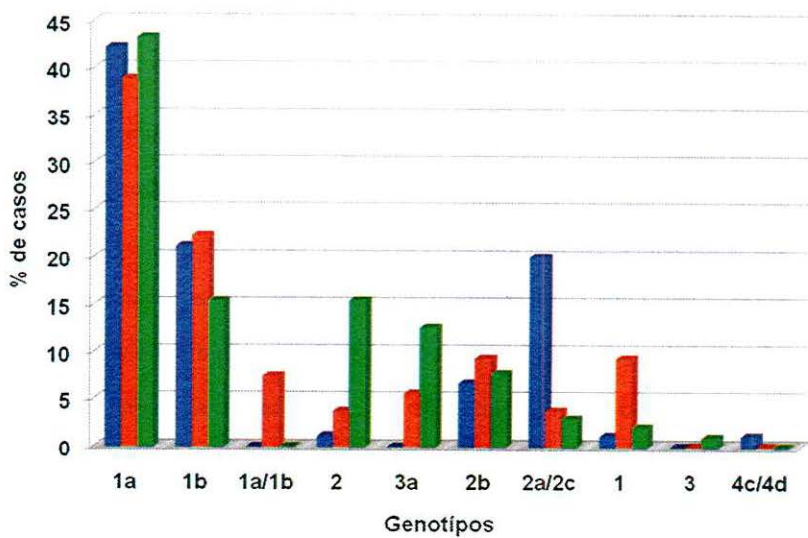


Figura 10. Estudios realizados de prevalencia de genotipos de VHC en el Occidente de México.

■ 1998 (Rivas-Estilla), n = 90. ■ 2005 (Panduro A. 2010), n = 75. ■ Este estudio (2012), n = 104.

1.5. Correlación de la carga viral expresada en UI/mL y Log vs genotipos de VHC

Al correlacionar los genotipos de VHC con el promedio de las cargas virales, se observó que los genotipos 2, principalmente 2b manejan cargas virales elevadas (13,000,000 UI/mL); los genotipos 1 poseen cargas virales intermedias (6,000,000 UI/mL) y con cargas virales menores el genotipo 3 (25,300 UI/mL). Estos resultados se obtuvieron tanto en UI/mL como en unidades logarítmicas. Se compararon los diferentes genotipos y sus respectivas cargas virales encontrándose una diferencia significativa entre el genotipo 1 vs genotipo 3 ($p < 0.05$), y de la misma manera el genotipo 2 vs genotipo 3 ($p < 0.05$), (Figuras 11 y 12).

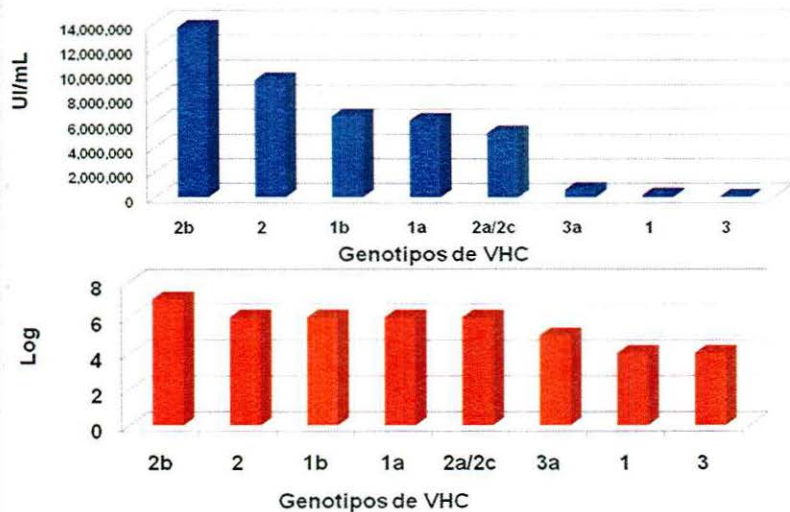


Figura 11. Asociación de carga viral de VHC por genotipo, presentando el genotipo 2b las cargas virales superiores (13,000,000 UI/mL).

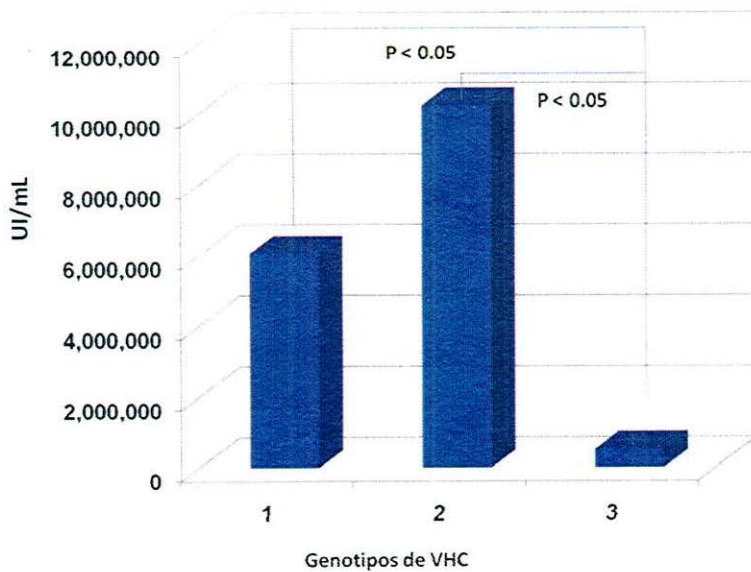


Figura 12. Asociación de carga viral por genotipo, $p < 0.05$ del genotipo 2 respecto del genotipo 3.

9.6. Factores de riesgo y tiempo de exposición en pacientes de VHC, con carga viral positiva y carga viral no detectable.

Se analizaron los factores de riesgo que podrían estar involucrados con la transmisión del virus de la Hepatitis C, además de los tiempos de exposición a la infección en pacientes con carga viral positiva y pacientes con carga viral indetectable. Ambos grupos presentaron los mismos factores de riesgo y el mismo tiempo de exposición al virus, presentándose las cirugías (72%) seguida de las transfusiones (55%); estos son los más conocidos y tienen un mayor tiempo de estar contribuyendo a la transmisión del virus; sin embargo hoy en día se suman otros factores asociados con la propagación del VHC aunque en menor medida, estos son los tatuajes, los procedimientos dentales, además de la acupuntura. Un factor poco reportado con anterioridad en la literatura en nuestra población de estudio son las drogas intravenosas, el presente estudio permitió observar que también se suman a la transmisión de la infección viral. Otro factor aunado a la transmisión de VHC y muy de moda principalmente en los jóvenes son los piercing, los cuales se están convirtiendo en una fuente de infección, además de los tatuajes por reutilizar material contaminado principalmente agujas y la tinta.

Por último está la promiscuidad sexual, aunque no se ha corroborado con certeza con la transmisión de este virus en particular sino con el VHB, un número considerable de pacientes infectados con el VHC presentan múltiples parejas sexuales (Tabla 2).

Factores de Riesgo

Pacientes con VHC	η	Factores de Riesgo							
		Transfusión	Cirugías	Tatuajes	Piercing	Proc. dentales	Drogas IV	Acupuntura	Promisc. sexual
Carga Viral (+)	120 (64%)	72 (60%)	83 (69%)	25 (21%)	3 (2.5%)	24 (20%)	10 (8%)	12 (10%)	31 (26%)
Tiempo exposición		26 ± 9 (2-43)	23 ± 12 (1-55)	16 ± 10 (1-34)	12 ± 5 (9-18)	15 ± 11 (1-40)	13 ± 11 (4-31)	9 ± 6 (3-24)	31 ± 10 (11-53)
Carga Viral (-)	68 (36%)	32 (47%)	53 (78%)	13 (19%)	6 (9%)	11 (16%)	6 (9%)	6 (9%)	20 (29%)
Tiempo exposición		25 ± 11 (1-43)	22 ± 11 (1-45)	17 ± 10 (4-34)	13 ± 12 (2-32)	10 ± 6 (2-23)	22 ± 13 (2-30)	9 ± 7 (1-19)	30 ± 13 (8-54)
Total	188 (100%)	104 (55%)	136 (72%)	38 (20%)	9 (5%)	35 (18%)	16 (8%)	18 (9%)	51 (27%)

Tabla 2. Factores de riesgo y tiempo de exposición en pacientes con VHC por carga viral positiva y carga viral no detectable, n = 188.

3.7. Factores de riesgo y tiempo de exposición al VHC por genotipo.

Para determinar cuáles son los factores de riesgo y el tiempo de exposición al virus de la hepatitis C, los 104 subgenotipos determinados se agruparon en los genotipos principales que se obtuvieron del presente trabajo estos son: el genotipo 1, genotipo 2 y genotipo 3, respectivamente.

El análisis de los factores de riesgo y su tiempo de exposición al virus por genotipo indica que no hay diferencias de un genotipo a otro en los factores de riesgo ni del tiempo de exposición, los principales factores de riesgo son las cirugías y las transfusiones, además de otros factores que se están asociando con la propagación del virus (Tabla 3).

Factores de Riesgo									
Genotipos	<i>n</i>	Transfusiones	Cirugías	Tatuajes	Piercing	Proc. dentales	Drogas IV	Acupuntura	Promisc. sexual
Genotipo 1	63 (60%)	41 (65%)	45 (71%)	12 (19%)	1 (1.6%)	16 (25%)	3 (4.8%)	9 (14%)	28 (44%)
Tiempo exposición		27 ± 8.9 (4 - 43)	25 ± 12.3 (1 - 55)	13 ± 10 (1 - 32)	4	15 ± 11 (1 - 40)	18 ± 16 (4 - 31)	8 ± 6.7 (3 - 24)	25 ± 20 (13 - 65)
Genotipo 2	27 (26%)	18 (67%)	20 (74%)	3 (11%)	1 (3.7%)	3 (11%)	2 (7%)	2 (7%)	10 (37%)
Tiempo exposición		26 ± 8.6 (7 - 41)	21 ± 14 (3 - 43)	20 ± 11 (13 - 33)	18	11 ± 2 (9 - 13)	20	12	33 ± 5.5 (27 - 42)
Genotipo 3	14 (14%)	7 (50%)	10 (71%)	4 (28%)	0	2 (14%)	2 (14%)	0	3 (21%)
Tiempo exposición		25 ± 8 (11 - 32)	22 ± 11 (3 - 39)	18 ± 4 (12 - 21)	0	14 ± 16 (3 - 26)	7 ± 4 (4 - 10)	0	16 ± 15 (19 - 30)

Tabla 3. Factores de riesgo y tiempo de exposición en pacientes con VHC por genotipo. n = 104.

9.8. Correlación de genotipos con IMC, consumo de drogas y el tiempo de exposición.

Al analizar los pacientes con genotipos 1, 2 y 3, los cuales se agruparon para un mejor abordaje, con su índice de masa corporal (IMC) observamos que no hay diferencias, entre los tres genotipos ya que manejan IMC similares de 26 kg/m², 27 kg/m² y 28 kg/m², encontrándose entre sobrepeso y obesidad; sin embargo si se presentan diferencias en la cantidad del consumo de alcohol, de drogas y el tiempo de exposición al mismo.

Los pacientes con genotipo 1 consumen en menor medida tanto alcohol como drogas, 24% y 17% respectivamente, pero el tiempo de exposición a este consumo es mayor con 25 años en promedio para el consumo de alcohol y 18 años para el consumo de drogas. Por el contrario los pacientes con genotipo 3 el 36% de ellos consumen alcohol con 16 años de exposición en promedio y el 28% utilizan drogas con tan solo 8 años y el grado de daño hepático es el mismo en los pacientes con genotipos 1 y 3. Los pacientes con genotipo 2 se encuentran en una posición intermedia con relación a los otros genotipos antes mencionados en el consumo de dichas drogas, sin embargo no se encontró diferencia estadística al comparar los genotipos y el consumo de las drogas mencionadas (Tabla 4).

Genotipo	<i>II</i> (%)	IMC	Alcohol	Tiem. Expo	Drogas	Tiem. Expo
1	63(60)	27 ± 5.14 (19-46)	15(24%)	25 ± 18 (2-60)	11(17%)	18 ± 10 (4-31)
2	27(26)	26 ± 4.28 (19-46)	4(15%)	24	2(7%)	18 ± 3 (15-20)
3	14(13)	28 ± 6.20 (21-42)	5(36%)	16 ± 5 (10-21)	4(28%)	8 ± 3 (4-10)
Total	104(100)	27 ± 5.06 (17-46)	24(23%)	15 ± 9 (2-60)	17(16%)	15 ± 9 (4-31)

Tabla 4. Correlación de genotipos con IMC, consumo de drogas y tiempo de exposición, no se encontró diferencia estadística por genotipo y consumo de drogas.

9.9. Correlación de carga viral positiva e indetectable de VHC y daño hepático.

De los 188 pacientes que se incluyeron en el presente trabajo a 69 (37%) de ellos fue posible realizar la elastografía de transición (FibroScan), de los cuales 40 (58%) presentan carga viral positiva y 29 (42%) carga viral indetectable.

El análisis de los pacientes por carga viral, al compararlo con el grado de daño hepático, el cual está medido por elastografía de transición da como resultado que los pacientes positivos a la infección del virus están principalmente en estadio F4 lo que indica que un 45% de los pacientes infectados con VHC tienen cirrosis; en contraste los pacientes que fueron carga viral indetectable se encuentran en estadio F1 de daño hepático lo que sugiere que un 59% están en una etapa inicial de daño hepático a pesar de ser carga viral indetectable. Se tiene un 25% de pacientes de ambos grupos que se encuentran en etapa intermedia de daño hepático, con posible evolución a la cirrosis (Figura 13).

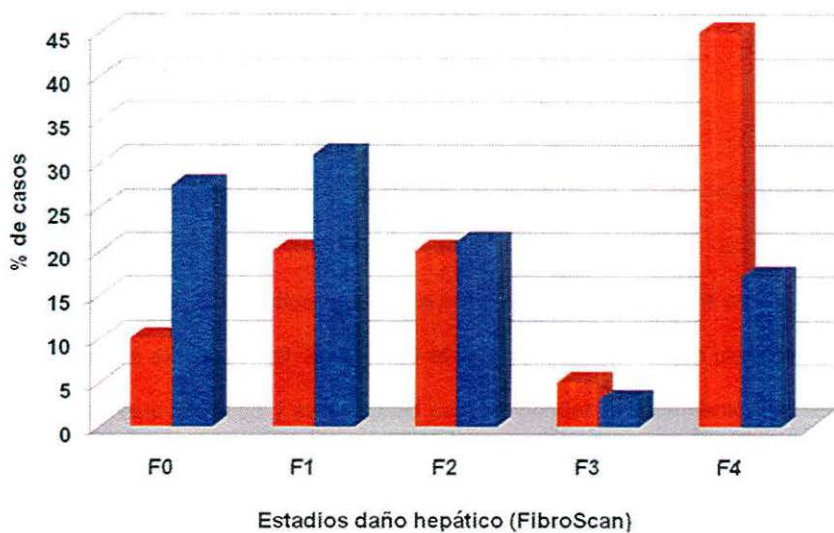


Figura 13. Correlación del grado de daño hepático y cargas virales de VHC. ■ carga viral positiva, n = 40
 ■ carga viral negativa, n = 29.

9.10. Análisis del daño hepático y tiempo de exposición al VHC por genotipo.

De los 104 pacientes que se les determinó el genotipo del VHC a 37 (35%) también se les realizó el estudio del FibroScan, además de los ya diagnosticados con cirrosis nos da un total de 48 pacientes con genotipo y FibroScan; se observó que los pacientes con el genotipo 1, 62% se encuentran en estadio F4 o cirrosis, con un tiempo de exposición al virus de 30 años en promedio, lo que muestra la agresividad de este genotipo y su dificultad para responder al tratamiento lo cual ya se ha descrito.

De los pacientes con genotipo 2, 45% se encontraron en estadio inicial de daño hepático con un F1 de FibroScan y un tiempo de exposición de 12 años en promedio; mientras que los pacientes con el genotipo 3 están en estadio F4 de daño hepático, también con una frecuencia de 62% y con 32 años de exposición a la infección viral. Estos dos últimos genotipos son menos agresivos pero los resultados indican que el genotipo 3 está afectando a los pacientes de igual manera que el genotipo 1 (Tabla 5).

Genotipos	η	F1	F2	F3	F4	Cirrosis DX
Genotipo 1	29 (60%)	4 (14%)	6 (21%)	1(3%)	12 (41%)	6(21%)
Tiempo exposición		36 \pm 7 (28 – 44)	29 \pm 4 (23 – 34)	26	31 \pm 8 (9 – 42)	30 \pm 2 (27-32)
Genotipo 2	11 (23%)	5 (45%)	0	1(9%)	4 (36%)	1(9%)
Tiempo exposición		12.4 \pm 10.9 (4 – 31)	0	31	32 \pm 2 (30 – 35)	30
Genotipo 3	8 (17%)	1 (12%)	2 (25%)	0	1 (12%)	4(50%)
Tiempo exposición		20	30 \pm 2 (29 – 32)	0	8	32 \pm 1 (32-34)

Tabla 5. Daño hepático (FibroScan) y tiempo de exposición en pacientes con VHC por genotipo. n = 48.

10. DISCUSIÓN

Las características clínicas y sociodemográficas de la población de estudio permiten identificar la frecuencia de los pacientes infectados con el VHC y la etapa actual en la que se encuentran con respecto a la viremia. El número de pacientes que se incluyen en el presente estudio es mayor a otros antes realizados en la población del Occidente de México,^{29,43} esto ha permitido valorar ampliamente la actividad viral actual y la respuesta del paciente a la infección, además de plantear el panorama infeccioso que afecta a la población y las consecuencias que puedan presentarse con la propagación del virus. Los pacientes con carga viral persistente representan un número importante comparado con estudios realizados en población mexicana donde registran un 50% de infectados con VHC con viremia activa,³⁴ lo que indica que en la actualidad no se ha logrado controlar la transmisión del VHC; por el contrario está aumentando el número de infectados, además es sumamente interesante e importante descubrir y describir que los pacientes que presentan carga viral no detectable en estudios moleculares, además de que están expuestos a los mismos factores de riesgo y el mismo tiempo de exposición al VHC, estos pacientes están desarrollando daño hepático, lo cual indica que independientemente del resultado de las cargas virales el VHC daña el hígado de todos los pacientes infectados.

Los resultados de laboratorio analizados muestran que los pacientes infectados con VHC poseen lípidos y enzimas hepáticas alteradas relacionadas con la carga viral que presentan, característica ya antes reportada en la literatura donde describen una elevación de enzimas hepáticas en pacientes con carga viral

positiva, por el contrario lípidos elevados en pacientes con carga viral no detectable, las enzimas hepáticas elevadas se han asociado con la resolución de la infección viral,⁴⁴ en nuestra población no se ha analizado la resolución de la enfermedad asociada al nivel de lípidos, sin embargo los pacientes estudiados siguen el mismo patrón de comportamiento y se suman a lo descrito. Es importante realizar éstos estudios en lo sucesivo para corroborar los resultados obtenidos al respecto en la población del Occidente de México y obtener respuestas a esta controversial situación, si los lípidos elevados favorecen o no a los pacientes infectados con VHC.

El presente trabajo ha permitido identificar nuevos factores de riesgo que están surgiendo en la actualidad y que contribuyen en la transmisión del VHC, lo que permite ubicarnos en la situación actual y el aspecto evolutivo de la infección viral. La descripción biológica del VHC y la dirección que está tomando con relación al número de infectados y los medios que utiliza para propagarse en la población es de vital importancia ya que es el punto de partida para tomar medidas de prevención y establecer estrategias para contrarrestar los efectos del virus.

Podemos observar que el genotipo 1a sigue predominando desde el primer estudio realizado en la población del Occidente de México en 1998,²⁹ sin embargo, se presentan cambios en los demás genotipos de VHC. Al comparar los resultados obtenidos de la prevalencia de los genotipos de VHC del presente estudio con los antes realizados en el Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" y en la población del Occidente de México;^{29, 43} indican que en un periodo de catorce años han cambiado los genotipos de VHC y su prevalencia en la población de

estudio. Por lo que nos encontramos en una etapa activa de transición epidemiológica que presenta el virus y sus genotipos, se especula que esto se debe a los nuevos factores de riesgo que están presentes en los pacientes infectados con VHC relacionados con el aumento en el consumo de drogas. Por lo que podemos observar, el comportamiento evolutivo del virus se encuentra en una etapa activa lo que podría conducir a brotes epidemiológicos de la infección viral en la población y por lo tanto a un incremento en el número de infectados sin posibilidad a tratamiento por los costos elevados del mismo.

La biología molecular ha permitido llegar hasta éste punto de conocimiento donde podemos evaluar la actividad viral actual del VHC y de cualquier otro virus o agente patógeno infeccioso que afecta a la humanidad. El abordaje del aspecto biológico del virus de la hepatitis C permite visualizar la actividad infecciosa que está desarrollando y en la medida en que afecta a la población, además del panorama evolutivo que presenta el virus y los posibles efectos que puedan surgir en nuestra población.

Los niveles de la carga viral son utilizados para indicar tratamiento y tiempo de consumo del mismo, la mayoría de los pacientes infectados del presente estudio manejan carga viral elevada por arriba de las 100,000 UI/mL, por lo tanto todos los pacientes requieren tratamiento antiviral y en algunos casos en calidad de urgencia. La correlación de los genotipos y sus cargas virales no es muy frecuente en estudios realizados sobre el VHC y sus genotipos, lo cual es importante por sí mismo. En el presente estudio se obtuvo que el genotipo 2 maneja las cargas virales más elevadas con diferencia significativa en relación al genotipo 3, estos

resultados coinciden con lo descrito por Márquez-Rosales y colaboradores en población mexicana,³⁸ sin embargo difieren de lo descrito por Burguete y colaboradores.⁴⁵ Ellos describen que el genotipo 1 posee las cargas virales elevadas con relación a los demás genotipos del VHC también en población mexicana, lo cual es sumamente importante discernir los factores que ocasionan la discrepancia con el último trabajo descrito, por lo que es necesario analizar los resultados obtenidos a detalle para identificar el porqué de las diferencias encontradas.

El genotipo 1 se considera más agresivo por no responder al tratamiento antiviral y se esperaría que sus cargas virales fueran elevadas, por el contrario los genotipos 2 y 3 responden de manera adecuada al tratamiento antiviral, se esperaría que manejaran cargas virales bajas, sin embargo se encontró lo opuesto, genotipo 1 con cargas virales intermedias, genotipo 2 carga viral superior a los demás genotipos, y el genotipo 3 presenta las cargas virales más bajas; se sugiere que pueda deberse al tiempo de exposición a la infección viral o incluso al cambio evolutivo que está presentando el VHC y por consiguiente sus genotipos.

Se analizaron los factores de riesgo y el tiempo de exposición al VHC asociado a los pacientes con carga viral positiva y carga viral indetectable resultando ser los mismos, y el mismo tiempo de exposición para ambos grupos de pacientes, estos han sido descritos desde un periodo de tiempo considerable y siguen presentes hasta este momento, lo cual indica que la propagación de la infección no se ha logrado controlar, además en la actualidad están surgiendo nuevos factores de riesgo y de igual manera afectan a ambos grupos de pacientes y en un tiempo de

exposición al virus similar. Esto podría deberse al manejo inadecuado de las instituciones de salud en el control de calidad de las donaciones de sangre y sus derivados, la higiene inapropiada del equipo de trabajo en las salas quirúrgicas de los hospitales, así como el surgimiento de nuevas tendencias por los tatuajes y los piercing en población principalmente joven, además de la promiscuidad sexual en la población en general. Si visualizamos los efectos que se están presentando con el incremento en los factores de riesgo, en un periodo de tiempo no muy prolongado estaremos presenciando un aumento considerable en el número de personas infectadas con el VHC y cada vez más jóvenes.

Se analizan los factores de riesgo ahora por genotipo, se observó que los pacientes con genotipo 1 los factores de riesgo que presenta son los ya conocidos, sin embargo los pacientes con los genotipos 2 y 3 son afectados por los nuevos factores de riesgo, principalmente por las tendencias en los tatuajes y otras actividades relacionadas con el uso de agujas, el incremento acelerado en el consumo de drogas al igual que el alcohol y una actividad sexual inadecuada. En los últimos años el consumo de drogas se ha incrementado considerablemente en la población y el presente estudio evidencia que ese consumo ya está ocasionando efectos adversos, estas drogas contribuyen a la propagación del VHC principalmente de los genotipos 2 y 3; es por esta razón que se están incrementando estos genotipos en la población de estudio.^{29, 36}

Hoy en día es posible determinar los resultados que pueden estar ocasionando la infección del VHC y los factores asociados a la misma. Un ejemplo claro de ello es el grado de daño hepático encontrado en los pacientes con carga viral positiva los

cuales manejan los rangos más elevados, además no se esperaría observar a un paciente con carga viral indetectable por estudios moleculares y que presente daño hepático, sin embargo en el presente trabajo se evidencia que también éstos pacientes lo presentan, lo que indica que es necesario darles seguimiento a pesar de tener con diagnóstico molecular negativo a la actividad del VHC. Esto fue posible evidenciar con la aplicación del estudio de imagen (FibroScan), que muestra el grado de daño hepático que presentan los pacientes infectados con VHC en diferentes etapas, además permite detectar pacientes en etapas tempranas de fibrosis, de esta manera es posible determinar el seguimiento adecuado para mejorar la calidad de vida del paciente infectado.

Al analizar el daño hepático que poseen los pacientes con VHC basados en los diferentes genotipos, observamos un daño hepático considerable, esto es, hasta el grado de cirrosis en pacientes con genotipos 1 y 3. Si consideramos el hecho de que el genotipo 1 es el de mayor prevalencia y el que no responde al tratamiento lo cual coincide con el daño hepático que ocasiona, sin embargo el genotipo 3 se describió en este trabajo con un incremento en su número y asociado al consumo de drogas, esta podría ser la razón por la cual esté ocasionando daño hepático a los pacientes de manera significativa. En la población del Occidente de México, incluso en todo México no se ha realizado la correlación del daño hepático por genotipo por medio del equipo FibroScan lo cual es algo nuevo y novedoso, el obtener los resultados anteriores es de gran importancia puesto que permite evaluar la actividad viral a detalle e identificar el grado de daño hepático ocasionado por el VHC y los genotipos de forma particular.

El aspecto biológico de los agentes infecciosos, su asociación con la vida humana y su entorno, hoy por hoy se consideran de vital relevancia ya que han tomado auge en los últimos años y la biología se está abriendo camino en todos y cada uno de los aspectos que envuelven a la humanidad; el presente trabajo no es la excepción, ya que la contribución que ha tenido la parte biológica ha permitido describir la prevalencia de la infección, la situación actual de los genotipos y subgenotipos del VHC además de la actividad viral y la etapa evolutiva en la que se encuentra el virus, permitió identificar los factores de riesgo asociados a la transmisión del virus que se suman al panorama situacional de los pacientes infectados con el VHC en la población del Occidente de México.

11. CONCLUSIONES

- El número de pacientes infectados con VHC en la población del Occidente de México incluidos en el presente estudio indica que un porcentaje considerable de estos pacientes presentan actividad viral activa, por lo tanto la infección viral no se ha logrado controlar sino que por el contrario va en aumento.
- El genotipo del VHC predominante sigue siendo el 1a, sin embargo el VHC está pasando por una etapa de transición epidemiológica donde el genotipo 2b disminuye y los genotipos 2 y 3 van en aumento debido posiblemente a los factores de riesgo.
- El genotipo que presenta las cargas virales más elevadas es el genotipo 2, seguido del genotipo 1; el genotipo 3 maneja cargas virales menores. Esta correlación de carga viral por genotipo no es frecuente encontrarla en estudios realizados sobre el VHC y nos proporciona un panorama nuevo que permitirá abordar al paciente de una manera personalizada con respecto al genotipo que posea.
- Se están incrementando los factores de riesgo para la transmisión de VHC, registrándose un incremento en el consumo de alcohol y drogas, además de tatuajes, piercing, procedimientos dentales inadecuados, acupuntura y promiscuidad sexual.

- El daño hepático ocasionado por el virus se hace presente en pacientes positivos a la carga viral, por los resultados descritos podemos especular que no hay diferencia del daño hepático que ocasiona el genotipo 1 y el genotipo 3; además se encontró daño hepático en aquellos pacientes con carga viral indetectable, por lo tanto ambos grupos de pacientes deben ser tratados.
- El genotipo viral está asociado con la persistencia del virus y su progresión a daño hepático independientemente de los rangos de las cargas virales.
- El presente estudio permitirá tomar conciencia del comportamiento evolutivo actual del VHC, considerando la necesidad de realizar nuevos estudios epidemiológicos moleculares para determinar los posibles efectos que se puedan presentar en la población infectada.

12. REFERENCIAS

1. Purcell R. 2007. The hepatitis C virus: overview. *Hepatology*. 26 (1):11-4.
2. Harvery JA. 2009. Back to the future: A Backward Glance at the forward progress of Hepatitis Virus Research. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 803-806.
3. Ulrich PP, Romeo JM, Lane PK, Kelly I, Lynton JD, Vyas GN. 1990. Detection, semiquantitation, and genetic variation in Hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase. *The American Society for Clinical Investigation*. 86:1609-1614.
4. Colina R, Mogdasy MC, Juan C, Uriarte MR. 2002. Caracterización molecular del virus de la hepatitis C en Montevideo-Uruguay. *Revista Médica de Uruguay*. 18(1):76-82.
5. Poma PA. Hepatitis viral C. 2011. *Anales de la Facultad de Medicina*. 72(4):277-90.
6. Colquillo Aysallanque B, Sanchez Montaña R, Terceros Almanza P. 2009. Nuevas estrategias para el diagnóstico y seguimiento de la Hepatitis C. Evaluación de las Técnicas de laboratorio RT-PCR y EIA. *BIOFARBO* 17(2):15-22.
7. Torres-Speziale AM. 2003. Hepatitis C. Historia natural y estado actual de su manejo. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 50(4):179-189.
8. Vázquez-Flores JA, Valiente-Banuet L, Martín y López RA, Sánchez-Guerrero SA. 2006. La seguridad de las reservas sanguíneas en la República Mexicana durante los años 1999 a 2003. *Revista de Investigación Clínica*. 58(2):101-108.
9. Falcón V, Dueñas S, Menéndez I, De la Rosa MC, Morales J, Á Silva J, Acosta EF, Álvarez F, Seoane J, Cinza Z, China G, Gavidondo JV, Fernández C, Casillas D, Muzio V, Pentón E, Nodarse H, Álvarez-Lajonchere L, Martínez G, Guerra I, González E, Arús E, Vidal E, Hernández JC, Shibayama M, Torres E, Luna-Muñoz J, Miranda-Sánchez M, Kouri J, Tsutsumi V, Guillén G. 2008. Aportes al estudio de los mecanismos patogénicos del VHC y sus implicaciones en la comprensión de la enfermedad. *Biotechnología Aplicada*. 25(4):378-380.

10. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 194:1395-406.
11. Quiroga JA, Liorente S, Castillo I, Rodriguez-Inigo E. 2006. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. *Journal of Virology*. 80:10972-9.
12. Valkova M. 2002. Hepatic fibrogenesis. *Bratislava Medica Journal*. 103:76-85.
13. Friedman SL. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *The Journal Biological Chemistry*. 275:2247-50.
14. Bota S, Sirli R, Sporea I, Focsa M, Popescu A, Danila M, Strain M, Sendroiu M, Deleanu A, Dan I. 2011. A new scoring system for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatitis Monthly*. 11(7):548-555.
15. Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrmann E, Dries V, Samaras P, Zeuzem S, Sarrazin C. 2007. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am Journal of Roentgenol*. 188:758-764.
16. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW. 1974. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet*. 241-6.
17. Choo QL, Kuo G, Weiner Amy J, Overby Lacy R, Bradley Daniel W, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non A, Non B Viral Hepatitis Genoma. *Science*, 244:359-361.
18. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*, 5a. edición. Philadelphia, E.U.A.: Lippincott-Raven Publishers. 1101-1152.
19. Simmonds P. 2001. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *Journal of General Virology*. 82: 693-712.
20. Navarro-Ortega D, Jiménez-Mayordomo M, Martínez-Aparicio MD. 2007. Métodos moleculares para la determinación del genotipo del virus de la hepatitis C. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 25:66-71.

21. Simmonds P, Bukh J, Comb C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfos P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy D, Okamoto H, Pawlotsky J, Denin F, Sablon E, Shin-I T, S tuyver L, Thiel H, Viazov S, Weiner A, Widell A. 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 42(4):962-73.
22. Arias YR, Echeverry SJ, Castro MA, Rios MF, Martínez O. 2010. Frecuencia de genotipos y subtipos de virus de la hepatitis C en pacientes colombianos con infección crónica. *Revista Medica Sanitas* 13(3):10-19.
23. Tokita H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Vareesangthip K, Chainuvati T, Lizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi H. 1995. Hepatitis C virus variants from Thailand clasificable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *Journal of General Virology*. 76 (9):2329-2335.
24. Pawlotsky, JM. 2003. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implication. *Clinic. Liver Diseases*. 7:45-66.
25. Verbeek, J, Maes P, Wollants E, Van der Merwe, S, Song, E, Nevens F, Van Ranst, M. 2005. Use of commercially available line probe assay for genotyping of hepatitis C virus 5a strains. *Journal of Clinic Microbiology*. 43:6117-6119.
26. De la Hoz F. 2000. Epidemiología de la hepatitis C en Latinoamérica y Colombia. *Biomédica*. 20:66-72.
27. Chiquete Anaya E, Sánchez Orozco LV, Panduro A. 2005. Virus de la Hepatitis C. *Investigación en Salud*. Guadalajara, México. 19-25.
28. Romero Gómez M, Lacalle Remigio JR. 2006. Tratamiento de la hepatitis crónica C por genotipos 2 y 3: revisión sistemática. *Gastroenterology Hepatology*. 29(2):139-45.
29. Rivas-Estilla AM. 1998. Identification of hepatitis C virus (HCV) genotypes in infected patients from the west of Mexico. *Hepatology Research*. 12:121-130.
30. Touzet S, Kraemer L, Colin C, Pradat P. 2000. Epidemiology of hepatitis C virus infection in seven European Union countries: a critical analysis of the literature. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 12(6).

31. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
32. Fundación Mexicana para la Salud Hepática. 2011. La hepatitis C como un problema de salud pública en México. *México*. 53(1):61-67.
33. Mauss S, Thomas B, Juergen R, Sarrazin S, Wedemeyer H. 2009. *Hepatology, A clinical textbook*. Flying Publisher. 501 páginas.
34. Panduro A, Escobedo-Meléndez G, Fierro NA, Ruiz-Madrigal B, Zepeda-Carrillo EA, Román S. 2011. Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud Pública México*. 53(1):7-45.
35. Pawlotsky JM. 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 36:65-73.
36. Vera De León L. 2005. Panorama epidemiológico y situacional de la hepatitis C en México. *Gastroenterology México*. 70(1).
37. Dávalos Moscol M. 2009. Epidemiología de la Infección por el Virus de la Hepatitis C en el Perú y Latinoamérica. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 29(4): 347-354.
38. Márquez-Rosales MG, Santoscoy-Tovar FA, Montoya-Fuentes H. 2008. Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 55(2):79-87.
39. Valdespino JL, Conde-González CJ, Olaiz-Fernández G, Palma O, Kershenovich D, Sepúlveda J. 2007. Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿Un problema de salud pública emergente? *Salud pública México*. 49(3):395-403.
40. Gómez-Cordero I, Álvarez-García M. 2003. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. *Biomedicina*. 14:253-268.
41. Cobas® AmpliPrep/COBAS® Taqman® HCV tests Handbook. Directive Europea 98/79 CE. Doc. Rev. 9.0.
42. QIAamp® Viral RNA Mini Kit Handbook. 2010. Sample & Assay Technologies. QIAGEN®
43. Panduro A, Román S, Khan A, Tanaka Y, Kurbanov F, Martínez-López E, Campollo O, Hernández-Nazara Z, Mizokami M. 2010. Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes en West México. *Virus Research*. 151:19-25.

44. Economun M, Milionis H, Filis S. 2008. Baseline cholesterol is associated with the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterology Hepatology*. 23:586-91.
45. Burguete-García AI, Conde-González CJ, Jiménez-Méndez R, Juárez-Díaz Y, Meda-Monzón E, Torres-Poveda K, Madrid-Marina V. 2011. Hepatitis C seroprevalence and correlation between viral load and viral genotype among primary care clients in Mexico. *Salud Pública México*. 53(1):7-12.
46. Kershenovich D, Razavi HA, Sánchez-Ávila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, González FL, Quiroz JF, Rodríguez-Pérez F, Barbosa Rosado CW, Negro F, Silva M. 2011. Trends and projection of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver International*. 1478-3223.
47. Juan C. 2005. Variabilidad genética del virus de la hepatitis C. Su impacto en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad. *Biomedicina*. 1(1):25-27.
48. Conde González C, Torres-Poveda K, Madrid-Marina V. 2011. Presentación hepatitis virales. *Salud Pública de México*. 53(1):4-6.
49. Chimeno MM, Chocarro A, Brezmes P, Ochoa C, Pérez J. 2002. Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en la población general. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 20(2):64-7.
50. Maclovía Vázquez VD, Román Maldonado SM, Vázquez Castellanos JL, Panduro A. 2005. Predisposición genética y virus de la hepatitis C crónica. *Investigación en salud*. Guadalajara México. 8: 26-32.
51. Octavio Campollo MC, Valencia-Salinas JJ, Berumen-Arellano A, Pérez-Aranda MA, Panduro A, Segura-Ortega J. 1997. Características epidemiológicas de la cirrosis hepática en el Hospital Civil de Guadalajara. *Salud pública de México*. 39(3):195-200.
52. Pinto Valdivia JL, Vidal Escudero J, Bussalleu A, Huerta Mercado TJ, Ramírez Vergara D, Valdivia RJ, De los Ríos S. 2003. Infección por virus de la hepatitis C en donantes de banco de sangre en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (1998-2002). *Revista de Gastroenterología del Perú*. 23:22-28.

53. Touceda S, Pereira M, Angulla A. 2002. Prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis C en el área de El Ferrol (La Coruña). *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 20(5):200-4.
54. Halabe Cherem J, Angulo Varguez F. 2000. Hepatitis C. *Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México*. 43(3):90-100.
55. Díaz de León Fernández del Castro F, Santos Coy Rosas E, Millan Narvaez VD, Pérez Corzo HJ, Torre Navarrete CA. 2003. La hepatitis C. *Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México*. 46(5):202-204.
56. Rubio I, Combita AL, Ortiz-Reyes B, Navas mc. 2005. Producción y purificación de la proteína core del virus de la hepatitis C. *Biomédica* 25:34-45.
57. Findor JA, Sorda JA, Daruich J, Bruch Igartua E, Manero E, Avagnina A, Benbassat D, Rey J, Nakatsuno M. 1999. Distribución de los genotipos del Virus de la Hepatitis C en una población Argentina de drogadictos endovenosos. *Medina (Buenos Aires)* 59:49-54.
58. Waqar A, Bushra I, Sana G, Sultan A, Saba K, Shah J, Muhammad TS, Humera K, Aleena S, Imran S, Sajida H. 2011. A brief review on molecular, genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation. *Virology Journal*. 8(53):2-16.
59. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Caste´ra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, De Le´dinghen V. 2006. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 55:403-408.
60. Sporea I, Şirli R, Deleanu A, Tudora A, Popescu A, Curescu M, Bota S. 2010. Liver stiffness measurements in patients with HBV vs HCV chronic hepatitis: A comparative study *World Journal of Gastroenterology*. 16(38):4832-4837.

61. Keyur P, Friedrich-Rust M, Lurie Y, Grigorescu M, Stanciu C, Chuan-Mo L, Schiff ER, Häussinger D, Manns MP, Gerken G, Colle I, Torbenson M, Pulkstenis E, Subramanian GM, McHutchison JG, Zeuzem S. 2011. FibroSURE™ and FibroScan® in relation to treatment response in chronic hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology*. 17(41):4581-4589.
62. Asensio del Barrio C, Polo de Santos MM, Luengo Matos S, Sanchez Gomez LM, Alcazar Alcazar R. 2009. Elastografía de Transición (FibroScan) en el Diagnóstico de Fibrosis Hepática: Revisión Sistemática y Meta-Análisis. Informe Público de Evaluación de Tecnologías Sanitarias IPE 09/59. 113 páginas.
63. Gutiérrez Reyes G, Kershenobich D. 2008. Inmunopatogénesis de la hepatitis C. *Medicina Universitaria*. 10(41):225-9
64. Trapero M, García-Buey L, Muñoz C, Vitón M, Moreno-Monteagudo JA, Borque MJ, Quintana JE, Moreno-Otero R. 2005. La respuesta inmune T1 inducida durante el tratamiento con PEG-IFN más ribavirina controla la replicación viral en pacientes con hepatitis crónica C. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 97(7): 481-490.
65. Borrás-Cuesta FP, Sarobe, JJ, Lasarte M, García-Granero J, Golvano JP. 1998. Estudio de la respuesta inmune en la infección por el virus de la hepatitis C. *Anales del Sistema de San Navarra*. 21(3):21-31.
66. Barboza L, Marten ML, Salme S, Peterson DL, Montes H, Berrueta L. 2008. Déficit en señales de activación y coestimulación en linfocitos T CD4+ de pacientes infectados con el virus de la hepatitis C. *Investigación Clínica*. 49(3):353-367.
67. Maroto Vela MC, García García F. Variabilidad genética del virus de la Hepatitis C. Departamento y Servicio de Microbiología. Facultad de Medicina y Hospital Universitario San Cecilio. Granada. 1-8.

68. Ramos de Andrade D, Ramos de Andrade D. 2004. The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 46(3):119-126.
69. Vicente-Rodríguez JC, Junquera-Gutiérrez LM, López-Arranz JS. 2003. Infección por el virus de la hepatitis C y riesgo de transmisión en cirugía oral. *Reverside Country of Education*. 8(3):317-324.
70. Idrovo CV. 2006. Aproximación terapéutica a la hepatitis por virus C. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 21(1):30-34.
71. Ruiz RD, Bisaro LB, German JC, Grutadauria S. 2010. Distribución de genotipos de hepatitis C en la ciudad de Córdoba, Argentina *Revista de Gastroenterología de México*. 3(75):287-292.
72. Barba Evia JR. 2008. La hepatitis C y el laboratorio clínico. *Revista de México de Patología Clínica*. 55(4):187-200.
73. León-Buitimea A, Leija-Salas A, Garrido-Fariña G, Reyes-Esparza J, Rodríguez-Fragoso L. 2006. Tratamiento de la enfermedad hepática crónica inducida por el virus de la hepatitis C: bases moleculares y celulares. *Revista Biomedicina*. 17:195-211.
74. García-Valdecasas J, Bernal MC, García F, Cerezo S. 1996. Virus de la hepatitis C: estado actual. Avances y problemas en el diagnóstico. Transmisión en hemodiálisis. *Nefrología*. 16(2):128-137.
75. Cordeiro N, Taroco R, Chiparelli H. Virus de las hepatitis. *Temas de bacteriología y virología médica*. 477-513.
76. Jiménez Hernández N. 2005. Evolución del virus de la hepatitis C en muestras hospitalarias de la comunidad Valenciana. Departamento de Genética Evolutiva. Universidad de Valencia. 267 páginas.
77. Guyton AC, Hall JE. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Eleventh Edition. Elsevier Sanders. 1152 páginas.
78. Abbas AK, Lichtman AH, Pillar S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th Edition. Elsevier Sanders. 575 páginas.

79. Lewin B. 2004. Genes VIII. Pearson. Prentice Hall. 1006 páginas.
80. Kui L, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon CM, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Lemon SM. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3_4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. PNAS. 102(8).
81. Ndjomou J, Pybus OG, Bertfried M. 2003 Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. Journal of General Virology. 84:2333–2341.
82. Santos-López, Vallejo-Ruiz. 2010. El factor humano en el surgimiento y resurgimiento de infecciones virales. Investigación Clínica. 51(1):1–3.
83. Ayaz MM, David R. 2002. Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. Gretch Microbes and Infection 4: 1227–1236.
84. Moscol Dávalos M. 2009. Epidemiología de la Infección por el Virus de la Hepatitis C en el Perú y Latinoamérica Revista de Gastroenterología del Perú. 29(4):347-354.
85. Navarro Ortega D, Jiménez Mayordomoa M, Desamparados Martínez AM. 2007. Métodos moleculares para la determinación del genotipo del virus de la hepatitis C. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 25(3):66-71.
86. Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, Gritsun TS, Holmes EC, Gould EA, De Lamballerie X. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. Virology 36180–92.
87. Huarte MP. 2004. Casi Virología, pruebas diagnósticas, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHC. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 27 (2):41-50.
88. Vaishnavi R, Smita S. 2008. Patel single strand binding proteins increase the processivity of DNA unwinding by the Hepatitis C Virus helicase. Journal of Molecular Biology. 376(1):69–79.

89. Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *Journal of General Virology*. 85:3173–3188.

ANEXO

REACTIVOS PARA: COBAS® AmpliPrep/COBAS COBAS® TaqMan® VHC Test.

1. VHC CS1(cassette de reactivo de partículas magnéticas de vidrio para VHC)
 - Partículas magnéticas de vidrio para 48 determinaciones.
 - 93% de isopropanol.
2. VHC CS2 (cassette de reactivo de lisis para VHC)
 - Citrato de sodio dihidratado.
 - 42.5% de tiocinato de guanidina.
 - < 14% de polidocanol.
 - 0.9% de ditioneitol.
3. VHC CS3. Cassette multireactivo para VHC, que contiene:
 - Fase (Solución de proteínasa).
 - Tampón Tris.
 - < 0.05% de EDTA.
 - Cloruro de calcio.
 - Acetato de calcio.
 - ≤ 7.8% de proteínasa.
 - Glicerol.
 - EB (Tampón de elución).
 - Tampón Tris-base.
 - 0.2% de metilparabén.
4. VHC CS4. Cassette de reactivo específico para la prueba de VHC, que contiene:
 - VHC QS. (Patrón de determinación cuantitativa del VHC).
 - Tampón Tris.
 - EDTA.
 - < 0.002% de ARN Poli Ar (sintético).

- < 0.001% de un constructo de VHC del RNA anidado que contiene secuencias de unión al iniciador del VHC y una región exclusiva de unión a la sonda (RNA no infeccioso en el bacteriófago MS2).
- 0.05% de azida sódica.
- VHC MMX. (Mezcla maestra para VHC).
 - Tampón tricina.
 - Acetato potásico.
 - Hidróxido potásico.
 - < 0.004% de dATP, dCTP, uGTP y dUTP.
 - < 0.002% de iniciadores sentido y antisentido del VHC correspondientes a la región (UTR) 5' del VHC.
 - < 0.001% de sondas oligonucleótidas fluorescentes específicas del VHC y del patrón de determinación cuantitativa del VHC.
 - < 0.001% de aptámero oligonucleótido.
 - < 0.05% de ADN polimerasa Z05 (microbiana).
 - < 0.1% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasa)(microbiana).
 - < 0.09% de enzima sódica.
- CAP/CTM Mn²⁺ (Solución de manganeso para CAP/CYM).
 - < 0.5% de acetato de manganeso.
 - Ácido acético glacial.
 - 0.09% de azida sódica.
- VHC H (+) C (Control positivo alto del VHC).
 - < 0.001% de un constructo de VHC del ARN anidado que contiene secuencias del VHC (ARN no infeccioso en el bacteriófago MS2).
 - Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas de anticuerpos frente al VHC, VIH-1/2, antígeno p24 del VIH y HBsAg; ARN del VIH-1, ARN del VHC y ADN del VHB no

detectables mediante métodos de PCR 0.1% de conservante ProClin® 300.

- VHC L (+) C. (Control positivo bajo del VHC).
 - < 0.001% de un constructo de VHC del ARN anidado que contiene secuencias del VHC (ARN no infeccioso en el bacteriófago MS2).
 - Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas de anticuerpos frente al VHC, VIH-1/2, antígeno p24 del VIH y HBsAg; ARN del VIH-1, ARN del VHC y ADN del VHB no detectables mediante métodos de PCR 0.1% de conservante ProClin® 300.
- CTM (-) C. [Control negativo para COBAS® TaqMan® (plasma humano)].
 - Plasma humano negativo, no reactivo según pruebas de anticuerpos frente al VHC, VIH-1/2, antígeno p24 del VIH y HBsAg; ARN del VIH-1, ARN del VHC y ADN del VHB no detectables mediante métodos de PCR 0.1% de conservante ProClin® 300.
- VHC H (+) C.Clip.
 - Clip del código de barras para control positivo alto del VHC.
- VHC L (+) C Clip.
 - Clip del código de barras para control positivo bajo del VHC.
- VHC (-) C Clip.
 - Clip del código de barras para control negativo del VHC.
- COBAS® AmpliPrep/COBAS COBAS® TaqMan® Wash Reagent. (Reactivo de lavado).
 - Citrato de sodio dihidratado.
 - < 0.1% de N- metilisotiazolona-HCL.