



**Universidad de Granada  
Facultad de Medicina  
Departamento de Microbiología**

**Detección del Antígeno Core del Virus de la Hepatitis C. Utilidad en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento de la infección**

**Constanza Fornieles González  
Granada 2006**



D<sup>a</sup> MARIA DEL CARMEN BERNAL ZAMORA, PROFESOR TITULAR DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D<sup>a</sup> Constanza Fornieles González sobre el tema “Detección del Antígeno Core del Virus de la Hepatitis C. Utilidad en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento de la infección” ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 22 de Febrero de 2006

Fdo. Dña Maria del Carmen Bernal Zamora

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two eagles with spread wings. The shield is supported by two columns. The Latin text "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO" is visible at the top, and "SEMPER AVGVSTVS" is at the bottom.


D. JUAN GARCIA-VALDECASAS VALVERDE, PROFESOR ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D<sup>a</sup> Constanza Fornieles González sobre el tema “Detección del Antígeno Core del Virus de la Hepatitis C. Utilidad en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento de la infección” ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 22 de Febrero de 2006

Fdo. D. Juan García-Valdecasas Valverde

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with various heraldic symbols, including a crown on top. The shield is flanked by two eagles with spread wings. The entire emblem is surrounded by a circular border containing Latin text: "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO I" at the top and "SEM PER AVG HEB" at the bottom.

D. FEDERICO GARCIA GARCIA, PROFESOR ASOCIADO DE MICROBIOLOGIA DE LA ESCUELA UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal D<sup>a</sup>. Constanza Fornieles González sobre el tema "Detección del Antígeno Core del Virus de la Hepatitis C. Utilidad en el diagnóstico y en la monitorización del tratamiento de la infección" ha sido realizada bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica y científica de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 22 de Febrero de 2006

Fdo. D. Federico García García

# INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes históricos.....	2
1.2 Características virológicas.....	4
1.2.1 Genoma.....	4
1.2.2 Proteínas del VHC.....	6
1.2.3 Cápside.....	8
1.2.4 Envoltura.....	8
1.2.5 Variabilidad genética.....	9
1.2.6 Ciclo de replicación.....	12
1.3 Patogenia e historia natural de la infección.....	13
1.4 Cuadros clínicos.....	15
1.4.1 Infección aguda.....	15
1.4.2 Infección crónica.....	17
1.4.3 Infección por VHC y carcinoma hepatocelular.....	19
1.4.4 Infección resuelta.....	20
1.4.5 Manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHC.....	20
1.5. Diagnóstico de laboratorio.....	21
1.5.1 Detección de anticuerpos específicos.....	21
a. Métodos de cribado.....	21
b. Métodos suplementarios (inmunoblot).....	22
1.5.2 Detección de anticuerpos IgM.....	23
1.5.3 Detección directa del VHC.....	23
a. Métodos de detección y cuantificación del genoma.....	23
b. Métodos de genotipado.....	25
c. Métodos de detección y cuantificación de antígenos .....	25
1.6. Epidemiología.....	29
1.6.1 Transmisión del VHC.....	29
1.6.2 Prevalencia del VHC.....	30
1.6.3 Prevalencia de genotipos.....	32
1.7. Tratamiento.....	33
2. OBJETIVOS.....	39
3. PACIENTES Y MÉTODOS.....	40
3. 1 PACIENTES.....	41
3. 2 MÉTODOS.....	42
3.2.1 Detección de Antígeno de la cápside de VHC (VHC-Ag).....	42
3.2.2 Detección de Anticuerpos de tipo IgG.....	45
3.2.3 Detección de Anticuerpos diferenciados frente a diversos antígenos.....	47

3.2.4 Detección de Anticuerpos de tipo IgM.....	48
3.2.5 Detección del ARN-VHC.....	49
3.2.5. 1 Detección del ARN Cualitativo.....	55
3.2.5. 2 Detección de la carga vírica VHC.....	57
3.2.6 Detección de genotipo VHC.....	60
4. RESULTADOS.....	64
4.1 Validación técnica.....	65
4.2 Pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis periódica.....	69
4.2.1 Pacientes positivos para VHC-Ac.....	72
4.2.2 Pacientes negativos para VHC-Ac.....	78
4.3 Pacientes coinfectados por VHC/VHI.....	78
4.4 Pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferon o interferon-ribavirina.....	83
4.5 Pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferon pegilado-ribavirina.....	92
5. DISCUSIÓN.....	101
5.1 Validación técnica.....	102
5.2 Pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis periódica.....	107
5.3 Pacientes coinfectados por VHC/VHI.....	113
5.4 Pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferon o interferon-ribavirina.....	119
5.5 Pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferon pegilado-ribavirina.....	119
6. CONCLUSIONES.....	123
7. BIBLIOGRAFÍA.....	125

---

# 1. Introducción

---



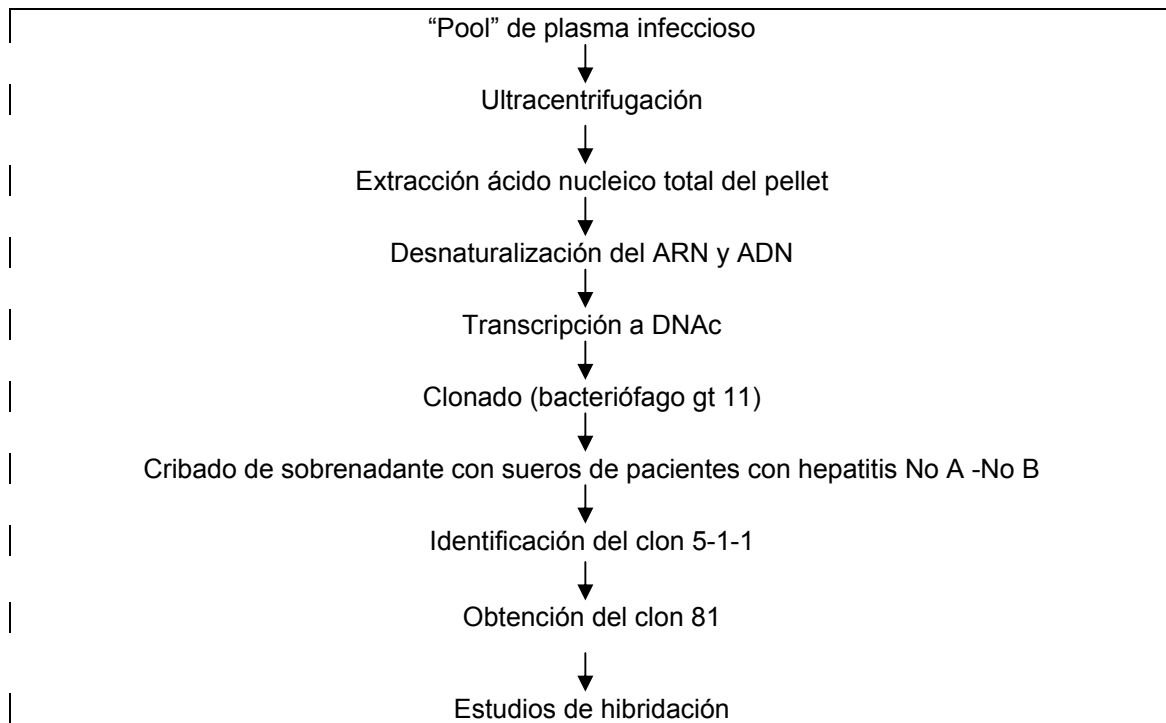
## 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En los años 70 se desarrollaron las técnicas serológicas que permitieron diagnosticar las hepatitis producidas por los virus hepáticos VHB y VHA y, se observó la existencia de casos de hepatitis con periodos de incubación y modos de transmisión característicos de una enfermedad infecciosa pero sin evidencia serológica de que las causaran ni éstos, ni otros agentes hepatotrópos como CMV y VEB (1). Prince et al (2) comunicaron por primera vez en 1974 el desarrollo de hepatitis postransfusional en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular sin infección por el VHB. Estas “hepatitis noA-noB” postransfusionales no diagnosticadas, presentaban una distribución mundial, y afectaban fundamentalmente a ADVP, hemofílicos y hemodializados. La mayor parte de ellas cursaban de forma asintomática, pero en un alto porcentaje se asociaban a graves lesiones hepáticas evolucionando un 20% de ellas a cirrosis y su diagnóstico debía ser hecho por exclusión de las anteriores (3).

En los años siguientes se realizaron intensas investigaciones, mediante la utilización de métodos biológicos e inmunológicos para la identificación del agente causal. Bradley et al (4) comunican en 1979 la transmisión de la hepatitis no A-no B a chimpancés a partir de la inoculación de factor VIII de la coagulación y propusieron la asociación de una partícula de 27 nm de diámetro. Estos mismos autores informan que un agente de la hepatitis no A no B era sensible al cloroformo y otro no. Además comunican que el agente sensible al cloroformo es capaz de causar cambios característicos en los hepatocitos, que es de naturaleza viral, con envoltura y contiene lípidos esenciales en la estructura de su cápside (5,6). Estudios posteriores consiguieron caracterizar las propiedades fisicoquímicas del agente de la hepatitis no A- no B, Bradley et al por todas las propiedades detectadas llegaron a pensar que se trataba de un *Togavirus* (7). En 1989, es cuando investigadores de la Chiron Corporation utilizando métodos de la Biología Molecular, descubrieron y clonaron el genoma del VHC. Para ello, utilizaron suero de chimpancé que presumiblemente contenía un elevado título de virus, y tras concentración, se procedió a la extracción del ácido nucleico. Como no se conocía ni la naturaleza del agente ni la de su genoma, todos los ácidos nucleicos se tradujeron a un sólo filamento, y tanto el ARN como el ADN fueron transcritos inversamente utilizando un molde aleatorio que transcribiera cualquier ácido nucleico de una sola cadena. El DNA complementario resultante (DNAc) se clonó en *E.coli* dentro del bacteriófago portador lambda gt11 que permite la expresión del DNAc clonado en un polipéptido.

El paso siguiente fue identificar ese polipéptido utilizando anticuerpos específicos de chimpancés. Después de cribar aproximadamente  $10^6$  clones de la biblioteca génica, se identificaron sólo 5 clones positivos. Uno de ellos 5-1-1 se demostró que codificaba un antígeno capaz de unirse con anticuerpos circulantes de individuos gravemente infectados por virus No A-No B. A partir del clon 5-1-1, usándolo como sonda de hibridación, se obtuvo un clon de mayor tamaño, clon 81, que se solapaba con el anterior. Este clon fue utilizado como sonda y

se comprobó que no hibridaba ni con ADN humano ni con ADN proveniente de chimpancé con hepatitis no A-no B, este clon tampoco hibrida con el ARN total extraído de hígados de chimpancé no infectados. La hibridación ocurría cuando el ARN total procedía de hígados de chimpancé infecciosos, esta hibridación desaparecía cuando el ácido nucleico total era tratado con ribonucleasa, pero se mantenía si era tratado con dextrirribonucleasa (8). (Figura nº 1)



**Figura nº1:** Metodología de obtención y clonación del genoma del VHC.

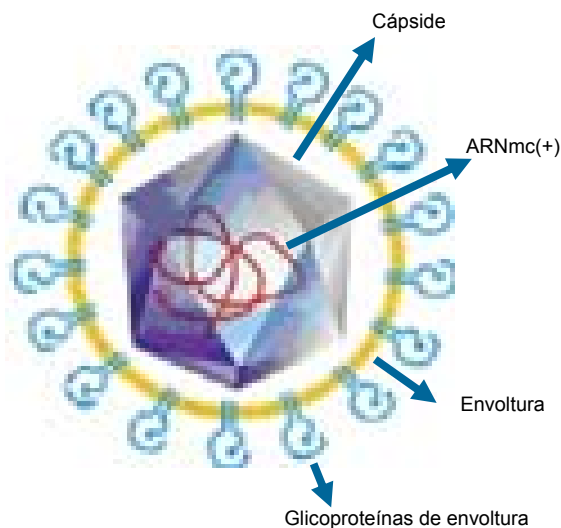
Se concluyó, que los clones derivaban de una molécula exógena de ARN asociada con la infección por el agente de la hepatitis no A-no B. Además se comprobó que sólo una de las cadenas del clon 81 hibridaba, con lo cual se dedujo que se trataba de ARN de cadena única, y que era esa cadena la complementaria a la cadena que codificaba el péptido del clon 5-1-1, es decir, la polaridad del ARN era positiva. Mediante el análisis de Northernblot se estimó el tamaño de la molécula, en torno a 10000 nucleótidos (9).

Debido a toda la diversidad de genotipos y al estudio de prevalencias de los mismos, se piensa que el VHC se originó como virus humano, mucho tiempo atrás, en las selvas tropicales del Sudeste Asiático, la India y África, quizás a partir de un virus simio presente en todas ellas que adaptó al hombre. Más tarde, habría irradiado hacia Europa en distintas épocas, primero desde África y más recientemente desde la India, pasando mediante la expansión colonial europea hacia América y Australia. Actualmente, debido al aumento de la movilidad de las poblaciones la difusión de determinados genotipos se ha visto favorecida, si como la expansión de determinados genotipos en poblaciones con ciertos comportamientos como es el caso del genotipo 3 en la población de ADVP. (10)

## 1.2 CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS

El VHC se considera como un género independiente dentro de la familia *Flaviviridae*, la cual incluye además a los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*, pero a diferencia de otros virus de la misma familia, no se transmite por artrópodos (11).

Es un virus que no crece a títulos altos en cultivos celulares, y por esta razón no se ha podido estudiar su estructura directamente. De los estudios realizados hasta el momento, parece deducirse que es un virus de 55-65nm de tamaño. Presenta una envoltura derivada de la célula hospedadora, en la que se insertan las glicoproteínas virales E1 y E2. Esta estructura explica la sensibilidad al cloroformo de las partículas infecciosas y los cambios en la densidad de flotación después del tratamiento con detergentes. Además de lípidos, en la superficie de la envoltura del virus se encuentran moléculas de azúcares. Esta cubierta rodea a la nucleocápside icosaédrica, formada por subunidades proteicas C, que engloba al ácido nucleico que es ARN monocatenario de 9.5 Kb (8). (Figura nº2).

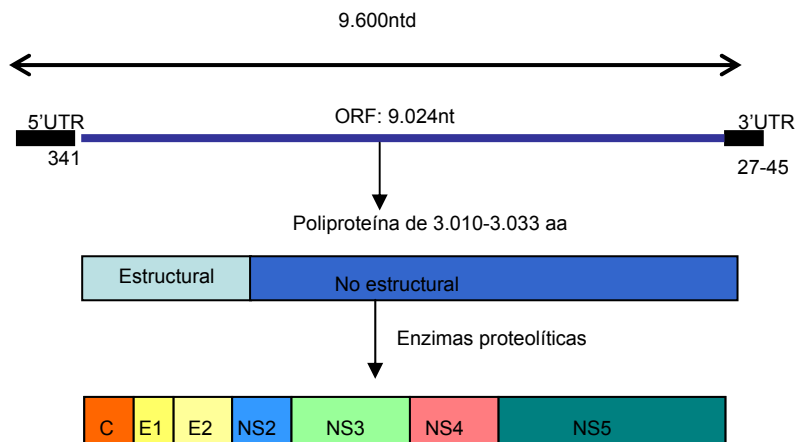


**Figura nº 2: Morfología VHC.**

### 1.2.1 Genoma

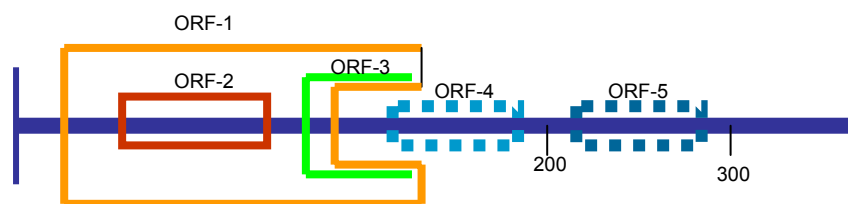
El ácido nucleico es ARN monocatenario de polaridad positiva. Tiene aproximadamente 9.500 nucleótidos y en él se distinguen tres regiones, una primera localizada en el extremo 5' que no es codificante 5'UTR, una región codificante, o única región de lectura abierta (ORF) que codifica una gran poliproteína precursora de 3011 aminoácidos, que mediante un proceso

de ruptura proteolítica postraduccional mediado por una proteasa, origina las distintas proteínas del VHC, y la región no codificante 3'UTR.(8) (Figura nº 3).



**Figura nº 3:** Genoma de VHC.

Las regiones no codificantes son zonas altamente conservadas (12), la región 5'UTR contiene 341 nucleótidos, es la mejor conservada entre los VHC aislados de diferentes regiones del mundo, lo cual sugiere que tiene una función importante en la replicación o expresión de los genes. No obstante, en esa región se pueden encontrar dominios variables intercalados con otros conservados. También se ha demostrado la existencia en la región 5'UTR de cortos ORF que se solapan y que están conservados en todos los aislados y que quizá tengan un papel importante en la traducción y su principal función es permitir la unión del ribosoma de las células huésped al ARN vírico en las estructuras conocidas como IRES (Internacional ribosoma entry sites). (Figura nº 4).



**Figura nº 4:** Diagrama esquemático de la posición de los marcos de lectura (ORF) de la región 5'UTR.

La región 3'UTR consta de 139 nucleótidos y los estudios realizados sobre su secuencia han demostrado la existencia en la dirección 5'-3', de una secuencia de 40 nucleótidos seguida de un codón de parada del ORF. Esta región muestra una cierta variabilidad entre genotipos. A continuación se encuentra una secuencia poly-(U) de longitud

variable, una secuencia poly-pirimidina c(U) y una secuencia de 98 bases altamente conservada que representa el extremo 3' terminal del genoma. La estabilidad de la secuencia de esta región y de su estructura secundaria sugiere que esta parte del genoma interviene de forma importante en la replicación o estabilización del ARN-VHC. (13)

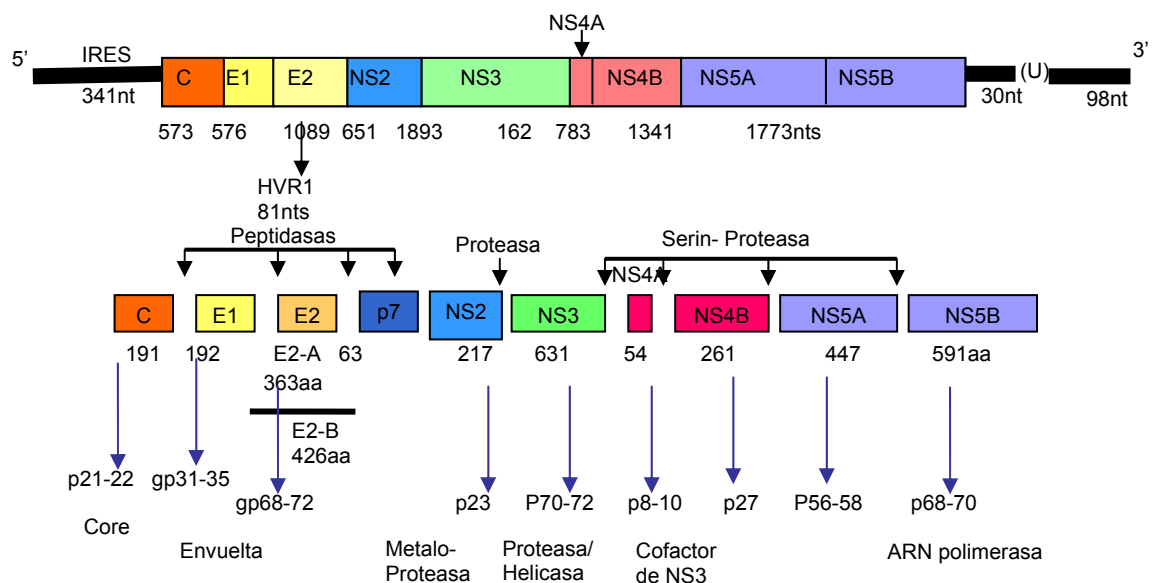
### **1.2.2 Proteínas del VHC**

La transcripción del ARN vírico origina una poliproteína precursora con las siguientes regiones: en el extremo 5' encontramos la región estructural que da lugar a las proteínas del core (C) y de la envoltura (E1 y E2). A continuación se encuentra la región que codifica las proteínas no estructurales en el siguiente orden: NS2, NS3, NS4 y NS4. Estas proteínas se han podido identificar usando antisueros mono-específicos. Las proteínas funcionales del VHC se forman por la segmentación de la poliproteína vírica gracias a la acción de proteasas celulares y virales, las peptidasas celulares catalizan la segmentación de la región estructural y la rotura de la unión entre NS2 y NS3 se produce por la proteasa vírica y la segmentación del resto de proteínas se produce por efecto de una serín-proteasa localizada en el tercio N-terminal de NS3 (13).

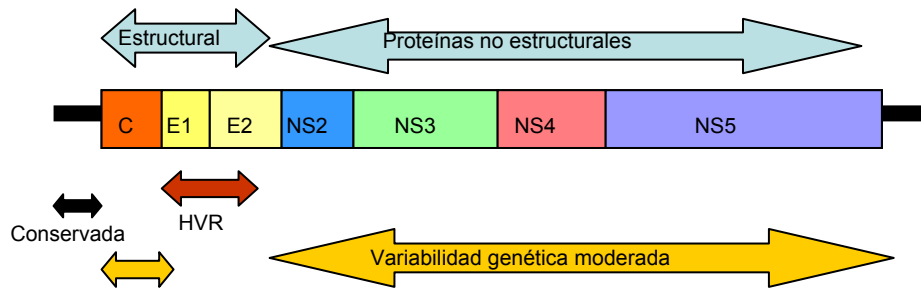
La proteína de la cápside C, consta de 191 aminoácidos y 22kD. Es muy inmunógena y está altamente conservada entre los diferentes aislados víricos. Su extremo N-terminal presenta varios epítomos lineales muy utilizados como base antigénica en los equipos diagnósticos para detectar anticuerpos en los sueros de pacientes con hepatitis C (14). Las peptidasas celulares rompen el extremo C terminal de esta proteína y liberan un péptido de 19kD (p19).

Las proteínas de la envoltura están glicosiladas, son las glicoproteínas E1, de 31kD (gp31) y E2 de 70kD (gp70), están altamente glicosiladas, tienen carácter inmunógeno y son reconocidas con los sueros de pacientes. Sobre E2 actúan peptidasas dando lugar a 2 proteínas E2-A de 363 aminoácidos t E2-B de 426 aminoácidos. Entre sus funciones se encuentran, el reconocimiento y unión a las células del hospedador, la fusión de las membranas, y el escape a la respuesta inmune. En el extremo N-terminal de E2 se encuentra una zona de 30 aminoácidos que presentan una elevada variabilidad en los aminoácidos que la componen. Esta región hipervariable se conoce como HVR1, se localiza en la superficie del virus y es portadora de los epítomos neutralizantes. Desde el punto de vista patológico se ha observado que los anticuerpos específicos frente a esta región cambian el curso de la infección crónica, sugiriendo que la variabilidad de HVR1 y la mutación a este nivel constituye uno de los mecanismos que tiene el virus para escapar a la vigilancia del sistema inmunológico(15). A continuación de HVR1, se encuentra región hipervariable, HVR2 de unos 7 aminoácidos que parece encontrarse sólo en algunos aislados del genotipo 1b.

El extremo carboxi-terminal de la poliproteína, codifica las proteínas de la región no estructural NS2, NS3, NS4 y NS5, que no están glicosiladas e intervienen en el ciclo de replicación del VHC debido a sus propiedades enzimáticas. Las proteínas NS2 de 217 aminoácidos (23kD) y NS3 de 631 aminoácidos (70kD) tienen actividad proteasa y están implicadas en el proceso autoproteolítico a nivel NS2/NS3. La proteasa de la región NS2 parece ser una metaloproteasa dependiente de zinc. La región NS3 tiene actividad serin-proteasa, nucleótido-trifosfatasa (NTPasa) y RNA helicasa. La serin-proteasa juega un papel importante en el procesamiento y ensamblaje del VHC, de ahí que pudiera ser la diana para el desarrollo de una futura terapia antiviral. La RNA helicasa parece implicada en el desdoblamiento de la cadena de ácido nucleico durante la replicación y transcripción vírica. La NTPasa hidroliza los nucleósidos trifosfato proveiendo de energía para el desenrollamiento de los ácidos nucleicos. Por otra parte parece ser que NS3 pudiera tener cierta relación con el desarrollo del cáncer hepático. La región NS4 codifica dos proteínas virales NS4A de 54 aminoácidos y NS4B de 261 aminoácidos. Ambas son muy hidrofóbicas y en su extremo N-terminal podrían estar asociadas con las membranas celulares. NS4A actúa como cofactor de la actividad proteasa de NS3. Esta interacción NS3/NS4A es vital para la replicación vírica y el procesamiento de la poliproteína. La región NS5 codifica dos proteínas NS5A de 447 aminoácidos y NS5B de 591 aminoácidos. La proteína NS5B es una RNA polimerasa RNA dependiente. La función de NS5A es desconocida pero parece tener importancia en la replicación. (13). En la región NS5 se encuentra el sitio de unión a protein quinasa y la región determinante de la sensibilidad al interferón (ISDR) ambas implicadas en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento (Figuras nº 5 y nº 6).



**Figura nº 5: Organización geonómica de VHC.**



**Figura nº 6:** Diversidad genética de VHC.

En todas las proteínas se han encontrado epítomos antigénicos, que provocan respuesta inmune durante la infección natural, la respuesta frente a la proteína C es mayoritaria y es la más persistente en el tiempo. Se puede detectar después de una infección antigua o resuelta (16,17), la respuesta frente a E2 es frecuente y detectable en individuos virémicos y no virémicos, NS3 es el antígeno causante de la respuesta mayoritaria así como de la respuesta más precoz tras la primoinfección (18,19). Gracias a los epítomos de NS4 se descubrió el VHC, se inocularon chimpancés con plasma humano infectado, se hizo la clonación al azar de ARN y ADN, se expresaron dichos clones y se procedió a un cribado con suero sospechoso de poseer anticuerpos. De este modo se identificó el clon reactivo, el cual se utilizó como sonda para identificar a la proteína NS4. Durante la infección natural dicha proteína es la que produce una respuesta mayoritaria, frente al antígeno NS5 es al que en menor medida se produce una respuesta inmunitaria. (20)

### 1.2.3 Cápside

Está constituida por múltiples copias de una proteína de 191 aminoácidos y de 22kD. Es una proteína altamente conservada entre los diferentes aislados víricos

### 1.2.4 Envoltura

En ella se distinguen dos glicoproteínas ambas con poder inmunogénico, una de ellas transmembrana (E1) de 31 kd o gp31 y otra como espículas proyectadas al exterior (E2) de 70 kd (gp70), ambas están altamente glicosiladas. (21) En el extremo N-terminal de la proteína E2 se encuentra una zona de 30 aminoácidos de longitud que presenta una elevada variabilidad en los aminoácidos que la componen. Esta región hipervariable, conocida como HVR1 es presentada en la superficie del virión y es portadora de epítomos neutralizantes. Se ha demostrado que la adherencia vírica se inhibe por el suero que contenga anticuerpos frente a la secuencia HVR1.

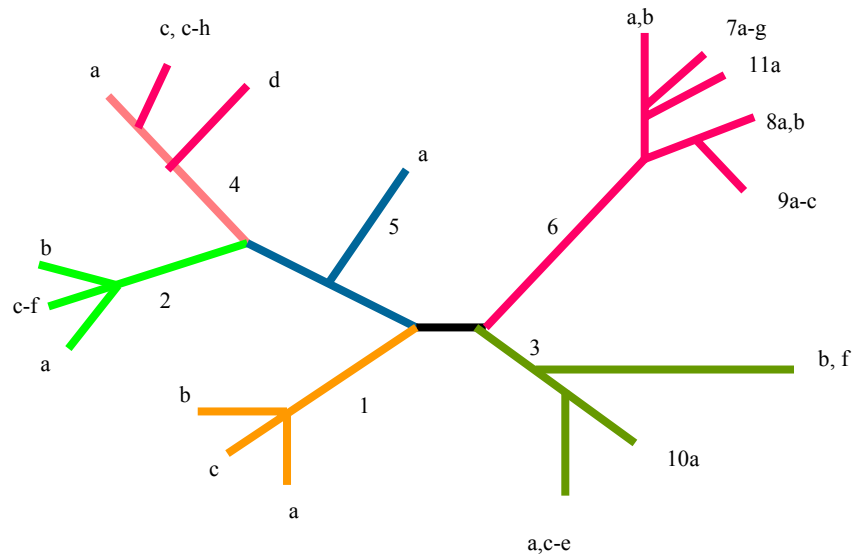
### 1.2.5 Variabilidad genética.

El VHC es uno de los virus con un mayor grado de diversidad genética con interés en patología humana que se ha estudiado hasta el momento. Durante la replicación vírica pueden aparecer errores aleatorios durante la acción de la ARN polimerasa ARN dependiente. El VHC tiene una vida media de 2.5 horas en sangre y en los pacientes con hepatitis crónica se producen diariamente  $10^{12}$  partículas víricas, superior a la del VIH, la ARN polimerasa tiene una elevada tasa de error por lo cual existe una gran probabilidad de que se produzcan mutaciones pudiendo originarse diversas formas víricas viables con cambios en la secuencia de aminoácidos.

La primera evidencia de esta diversidad genética en el VHC, surgió de la comparación de un aislado japonés (VHCJ1) y otro americano (VHC-1) (22) que reveló diferencias en las regiones NS3 y NS4. Posteriormente se demostraron divergencias en otras regiones, NS5 y envoltura (23), sugiriendo la existencia de múltiples tipos del VHC. Existen variaciones en las secuencias genómicas del virus, que dan lugar a la coexistencia dentro de un mismo hospedador, de varios virus estrechamente relacionados pero distintos. Este tipo de población viral denominado **cuasiespecie**, se origina fundamentalmente por la variabilidad dentro de la región HVR1 de E2 (24), aunque este no es el único factor implicado en la aparición de las cuasiespecies. No obstante existen otras variaciones mayores que afectan a gran parte del genoma vírico, y que se perpetúan filogenéticamente, a estos grupos se le ha dado el nombre de **genotipos**, y definen poblaciones que pueden tener en común características o comportamientos como son una distribución geográfica determinada, una mayor presencia en grupos de poblaciones específicos, un tropismo tisular especial o una mayor o menor patogenicidad relativa.

Entre las secuencias obtenidas de diferentes partes del mundo se pueden definir tres rangos de diversidad que permiten la clasificación del virus en genotipos, con un 67-68% de homología, subtipos, con un 77-78% de homología, y aislados individuales, con más de un 86% de homología. Actualmente se pueden definir seis genotipos mayores (1-6) y dentro de cada genotipo se pueden distinguir a su vez distintos subtipos que se designan con una letra que sigue al número que nombra el subtipo (por ejemplo subtipos 1a, 1b, 1c). (25) (Figura nº 7).





(Simmonds et al. J. Gen Virol 1996;77:3013-24)

**Figura nº 7: Filogenia y genotipos VHC.**

En algunos estudios procedentes del Sudeste Asiático y del subcontinente Indio, se han sugerido la existencia de cinco genotipos más (7-11), pero es con la confección de los árboles filogenéticos, obtenidos mediante la utilización de distintas regiones del genoma del virus, cuando se pone de manifiesto las seis ramas principales, que se corresponde con los genotipos 1-5 y se define una única división para las cepas de los genotipos 6-9 y 11 que sería la rama correspondiente al genotipo 6. El genotipo 10 quedaría englobado en la rama correspondiente al genotipo 3 (26). En la rama ocupada por las cepas del Lejano Oriente, se observan agrupamientos que contienen por un lado a los genotipos 6, 7 y 11 y por el otro a los genotipos 8 y 9, es decir estaríamos hablando de un grupo genómico del VHC, restringido a una región geográfica, por este motivo se le englobaría en un único genotipo el 6 con más de doce genosubtipos diferentes.

El grado de diversidad dentro de cada genotipo y subtipo es muy variable según la región del genoma o de la poliproteína considerada. La región 5'NC contiene el mayor grado de conservación en las secuencias, siendo esta de más de un 90% de similitud (27). La región del core está relativamente bien conservada, con un rango de similitud en la secuencia de nucleótidos que varía entre el 81 y el 88% entre diferentes genotipos. Las regiones E1 y NS5 están menos conservadas, mostrando los aislados de diferentes genotipos una similitud entre 53 y el 69% en la región E1 y entre el 56 y el 72% en la región NS5 (28). Si embargo, como cabría esperar, la mayor variabilidad, con más de un 50%, la presenta la región hipervariable HVR1 de E2. (Tabla nº 1).

**Tabla n° 1: Regiones genómicas, proteínas y porcentaje de variabilidad en VHC**

<b>Región Genómica</b>	<b>Proteínas</b>	<b>% Similitud nucleótidos</b>	<b>% Similitud aminoácidos</b>	<b>Función</b>
5' no codificadora		90		Iniciación traducción
Nucleocápside C	Prot Core	81	90	Replicación
Envuelta E1	Glicoproteína	56	49	Encapsidación
Envuelta E2, E2-p7	Glicoproteína	56	49	Adherencia celular
No estructural NS2	Metaloproteinasa	57	56	Adherencia celular
No estructural NS3	Serín-proteasa NTPasa RNA helicasa	70	80	Clivaje NS2-NS3 Energía
No estructural NS4	Cofactor proteasa	65	50	Replicación
No estructural NS5	RNA polimerasa- DNA dependiente	72	71	Replicación
3' no codificadora			26	Empaquetado vírico

La utilidad del estudio de la diversidad genética del VHC incluye aspectos epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico, e incluso de prevención, es decir, podría estar implicado en el desarrollo de vacunas.

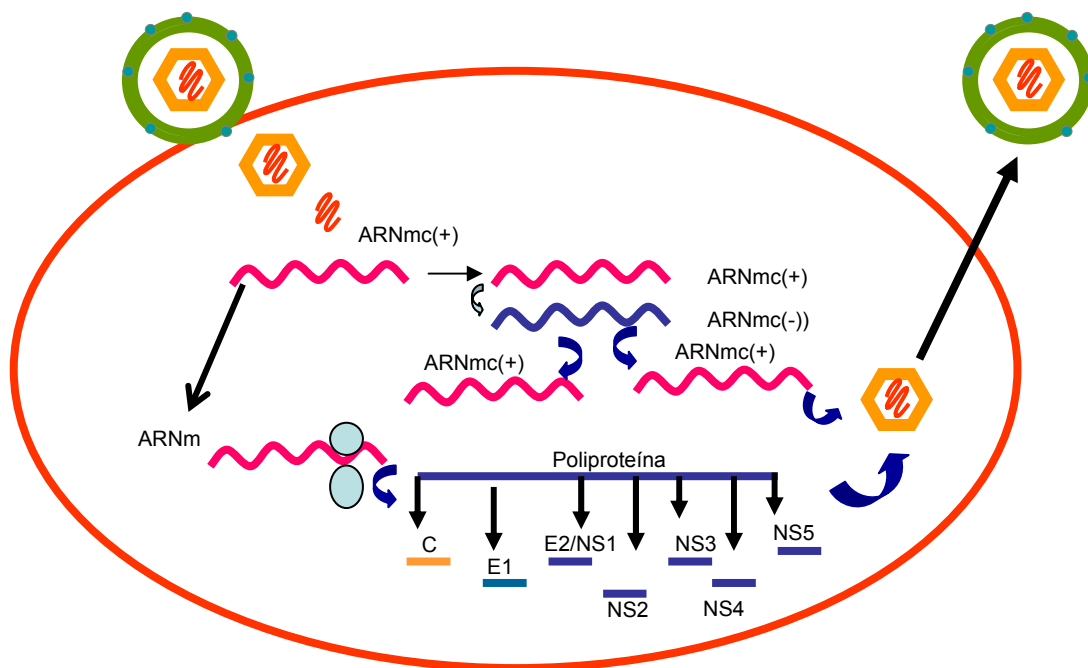
Desde el punto de vista clínico, algunos autores no encuentran asociación entre genotipos y gravedad de enfermedad hepática, pero parece confirmarse el hecho de que los pacientes con el genotipo 1 (especialmente el 1b) tienen lesiones más graves de hígado y presentan una peor evolución. Así parece establecerse que los pacientes con genotipo 1b tienen mayor probabilidad de desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular. Además los pacientes con genotipo 1b, tienen peor respuesta al tratamiento con interferón. (29). Por el contrario los pacientes con el genotipo 2 presentan una mejor respuesta al tratamiento con interferón (30)

Otro tema de interés es la repercusión que puede tener la heterogeneidad del VHC en el diagnóstico de la infección. Para las técnicas de detección del genoma mediante amplificación se debe seleccionar la región 5'UTR debido al alto grado de homología entre los genotipos (31). También se pueden producir variaciones en la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico serológico en función de la base antigénica empleada en las técnicas de ELISA.

Por otra parte, se han demostrado infecciones múltiples en un mismo individuo, lo cual sugiere que la respuesta inmune frente a un genotipo no protege de la infección por otro (32).

### 1.2.6 Ciclo de replicación

La replicación del VHC comienza con la penetración del virus en las células del hospedador, el mecanismo no es único y depende de la célula diana. Existen experimentos que pone de manifiesto la interacción de las lipoproteínas que recubren las partículas víricas y receptores específicos de las células diana, concretamente en células que expresen los receptores Fc, facilitando la entrada del virus por endocitosis. Una vez en el interior se libera el ARN. Distintas proteínas celulares y virales pueden activar diferentes elementos de control positivo y negativo que determinan que el ARN positivo viral actúe como ARN mensajero, originando la poliproteína viral, y que actúe como ARN plantilla para ser copiado en cadenas ARN negativas, siendo esta la forma replicativa, que es traducido en múltiples copias de ARN positivo o ARN genómico, que es encapsidado dentro del virión. (Figura nº 8).



**Figura nº 8:** Ciclo de replicación de VHC.

La tasa de partículas víricas depende de la cantidad de cadenas ARN positivas y ARN negativas, pues la forma ARN bicatenario activa las defensas antivirales intracelulares y la acción del interferón. (13)

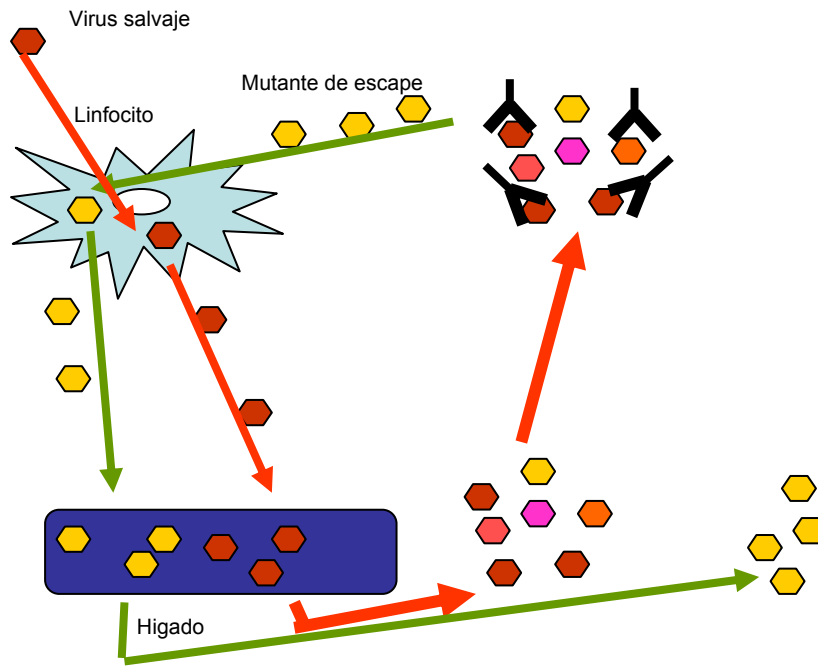
Estudios realizados mediante reacción en cadena de la polimerasa e hibridación “in situ”, han demostrado que en el tejido hepático de pacientes infectados se pueden encontrar tanto la forma genómica (cadena positiva) como la replicativa (cadena negativa) del VHC.

Algunos autores también encuentran dichas formas en suero y células mononucleares de sangre periférica, que también podría ser un artefacto de la PCR (33, 34).

### 1.3 PATOGENIA E HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN

La transmisión se podría producir por distintas vías: parenteral, sexual y vertical. Desde la puerta de entrada el virus llega al hígado, ya que es un virus hepatotropo. Se sospecha que la proteína E2, podría desempeñar algún papel en la adherencia al hepatocito, aunque la adsorción e internalización se desconocen. El virus se replica en el hepatocito y la destrucción celular que se produce como consecuencia de la infección puede ser debida a la replicación viral, que provoca un efecto citopático letal o a la respuesta inmune citotóxica. Existe una importante cooperación entre los linfocitos T auxiliares CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+, para la eliminación de la infección vírica. Los linfocitos T citotóxicos reconocen antígenos virales expresados en células infectadas, provocando la lisis de estas células, tras el reconocimiento de ciertos péptidos cortos expresados en la superficie celular, procedentes del procesamiento de las proteínas víricas, de este modo evitan la maduración de viriones. Además los linfocitos T citotóxicos producen citocinas que van a inhibir la replicación viral. (13).

Durante el curso de la infección se desencadena una respuesta inmune humoral frente a epítomos localizados en distintas proteínas del virus. La respuesta de IgM e IgA se desencadena frente a un epítomo de la proteína de la cápside. Esta es una respuesta inconsistente o de bajo nivel, y además la respuesta de IgM e IgA no es una respuesta exclusiva de la primoinfección sino que también se detectan en la infección crónica. La IgG aparece en la respuesta temprana frente a la primoinfección, y se produce frente a las proteínas C y NS3, y se detecta 3-4 semanas después de los síntomas. Un poco más tarde aparecen los anticuerpos frente a las proteínas NS4 y E2, y en menor medida frente a la proteína NS5. La avididad de IgG es baja al principio y se incrementa como consecuencia de la maduración, de modo que en la primoinfección aguda las IgG poseen una baja avididad global y en la infección crónica una elevada avididad (35). La serorreversión es posible en individuos infectados que eliminaron el virus y no se hallan en riesgo continuado de exposición al mismo. Además es difícil de identificar a estos individuos infectados y que fueron capaces de eliminar el virus tras la primoinfección, pues no se conoce la inmunidad humoral residual. Todo esto pone en duda la verdadera seroprevalencia en la población. (Figura nº 9).



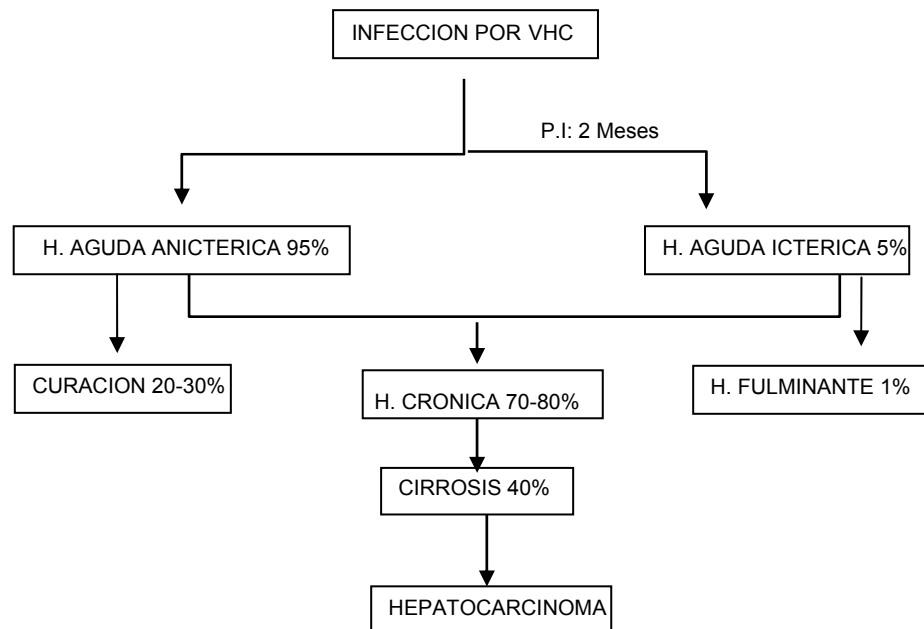
**Figura n° 9:** Patogenia de la persistencia de VHC.

Un hecho a tener en cuenta es que el virus de la hepatitis C persiste en un 80% de los infectados, la mayoría de los seropositivos sufren una infección persistente. El proceso se suele desarrollar del siguiente modo: tras la inoculación parenteral se produce una infección aguda, el virus mediante los linfocitos llega a los hepatocitos, donde el virus se replicará y durante la replicación aumenta la frecuencia de mutación, con lo cual en la progenie viral se distingue una alta diversidad genética, originando una distribución de cuasiespecies. Debido a la alta diversidad genética, se distingue una gran variedad de antígenos, sobre todo de los epítomos de la proteína E2. Durante la infección aguda los anticuerpos neutralizantes son contra las variantes antigénicas mayoritarias. Si el grado de diversidad antigénica no es muy grande, todas las variantes serán neutralizadas, de modo que el sistema inmunitario habrá controlado la infección, aunque los anticuerpos residuales no protegerán frente a la nueva entrada del virus. Si por el contrario alguna variante escapa, volverá a infectar a los linfocitos, mediante los cuales llegará a los hepatocitos para producirse una nueva ronda de replicación. Cuanto más progrese la infección más variantes escaparán y el sistema inmune no podrá eliminar la infección originando una infección persistente. Es decir, el VHC elude al sistema inmunitario en la mayoría de los infectados por causa de la hipervariabilidad de las regiones del genoma que codifican los epítomos de la proteína E2 implicados en la neutralización (36,37). No se conoce bien lo que ocurre, puede que existan hepatocitos infectados como fuente continua de virus, o bien puede que exista una fuente extrahepática que facilite la infección de hepatocitos no infectados dando lugar a una infección continua en el hígado.

La fluctuación que se produce en los niveles de transaminasas así como en la carga viral, son debidos a la persistencia del virus que supondría ciclos periódicos de infección y destrucción celular. Estos periodos de infección y destrucción celular son los que originan los altos niveles de transaminasas y de virus en sangre y los periodos de producción discreta corresponderían a la producción de virus en lugares extrahepáticos donde no habría destrucción hepática, esto apoyaría la segunda teoría.

#### 1.4 CUADROS CLÍNICOS

El espectro de enfermedad hepática en pacientes con infección por VHC abarca una amplia gama desde individuos asintomáticos con pruebas normales de función hepática, o producir una enfermedad hepática (hepatitis aguda, crónica, cirrosis, carcinoma hepatocelular y fallo hepático que requiere transplante de hígado). (Figura nº 10).

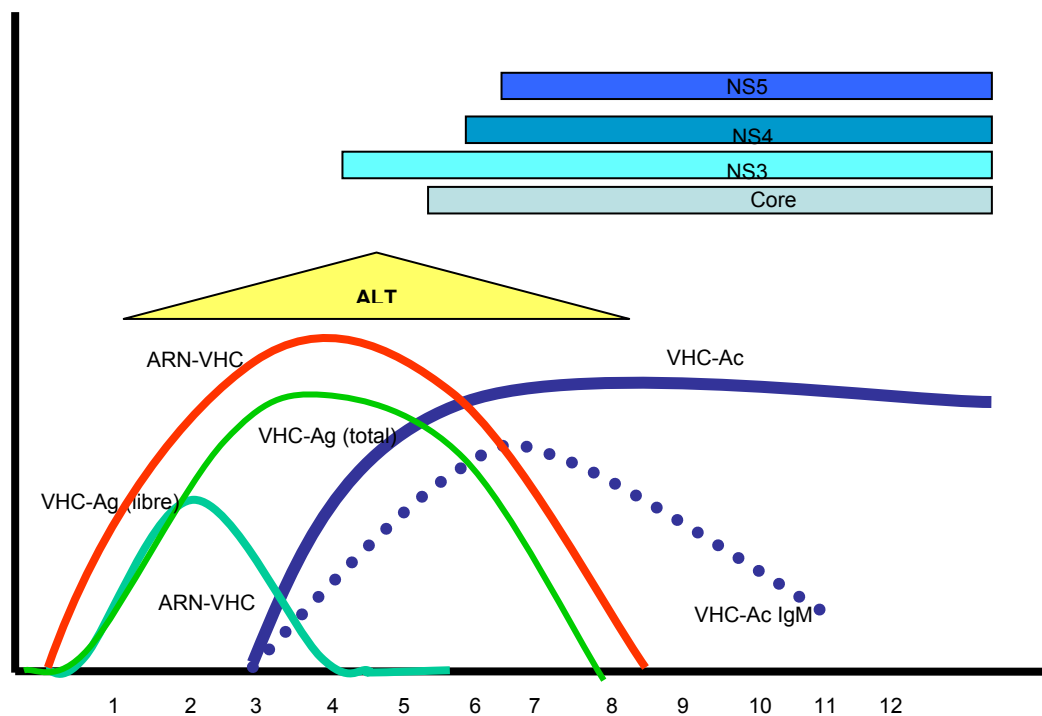


**Figura nº 10:** Cuadros clínicos producidos por VHC.

##### 1.4.1 Infección aguda

La hepatitis C suele ser asintomática en el 85% de los casos. Sólo un 20-30% de los pacientes presentan síntomas y de ellos sólo la mitad manifiesta ictericia. El periodo de incubación es variable de 1 a 2 meses, y transcurrido el mismo comienza a incrementarse las transaminasas y aparecen los síntomas que son indistinguibles de otras hepatitis virales, puede aparecer ictericia, manifestaciones gastrointestinales inespecíficas (anorexia, náuseas, dolor abdominal y fatiga). La ictericia cuando aparece puede durar de 2 a 12 semanas y su gravedad es variable.

Prácticamente todos los pacientes tienen elevación de transaminasas aunque no existe un patrón constante de elevación y persistencia. Lo normal es que si la infección se resuelve, las transaminasas se normalicen a las pocas semanas. El ARN se detecta en las dos primeras semanas y la concentración de viriones circulantes se incrementa hasta  $10^6$ - $10^8$  partículas/ml, hasta la aparición de anticuerpos específicos, existiendo por tanto un periodo ventana de 4 semanas durante el cual se detectaría el virus pero no los anticuerpos específicos, y en esta situación se hablaría de una infección aguda muy reciente, exceptuando los pacientes con deficiencias humorales. Cuando aparecen los anticuerpos específicos disminuye la concentración de viriones en sangre. Si la infección no se elimina, la viremia se mantiene aunque puede fluctuar. Si se detecta conjuntamente virus y anticuerpos específicos no se podría identificar si es una infección aguda reciente aunque mediante un análisis más fino de anticuerpos se podría poner de manifiesto la seroconversión frente a determinados antígenos y por tanto permitiría la identificación de la infección aguda. Otros de los parámetros que a considerar sería la avidéz de la IgG, una IgG de baja avidéz confirmaría la sospecha. Si posteriormente se siguen detectando IgG se hablaría de una posible infección crónica, siempre y cuando se siga detectando virus en el suero. (35). El antígeno core del VHC se puede detectar en su forma libre desde las dos primeras semanas, y desaparece cuando se detectan los anticuerpos. El VHC-Ag total se aparece prácticamente a la vez y desaparece cuando lo hace el ARN. (Figura nº 11).



**Figura nº 11:** Evolución de marcadores de VHC en la hepatitis aguda.

Excepcionalmente puede cursar como una hepatitis fulminante que se ha descrito sobretodo en pacientes coinfectados por el VHB.

#### **1.4.2 Infección crónica**

Lo primero hay que diferenciar entre el termino persistencia e infección crónica. La persistencia no siempre implica infección crónica, sino que pueden existir portadores sanos es decir con infección persistente pero no con una infección crónica, como sucede con los portadores crónicos del VHB (HBsAg). Lo que no se conoce es si la persistencia del VHC implica infección crónica o si existen portadores crónicos, lo cual confirmaría la residencia extrahepática del virus.

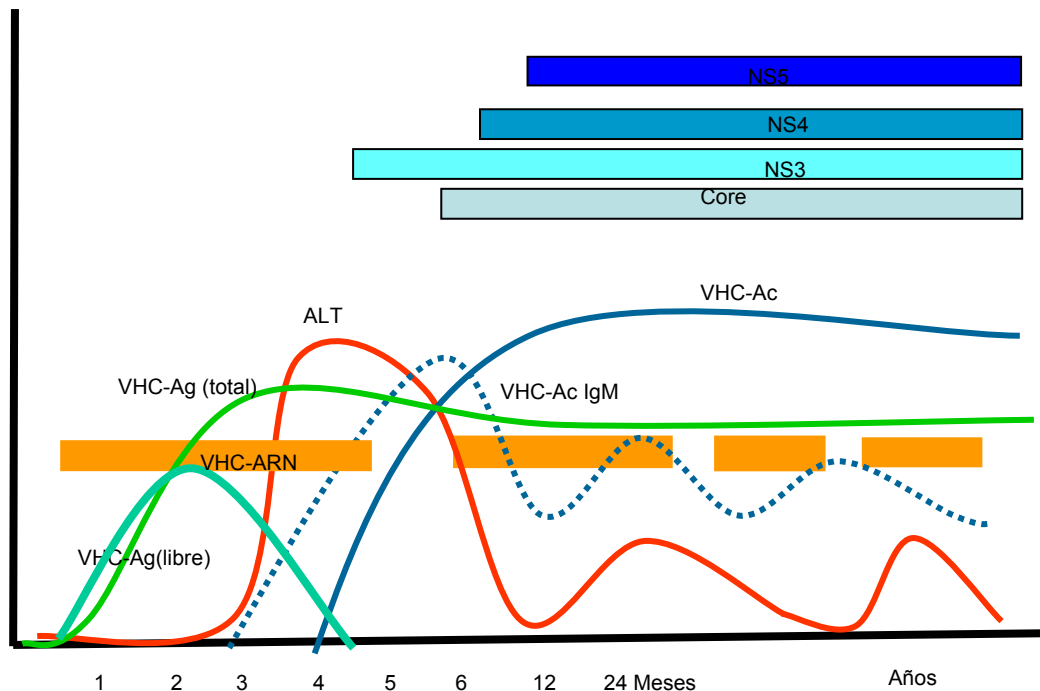
En la infección por VHC, la infección aguda autolimitada no constituye la evolución más frecuente, ya que un gran porcentaje progresa hacia la cronificación. En la mayoría de los casos los síntomas desaparecen pero los niveles de transaminasas permanecen elevados y persiste el ARN, desde un punto de vista clínico el paciente es, casi siempre asintomático o presenta escasa sintomatología. El síntoma más frecuente es la fatiga que es descrita por los pacientes como malestar o falta de energía. Otros síntomas menos frecuentes son náuseas, anorexia, dolor hepático, pérdida de peso, debilidad muscular, y artralgias. Las transaminasas pueden estar elevadas pero ligeramente, sus niveles fluctúan entre 1.5 y 10 veces el límite superior normal. Un tercio de pacientes presentan las transaminasas normales y solo esporádicamente presentan elevaciones.

En un paciente crónico existen anticuerpos siempre en su suero, excepto si existe un déficit inmunológico, siempre se detectan frente al antígeno core y NS3, normalmente frente a NS4, y frecuentemente son bajos o inexistentes frente a NS5. Los niveles de viremia son  $10^5$ - $10^7$  copias/ml, la respuesta humoral presiona sobre la población de virus dando lugar a una aclaración en el número de partículas circulantes y disminuyendo el nivel de viremia. Cuanto más tiempo pase, mayor será el número de variantes, menor la eficacia neutralizante, con lo cual los valles serán menos frecuentes y menos acusados. Del mismo modo las fluctuaciones son más frecuentes y más intensas cuanto más cerca de la infección aguda se este. El antígeno core tiene un comportamiento similar al del ARN, es decir persiste en el tiempo. (Figura nº 12).

La mayoría de los pacientes presentan una hepatitis crónica persistente o una hepatitis de cambios mínimos, y solamente en un 13% la histología muestra un patrón normal. La evolución de la infección crónica no es uniforme, algunos pacientes presentan evidencia de enfermedad activa con lesión hepática, mientras que otros normalizan las transaminasas y tienen cambios histológicos leves y no progresivos con un bajo nivel de replicación viral Un



10% de los pacientes con hepatitis crónica muestran mejoría clínica e histológica. En un 50% de los casos la enfermedad parece relativamente benigna y no progresiva, mientras que en el resto la enfermedad progresa insidiosamente en el tiempo. (38)



**Figura nº 12:** Evolución de marcadores de VHC en la hepatitis crónica.

La progresión desde hepatitis crónica persistente a hepatitis crónica activa y desde ésta a cirrosis está bien documentada y se demuestra que entre el 20 y el 25% de los casos de pacientes con hepatitis crónica seguidos a lo largo de 5-10 años desarrollan cirrosis. Los tres factores más relacionados con la progresión a cirrosis son el grado de daño hepático en la biopsia inicial, la edad de exposición y la duración de la infección (39)

Otros factores que parecen influir en la progresión de la hepatitis crónica por VHC son el estado inmune del paciente, la naturaleza de cuasiespecie del VHC y la variabilidad genómica de E2 que le permite escapar de la neutralización por los anticuerpos. La coinfección con VIH se acompaña de daño hepático más severo y una progresión rápida a cirrosis. La reinfección por VHC en receptores de transplantes de hígado se asocia con frecuencia con hepatitis severa que progresa a cirrosis. Respecto a la coinfección con VHB, parece ser que el VHC puede suprimir la replicación del VHB, aunque hay evidencias de que la coinfección por ambos virus se correlaciona con un mayor daño hepático (40).

Los pacientes con infección por VHC y alcoholismo tienen hepatitis más graves que los pacientes con enfermedad alcohólica exclusivamente. La progresión a cirrosis es más frecuente en pacientes infectados por VHC y que ingieren cantidades excesivas de alcohol, más aún el carcinoma hepatocelular es común en los pacientes alcohólicos con cirrosis e infectados por VHC (41)

El mecanismo de transmisión parece implicado en la probabilidad de desarrollar cirrosis en un estudio realizado por Roudot-Thovaral et al (42) la cirrosis hepática es más frecuente en receptores de sangre (23,4%) que en adictos a drogas por vía parenteral (7%)

Aunque la progresión de la infección por VHC a la cronicidad es alta, el curso clínico de la enfermedad suele ser largo. Alrededor del 50% de los pacientes son asintomáticos y su enfermedad sale a la luz en un examen médico de rutina.

La remisión espontánea es muy poco frecuente. En el caso de jóvenes, inmunológicamente normales, la progresión de la hepatopatía suele ser lenta, sin muerte prematura (43), pero en pacientes con inmunodeficiencias la progresión a cirrosis es rápida.

#### **1.4.3 Infección por VHC y carcinoma hepatocelular**

Estudios epidemiológicos han demostrado una relación entre la hepatitis C crónica y el carcinoma hepatocelular. En un estudio realizado por Resnik RH y Koff R.(44) en 1930 pacientes con carcinoma hepatocelular se encontró que la infección por VHC podría haber contribuido al desarrollo del carcinoma en el 37% de los casos y sólo en el 9% se podría asociar el mismo al VHB.

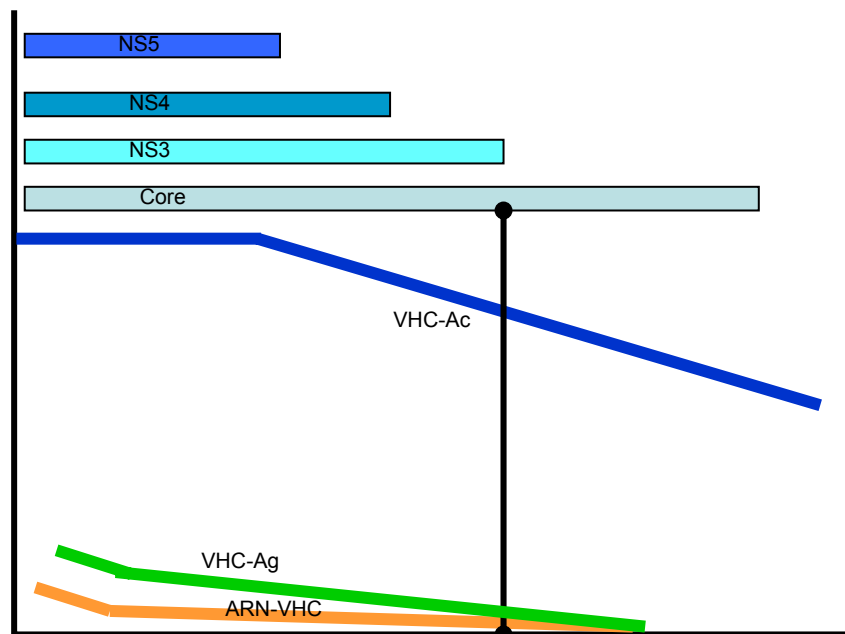
La aparición de carcinoma hepatocelular tiene lugar generalmente en pacientes que ya han desarrollado cirrosis, y generalmente se requiere una media de 30 años desde el inicio de la enfermedad.

El mecanismo molecular por el que el VHC induce la aparición de carcinoma celular no se debe a que el VHC no se integra en el genoma del hepatocito, ni posee ningún transactivador que pueda influir sobre la expresión de genes celulares. El carcinoma es consecuencia de la destrucción y regeneración de hepatocitos que originaría la periódica división de hepatocitos, aumentando de este modo las probabilidades de mutación espontánea y por tanto la probabilidad de activación de oncogenes celulares. (13)

#### 1.4.4 Infección resuelta

Entre el 15-20% de los casos se produce el control de la infección aguda, este control va a depender del sistema inmunitario de cada individuo y de la diversidad antigénica del inoculo recibido, que va a limitar el espectro de variantes. Un mecanismo para la limitación de variantes es el tratamiento con interferón en las hepatitis C agudas (45,46), así como la inmunización preventiva con glicoproteínas víricas recombinantes.

En estos casos el paciente no es virémico pero presenta anticuerpos específicos que en ausencia de contactos tienden a disminuir con el tiempo. Los anticuerpos frente al core son los que más duran, lo que origina un patrón indeterminado de “anti-core aislado” en pruebas de dot-blot. En estos casos, con el seguimiento del paciente se observa el mismo patrón serológico, viremia negativa y reactividad de alta avidez en la prueba de EIA para IgG. Este es el único patrón indeterminado de anti-VHC que persistiendo en el tiempo en un individuo normal y con viremia negativa, reflejaría la presencia de anticuerpos específicos frente al virus. (47) (Figura nº 13).



*Figura nº 13: Evolución de marcadores de VHC en la hepatitis resuelta.*

#### 1.4.5 Manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHC

Algunos estudios epidemiológicos demuestran asociación entre el VHC y enfermedades linfoproliferativas como crioglobulinemia y linfoma de Hodgkin. Estos hallazgos sugieren que el VHC puede infectar y replicarse en hepatocitos y linfocitos. Se ha demostrado asimismo la presencia de VHC en localizaciones extrahepáticas como ovario, útero y corazón.

La infección crónica por VHC puede ser un factor en la patogénesis de diferentes trastornos con manifestaciones extrahepáticas. Entre éstas se encuentran la artritis, queratoconjuntivitis, liquen plano, glomerulonefritis y crioglobulinemia mixta esencial.

La crioglobulinemia mixta esencial está fuertemente asociada con la infección por VHC y se caracteriza por la existencia de dolor muscular, artritis, fatiga, rash cutáneo, glomerulonefritis y neuropatía con diferentes asociaciones. En la mayoría de pacientes con crioglobulinemia mixta II y III se han detectado ARN y anticuerpo frente al VHC, sugiriendo que la enfermedad puede ser inducida por inmunocomplejos y complemento (48). La crioglobulinemia aparece aproximadamente en el 30% de los pacientes con hepatitis crónica.

También se ha asociado la infección por VHC con glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, (49), y más raramente se ha asociado con otras patologías como porfiria cutánea, y patologías hematológicas.(13),

## **1.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VHC es fundamentalmente serológico y se basa en la detección de los anticuerpos específicos, en cuyo caso nos indicaría la existencia de contacto con el virus. Sin embargo la detección del genoma mediante un diagnóstico molecular o la detección de proteínas estructurales (antígenos). son una importante ayuda diagnóstica ya que permite diferenciar una infección activa en aquellos pacientes susceptibles de ser tratados.

### **1.5.1 Detección de anticuerpos específicos**

#### **a. Métodos de cribado**

Como método de cribado se utiliza un **enzimoinmunoanálisis (EIA) indirecto**. No se han podido obtener proteínas nativas, con lo cual se utilizan antígenos artificiales, tanto antígenos recombinantes, obtenidos por ingeniería genética, como péptidos sintéticos. Al principio se utilizaron métodos conocidos como de 1º generación, en los que utilizaban epítomos de la proteína NS4. Posteriormente se utilizaron los de 2º generación, que utilizaban los epítomos de NS4 junto con los del core y los de la proteína NS3, de este modo se conseguía aumentar la sensibilidad pero no la especificidad. Las siguientes mejoras originaron los métodos de tercera generación, que consistieron en la adicción de los epítomos de la proteína NS5 y de una mezcla de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos para mejorar la especificidad. Actualmente lo más utilizado es una mezcla de antígenos, derivados de la región core, derivados de la proteína NS3 y NS4 y frecuentemente de NS5 (50-52).

Esta técnica tiene un problema ya que la sensibilidad la define la capacidad para detectar anti-NS3, sobre todo en estadios precoces de la seroconversión (47,51,52). La proteína NS3 posee epítomos conformacionales importantes que no se pueden reproducir con péptidos sintéticos, con lo cual hay que utilizar proteínas recombinantes, que originan reacciones inespecíficas, dando lugar los falsos positivos. Las interferencias se producen principalmente entre:

1. Restos de proteínas específicas de los microorganismos usados en la clonación (*E.coli*).
2. Proteínas portadoras, utilizadas para la expresión y purificación de los antígenos (suelen ser enzimas de origen humano).
3. Algunos antígenos como la proteína NS4 y Core, provocan reacciones cruzadas con anticuerpos heterólogos de origen y especificidad desconocidos (47).

No obstante no se puede establecer un diagnóstico de seguridad, basándose solo en las pruebas de EIA. Se pueden producir falsos positivos en sueros procedentes de Africa, pacientes hiperglobulinémicos, y en donantes de sangre. Para realizar un diagnóstico definitivo es imprescindible realizar pruebas confirmatorias, sobre todo cuando se trate de individuos asintomáticos, sin factores de riesgo, ni elevación de transaminasas. (53,54).

#### **b. Métodos suplementarios (inmunoblot)**

Estos métodos están basados en el uso individualizado de antígenos procedentes de distintas regiones del genoma viral y se enfrentan uno a uno a la muestra problema. También se pueden usar epítomos individualizados de un mismo antígeno, que son sintetizados como péptidos cortos, el inmunoblot supone la adsorción de los antígenos individuales sobre zonas diferenciadas de una matriz de papel y la realización de un ensayo de EIA sobre ese soporte. La proteína portadora de los antígenos recombinantes se incorpora a la matriz como un antígeno más, así como, algunos de los componentes del sistema marcador, de este modo se detectan las posibles reacciones inespecíficas.

Los criterios de interpretación que se utilizan son: **Negativo:** No hay reactividad o solo aparecen para la proteína portadora o cualquier otro componente no específico; **Positiva:** Cuando se detecta reactividad frente a dos o más antígenos específicos; **Indeterminada:** Cuando se detecta reactividad aislada frente a un único antígeno. Frecuentemente, esto ocurre cuando se analizan poblaciones de bajo riesgo o cuando se usan métodos poco específicos.

Las situaciones por las que se produce un resultado indeterminado pueden ser debidas a tres situaciones distintas:

1. Reacciones inespecíficas por causa de algunos de los fenómenos ya mencionados en los métodos de cribado, por tanto hay ausencia de anticuerpos específicos y de contacto con el virus de la hepatitis C. Estos casos suelen corresponder a los patrones indeterminados con reactividad aislada frente a NS4 o NS5.
2. Respuesta de anticuerpos en evolución durante la fase temprana de la seroconversión, en tal caso nos encontraríamos ante una infección aguda. Este patrón suele ir asociado a la reactividad aislada para NS3 o para la proteína Core, con lo cual habría que hacer un seguimiento para confirmar el diagnóstico.
3. Presencia de anticuerpos residuales tras una infección pasada y resuelta. En este caso es la reactividad para anti-core.

En los individuos con serologías indeterminadas, hay que precisar la situación, y para ello se han de utilizar otras pruebas como son la caracterización del grado de avididad de la IgG anti-VHC o técnicas para la detección directa del virus.

En pacientes con inmunodeficiencia humoral el diagnóstico por detección de anti-VHC puede fallar, en este caso hay que utilizar técnicas de detección del virus. En estos pacientes se pueden encontrar reactividades significativas para técnicas de inmunoblot con muestras que no reaccionan con técnicas de EIA. (47)

### **1.5.2 Detección de anticuerpos IgM**

Además de las pruebas anteriormente citadas se han investigado otros marcadores serológicos como la detección de IgM anti core del VHC. Su principal utilización es en el diagnóstico de infección aguda, pero su presencia también se asocia a infección crónica debido a su correlación con la presencia de ARN, y con la actividad histológica en la enfermedad crónica. Esta asociación no siempre es cierta en los estudios realizados (55,56)

### **1.5.3 Detección directa del VHC**

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por VHC presenta algunos inconvenientes, ya que la presencia de anticuerpos no permite discriminar entre una infección resuelta o actual. Además los anticuerpos no están presentes en el suero tras la primoinfección en los primeros días, e incluso se han descrito casos de pérdida espontánea de anticuerpos principalmente en pacientes inmunodeprimidos (13). Por todo ello ha sido necesario recurrir a métodos de diagnóstico directo para demostrar si realmente existe una infección actual por VHC. La replicación del VHC en hepatocitos origina la destrucción de la célula, lo que da lugar a la liberación de las partículas víricas al medio extracelular. Algunas de

estos viriones llegan al torrente sanguíneo, situación que hace posible el diagnóstico del virus, bien mediante la detección de su genoma o por detección de sus proteínas.

#### **a. Métodos de detección y cuantificación del genoma**

La detección de VHC-ARN, se puede realizar en varios tipos de muestras (suero, plasma, tejido hepático, y células mononucleares de sangre periférica), el tipo de muestra más utilizado con fines clínicos es el suero. En infecciones agudas no hay problema para detección del ARN viral, pero en pacientes crónicos la concentración de ARN viral es insuficiente por ello no se pueden utilizar métodos de hibridación molecular convencionales, y hay que recurrir a técnicas que amplifiquen, pudiendo amplificar la señal final tras la hibridación (branched DNA, bDNA) (57); un fragmento del ARN viral directamente (NASBA y TMA) (58,59); un fragmento del ADN complementario obtenido por retrotranscripción previa del ARN viral (reacción en cadena de la ligasa, LCR o, reacción en cadena de la polimerasa, PCR.) (60)

La PCR después de la retrotranscripción es uno de los métodos más usados. Las concentraciones habituales de ARN viral en el caso de infección crónica y sin tratamiento antiviral, oscilan alrededor de  $10^6$  UI/ml, rara vez está por debajo de  $10^4$  UI/ml. Si nos encontramos en el periodo ventana de una infección aguda, la concentración es superior y oscila entorno a  $10^8$  UI/ml.

Existe una tendencia a utilizar técnicas de RT-PCR muy sensibles capaces de detectar de 50-100 UI/ml, esto origina una serie de problemas que hacen dudar sobre el uso de las mismas. Estas técnicas más sensibles, poseen procesos de extracción más complejos, lo cual eleva los costes de materiales y de personal. Además complican el uso de espacios de trabajo y limitan la capacidad de procesamiento de muestra de laboratorio. Por último son técnicas con un elevado riesgo de falso positivos por contaminación cruzada entre muestras o por contaminación de la muestra origen, ambos casos son situaciones no controlables. Si se utilizan métodos de una menor sensibilidad ( $10^3$  UI/ml), se reducen los riesgos de contaminación, además que suelen ser técnicas de manipulación más sencilla y rápida.

La RT-PCR es una técnica que proporciona una detección fiable de la viremia en todas las fases de la infección y su limitación no es por el hecho de no diagnosticar una muestra con baja viremia, como la posibilidad de dar falsos positivos por contaminación. Por esto es una técnica que para su uso exige una determinada experiencia y resulta adecuada solo en laboratorios con un determinado perfil. A cambio sobre el uso de la RT-PCR se pueden destacar la ventaja de proporcionar una cantidad importante de un fragmento escogido del genoma viral. Seleccionando adecuadamente la región a amplificar, el producto servirá como diana de la genotipificación de la cepa. Si para la genotipificación se utiliza la hibridación reversa en tira (Line Probe Assay, LiPA) se debería usar una RT-PCR doble anidada (nested

RT-PCR) con indicadores de segunda amplificación marcados con biotina, que originan directamente un amplificado marcado y en concentración suficiente como para hacer la tipificación sin dar lugar a los problemas de interpretación de resultados.

En cuanto a la cuantificación del ARN viral o carga viral, se realiza mediante la fabricación de fragmentos de ADN con secuencias reconocidas por los indicadores utilizados en la PCR, de modo que se obtiene un material que compite con el ADN complementario, obtenido tras la retortranscripción, por la unión de los indicadores. Estas son técnicas de PCR competitiva, en las que la cantidad de ADN complementario detectado se relaciona con la cantidad de ARN viral. Los resultados obtenidos tienen una variabilidad de 0.5 logaritmos. De igual forma se podría hablar de diferencias significativas entre los distintos resultados, cuando la diferencia de concentración entre las dos muestras sea al menos un logaritmo. (60)

#### **b. Métodos de genotipado.**

En el momento actual se reconocen 6 genotipos diferentes (1-6) basándose en el análisis de la secuencia de las regiones core, E1 y NS5. Dentro de cada genotipo se reconocen varios subtipos, describiéndose más de 50. El método fundamental para la identificación de genotipos es la secuenciación del ADN amplificado a partir del ARN de diferentes regiones del VHC y la identificación de nucleótidos que están siempre conservados en un tipo particular y que no existe en los otros. Una vez efectuado este paso, es relativamente sencillo el desarrollo de métodos para el genotipaje de muestras. El ADN amplificado puede analizarse mediante secuenciación, clivaje con enzimas de restricción y electroforesis de los fragmentos de ADN (RFLP) o mediante ensayos de hibridación con sondas específicas.

Entre las técnicas del genotipado se han desarrollado las más sencillas y extendidas son las basadas en la hibridación reversa de los amplificados obtenidos mediante RT-PCR de la región 5' no codificadora. Sobre tiras de nitrocelulosa se fijan las sondas correspondientes a los diferentes genotipos, y subtipos, de forma que una misma tira permite la identificación de los genotipos y subtipos más frecuentes. Esta técnica es fácilmente automatizable y permite identificar infecciones mixtas por varios genotipos, siempre que la concentración del genotipo sea como mínimo el 1% del total de amplificados presenta también problemas porque a veces no permite discriminar algunos subtipos como el 2a y el 2c. (13)

#### **c. Métodos de detección y cuantificación de antígenos**

Estas técnicas, al igual que en el caso de otros virus, van a estar basadas en el uso de anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos víricos específicos. La técnica más usada para detectar virus en fluidos corporales es un EIA de captura, ya sea en formato convencional o con sistemas de amplificación de la señal. Generalmente los antígenos víricos presentes en



los fluidos corporales no están de forma libre, salvo excepciones como los Hepadnavirus, sino que se encuentra incorporados a las partículas víricas completas o defectivas, de modo que es necesario disgregar las partículas antes de su detección.

El VHC provoca una infección que no induce altos niveles de viremia, con lo cual los procedimientos de detección de antígenos no se pudieron realizar con éxito hasta 1992 (61,62). La diana para dichos ensayos fue la proteína Core, pues es la más abundante en el virión y cuyo epítipo inmunodominante se halla bien conservado en las distintas cepas y son bien conocidos. Los estudios eran prometedores y no fue hasta 1999 cuando surgió el primer método de detección de antígeno core del VHC (VHC-Ag) en suero.

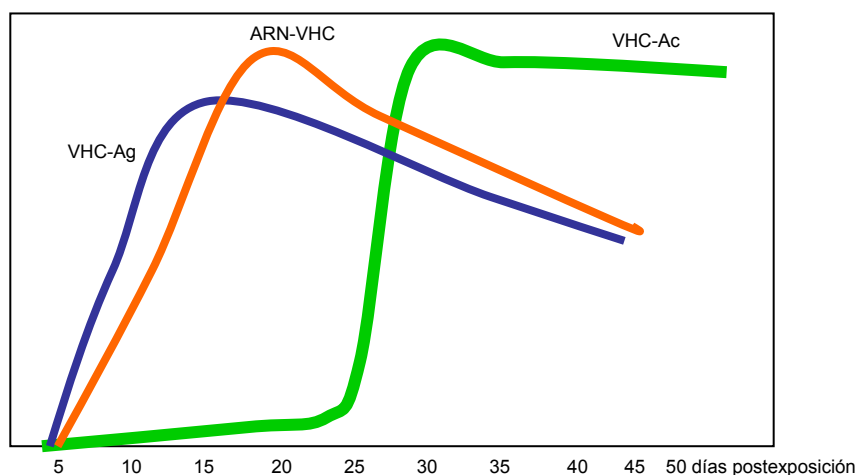
Este método originariamente (63) se mostró capaz de detectar concentraciones de hasta 0.06pg/ml de VHC-Ag recombinante, concentración que estimada mediante PCR correspondía aproximadamente 500 copias/ml. Además el método era capaz de detectar infecciones por cinco subtipos de VHC diferentes (1a, 1b, 2b, 3a, y 3c), siendo las correlaciones con respecto a las muestras positivas obtenidas por PCR de un 94.5%-96%, lo que ponía de manifiesto su excelente sensibilidad analítica y clínica. Otras de las ventajas fue el hecho de que el método no se vio afectado por la presencia de anticoagulante en la muestra (EDTA, Heparina, Citrato) ni por otras sustancias que pueden interferir en este tipo de ensayos como son hemoglobina, el factor reumatoide y las concentraciones elevadas de bilirrubina y lípidos. En cuanto a los aspectos cuantitativos, el rango de respuesta lineal era amplio y el coeficiente de variación fluctuó entre el 4.0 y el 7.9%. En la discusión de resultados se argumentaban una serie de ventajas: menor sensibilidad a interferencias por contaminación cruzada de muestras; total insensibilidad a sustancias que inhiben las reacciones de amplificación genómica; mayor estabilidad de diana; menor variabilidad entre ensayos; menor coeficiente de variación en la cuantificación; mayor capacidad de procesamiento de muestras; menor coste; tecnología fácilmente automatizable, así como familiar para cualquier laboratorio de diagnóstico o banco de sangre. Según los autores el éxito se basaba en el uso de anticuerpos monoclonales seleccionados por su alta afinidad y por su capacidad de capturar el antígeno en presencia de SDS.

El primer método de detección de VHC-Ag solo ofrecía la posibilidad de detectar el antígeno durante el periodo ventana de la infección aguda en ausencia de anticuerpos ya que cuando éstos aparecen coexistían en el suero partículas víricas circulantes con concentraciones variables de anticuerpos específicos frente a sus distintas proteínas. Al disgregar los viriones para liberar los antígenos, éstos serían rápidamente acomplejados por sus anticuerpos específicos y no se les podrían detectar, a menos que se incluyera algún componente que previera la formación de inmunocomplejos o algún procedimiento para destruirlos. Por este motivo, aún cuando el método prometía en la detección de VHC-Ag en el

periodo ventana de donantes de sangre, esta limitación impedía su uso generalizado par fines diagnósticos. (64,65).

Posteriormente con el uso de la combinación adecuada de agentes detergentes durante el proceso de liberación del VHC-Ag presente en la muestra, se consiguió inhibir la formación espontánea de inmunocoplejos, para poder detectar eficazmente el antígeno liberado de los viriones (63). Este paso se optimizó y estandarizó para obtener el nuevo método detección del VHC-Ag en suero, capaz de detectar la viremia en cualquiera de las fases de la infección. Recientemente este método se ha comercializado bajo la denominación “antígeno core total del VHC”. En los primeros estudios para su estandarización para uso clínico, el método detectaba 2.3 pg/ml de VHC-Ag recombinante, nivel que se estimo equivalente a  $5 \times 10^4$  UI/ml, medidas por PCR(66) y a  $8 \times 10^3$  eqg/ml, medidos por el método TMA(65). En posteriores evaluaciones realizadas sobre muestras de pacientes en distintos estadios de la infección, las conclusiones respecto a la sensibilidad analítica del método se confirmaron (67). No obstante estudios más recientes han mostrado que es posible reducir la detección hasta 1.5 pg/ml sin pérdida apreciable de especificidad (68) por lo que se mejora su sensibilidad analítica.

El parámetro que define la sensibilidad real de una técnica de diagnóstico, es su capacidad de detectar la presencia de la diana cuando se estudian muestras de pacientes que son positivos por otras técnicas bien conocidas, este parámetro recibe, normalmente, el nombre de **sensibilidad clínica**. En el caso de esta técnica existen datos que permiten estimar su sensibilidad clínica en distintos estadios de la infección. Durante el periodo ventana, la sensibilidad clínica con respecto al PCR ha sido del 100% en tres estudios independientes (67) que han sumado 68 pacientes. La reducción del periodo ventana estimada para la prueba es de 32.7 días, con un retraso de 0.6 a 3.8 días respecto de las técnicas más sensibles de PCR (69). Estos resultados han sido mejorados por el método de segunda generación (64,65) confirmando que la detección de VHC-Ag es una alternativa perfectamente válida para el cribaje de hemodonaciones en los bancos de sangre, cuyo uso rutinario permitiría reducir teóricamente a cero el riesgo residual de transmisión de VHC por transfusión. (Figura nº 14).



**Figura nº 14:** Sensibilidad de VHC-Ag en la seroconversión.

La sensibilidad clínica durante la fase crónica de la infección se ha estimado a partir del estudio de muestras basales de pacientes sometidos a un tratamiento antiviral y de muestras tomadas de pacientes con hepatitis C crónica e individuos seropositivos asintomáticos. En estos casos las correlaciones respecto a PCR han fluctuado, entre el 88.5 y el 100% (63,68) sobre un total de 402 pacientes estudiados.

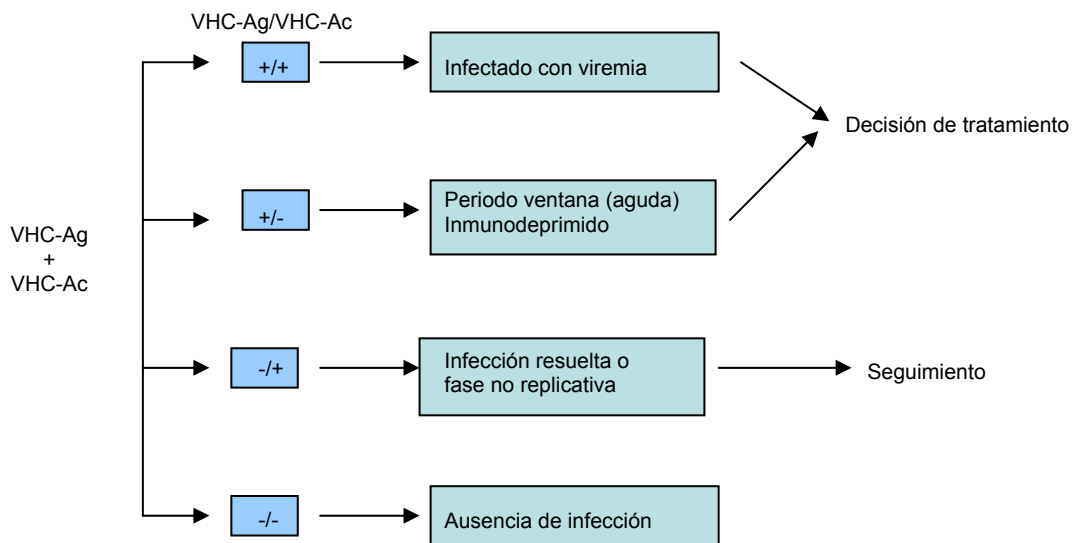
En esos u otros estudios (68, 69, 70), el método se ha mostrado capaz de detectar, con la misma eficacia, infecciones debidas a los seis genotipos principales del VHC, incluyendo 12 genosubtipos diferentes. Esta sensibilidad se acompaña de una especificidad estimada entre el 99.2 y 99.9% tras estudiar más de 1350 muestras negativas (69). En general se ha observado que los fallos en la detección de positivos por PCR se producen en muestras con viremias en el orden de  $10^3$  copias /ml o inferiores a dicho orden. De este modo se demuestra la capacidad del método para detectar la presencia del virus en suero, incluso después de completada la seroconversión y además dicha capacidad es similar para los seis genotipos conocidos.

Con la prueba de VHC-Ag total se pueden ofrecer resultados cuantitativos, es suficiente con incluir unos estándares con los que construir una curva de calibración a la que referir las lecturas obtenidas para las muestras, proceso que puede automatizarse en su totalidad. Una de las posibles utilidades sería en la monitorización virológica de los tratamientos. La correlación global entre esta prueba y la PCR cuantitativa fluctúa entre el 82.1 y el 100% (68,71) para la muestra final y entre el 87 y el 100% para la clasificación final de los pacientes respecto a su respuesta al tratamiento. Además la prueba tiene una especificidad del 99% y coeficiente de variación entre el 7 y el 33%, ofreciendo la ventaja conceptual de trabajar directamente sobre la diana primaria, sin realizar transformaciones ni ampliaciones previas a su detección y medida. En la fase temprana del tratamiento (primeras 4-6 semanas) las correlaciones son siempre altas, por lo que se ha destacado la utilidad de la prueba para la identificación temprana de los respondedores rápidos (72) y para la predicción precoz de la respuesta y de la ausencia de respuesta a corto plazo. Las discrepancias de resultados se acumulan a momentos intermedios del seguimiento, pues por cuestiones relacionadas con su sensibilidad analítica y debido a las viremias de bajo nivel que inducen en las fases intermedias del tratamiento, se podría ver afectada la capacidad del método para identificar a los pacientes respondedores que experimentarán con mayor probabilidad recaídas tras la suspensión del tratamiento (68).

Podríamos resumir diciendo que la prueba de detección de VHC-Ag total es una alternativa sólida a los actuales métodos de amplificación genómica en muchos aspectos del diagnóstico y seguimiento de la infección aguda y crónica producida por el VHC y en la monitorización virológica de los pacientes sometidos a tratamientos antiviral. (Tabla nº 2 y Figura nº 15).

**Tabla nº 2: Utilidad de la detección de VHC-Ag como marcador de viremia.**

- ✓ Diagnóstico precoz de la infección aguda, periodo ventana, inicio de seroconversión. Bancos de sangre
- ✓ Vigilancia rutinaria de pacientes en riesgo. Unidades de Hemodiálisis.
- ✓ Diagnóstico de la infección neonatal y perinatal.
- ✓ Diagnóstico de infección crónica.
- ✓ Seguimiento y monitorización del tratamiento específico.



**Figura nº 15: Utilidad de la detección de antígeno en el diagnóstico de la infección por VHC.**

## 1.6 EPIDEMIOLOGÍA

### 1.6.1 Transmisión del VHC

El Virus de la hepatitis C es un agente cuyo mecanismo de transmisión mas eficaz es la vía parenteral. La puerta habitual es la inoculación directa de material infeccioso, a través de heridas abiertas, cortes en la piel, daño en mucosas o por inyección intramuscular o intravenosa. Los grupos de riesgo en países desarrollados son drogadictos por vía parenteral, y ocasionalmente receptores de transfusiones de factores de coagulación o hemoderivados, pues existen portadores seronegativos en periodo de incubación. También se produce un porcentaje que oscila entre 4%-10% en personal sanitario. Del mismo modo hay que tener cuidado con prácticas como la acupuntura. En países subdesarrollados la mayoría de las veces la transmisión parenteral es causa del uso de materiales médicos no desechabais.

Otros mecanismos menos eficaces son la transmisión sexual que es una vía de entrada poco habitual, y se piensa que sea una vía parenteral encubierta debido a que la mucosa genital no esté íntegra o esté dañada por algún proceso inflamatorio (73,74), la transmisión perinatal o neonatal es de baja eficacia, y está restringida a ciertos estados inmunodepresores de la madre, por ejemplo infección con VIH (75). En este virus se descarta la transmisión por la lactancia materna (76).

Existen casos de personas infectadas en los que no se explica la transmisión, estos casos se engloban bajo el nombre "transmisión microparenteral inadvertida". No obstante no se descartan otras vías aún no conocidas aunque los artrópodos como vectores quedan descartados, por la no existencia de datos que avalen dicha hipótesis. (77).

### **1.6.2 Prevalencia del VHC**

Globalmente, se estima que existen 170 millones de portadores de VHC en el mundo (el 3% de la población mundial) y que cada año infectan entre tres y cuatro millones de personas. En la Unión Europea, los datos recogidos estiman la existencia de entre 2.5 y 5 millones de seropositivos, siendo los de la región Mediterránea y los de mayor población (Alemania y Reino Unido) los que contribuyen con más casos a la estimación. Asumiendo que el 80% de los seropositivos albergue la infección crónica, existirían entre 2 y 4 millones de personas capaces de transmitir el virus, y por tanto serían pacientes que requerirían asistencia y podrían ser candidatos a un tratamiento específico.

El VHC es un agente ubicuo y la infección por VHC existe en todas las regiones del mundo. Normalmente la infección por el virus de hepatitis C es de naturaleza endémica, pero con cierta frecuencia se producen brotes epidémicos que afectan a poblaciones concretas. Hasta ahora los brotes que se han podido documentar se han visto asociados a ciertas prácticas médicas, como son transfusiones sanguíneas y de hemoderivados, hemodiálisis ó actos quirúrgicos. Dichos brotes fueron comunes y amplios en pacientes receptores de factores de coagulación, pacientes con hemofilia y otras coagulopatías. Más puntuales fueron los brotes en entre receptores de gammaglobulinas endovenosas (78,79).

Las nuevas normas que exigen un estricto control mediante procedimientos sensibles a la detección directa del VHC en hemodonaciones, han eliminado, teóricamente, la transmisión transfusional del VHC. Hoy día la hemodiálisis continua siendo una práctica de riesgo, que origina brotes locales. En cuanto a la cirugía y otras prácticas invasivas, es sabido que han sido causa de brotes a través de distintas fuentes y vías (80,81). No obstante hay países como Egipto en los que se ha llegado alcanzar una prevalencia del 15-20%, como consecuencia de una campaña de lucha contra la esquistosomiasis en la que se utilizó un fármaco inyectable (82).

La incidencia de casos de hepatitis C crónica y la prevalencia de anticuerpos frente al VHC, en donantes de sangre, ponen de manifiesto una distribución geográfica desigual de la prevalencia, el Extremo Oriente y la Cuenca Mediterránea parecen ser las zonas de mayor endemia, seguida de África Subsahariana que también se está revelando como zona altamente endémica. En las zonas tropicales de América la endemia es muy baja para el VHC, pero con alta endemia para el VHB y VHD, lo que pone de manifiesto el riesgo de que el VHC penetre en estas poblaciones mediante programas de atención de salud en desarrollo.

En España, la prevalencia de anti-VHC en donantes de sangre al comienzo de su cribado se estimó en torno a 1%, habiendo caído actualmente por debajo de 0.1% en la actualidad. Los estudios de prevalencia de anticuerpos frente al VHC en muestras representativas de la población general son muy escasos. Se dispone de datos recogidos en la Comunidad de Madrid y en Cataluña (83,84). En la tabla nº 3 se exponen los resultados obtenidos en los estudios referentes a la Comunidad de Madrid y al conjunto del Estado.

**Tabla nº 3: Prevalencia de infección por VHC en España**

Edad (Años)	Madrid 1994	España 1996
2-5	0	-
6-10	0	-
11-15	0	-
16-20	0.8	0.6
21-30	3.7	1.8
31-40	3.9	3.2
41-60	2.4	-
16-60	2.8	1.9

En el primer estudio no se detectan seropositivos en la edad pediátrica, aumentando la prevalencia hasta alcanzar su máximo entorno a los treinta años de edad. En la población adulta, considerando como tal a los mayores de veinte años, la prevalencia global de anticuerpos supera el tres por ciento. El global de la población adulta española, está cercano al 2%.

En tanto en cuanto no se generen nuevos datos con los que poder comparar, no se sabrá si estas curvas reflejan las pautas actuales de circulación del virus o si corresponden a la circulación en grupos de menor edad en años previos a su descubrimiento, época en la que era frecuente el uso de material reusable, administración de medicamentos inyectables, drogas ilícitas inyectables, etc. Haciendo una extrapolación muy prudente de estas cifras a la población, se estima que el número de portadores crónicos no es inferior a trescientos mil.

Como agente de transmisión preferentemente parenteral, las prevalencias más altas de infección por VHC se observan en las personas con antecedentes de adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) y en las sometidas a tratamientos médicos de riesgo. Los datos recogidos por la European Surgery on Hepatitis C (ESHHC) en los países de la Unión Europea asignan a la drogadicción la mayor parte de los casos de infección por VHC, alcanzando en los países nórdicos más del 70% del total de casos estimados (85).

Como ya se indicó al hablar de los mecanismos de transmisión, ni la vía materno-fetal, ni la sexual parecen que juegue un papel importante en la epidemiología del virus, aunque si parece que exista un mayor riesgo entre los trabajadores sanitarios (86).

### **1.6.3 Prevalencia de genotipos**

Aunque no se pueda decir que los diferentes genotipos del VHC sean exclusivos de regiones geográficas concretas, las prevalencias existentes entre las distintas regiones no presentan diferencias significativas. El genotipo 1 se encuentra distribuido por todo el mundo, pero el subtipo 1a es el prevalente en buena parte de Europa y en América, mientras que el genotipo 1b es más frecuente en la Europa Mediterránea y en el Extremo Oriente, incluyendo a China y Japón. En el Reino Británico, India y Australia, las prevalencias de los genotipos 1a y 3 son parecidas. Del mismo modo podríamos hablar de una elevada prevalencia del genotipo 3 entre las personas ADVP, infectadas a través del uso compartido de jeringuillas, con independencia de cualquier otro factor. Parece probable que el subcontinente Indio haya sido origen de un linaje propio de cepas de VHC, genotipo 3 y las cepas descritas como genotipo 10, y desde allí habrían irradiado hacia el Reino Unido, introduciéndose más tarde en la población ADVP y estableciendo un ciclo epidemiológico cerrado.

El genotipo 6 constituye un formidable complejo de cepas de VHC, que aún teniendo un claro origen común, presentan suficientes diferencias como para que en estudios posteriores se establezcan nuevos genotipos. Toda esta diversidad es consecuencia de su larga historia evolutiva. Este genotipo es característico del Sudeste Asiático. África es otro de los lugares geográficos en los que el VHC ha sufrido una diversificación. En esta región se encuentra como genotipos característicos el 4 y el 5, además del subtipo 1c del genotipo 1 y varios subtipos del genotipo 2.

En España el genotipo más prevalente es el 1b (87), a excepción de los ADVP, en los cuales los genotipos más frecuentes son el 1b y el 3 (88,89). Al igual que en el resto de la Europa Mediterránea, el genotipo 4 no es raro, alcanzando una prevalencia que ronda el 2%. El genotipo menos frecuente en nuestro país es el genotipo 5, aunque se han documentado

portadores que viven en ámbitos rurales y no refieren haber viajado fuera de España. (Tabla nº 4).

**Tabla nº 4: Distribución de genotipos del VHC.**

<b>Genotipos</b>	<b>Pacientes con hepatitis C crónica</b>	<b>Donantes de sangre</b>
1a	45 (10.0%)	38 (8.7%)
1b	326 (72.4%)	344 (79.1%)
2	9 (2.0%)	14 (3.2%)
3	30 (6.7%)	18 (4.1%)
4	11 (2.4%)	8 (1.8%)
5	0	3 (0.7%)
1a + 1b	10 (2.2%)	5 (1.1%)
1 + 2	11 (2.4%)	1 (0.2%)
1 + 3	8 (1.8%)	0
1 + 4	0	4 (0.9%)
Total	450	435

Los datos de prevalencias obtenidos en España, sugieren que los primeros genotipos que se introdujeron fueron el 1b y el 2, existiendo un claro predominio del primero entre los portadores actuales de edad superior a 50 años. Posteriormente y debido a la drogadicción se introdujeron los genotipos 1a y 1b hace aproximadamente 25 años. El genotipo de más reciente introducción ha sido el genotipo 4 (90).

La reinfección por VHC es posible en personas con alto riesgo de exposición al virus y puede suceder en aquellas que ya albergan una infección crónica. Si se produce una reinfección, esta sucede por una cepa de distinto tipo o subtipo con resultado de persistencia, se pueden desarrollar infecciones persistentes mixtas debidas a dos o más cepas diferentes, lo que no es raro en pacientes ADVP. Tres situaciones pueden responder a reinfecciones que no dan lugar a coinfección documentable: Reinfección en un individuo que elimino la infección anterior; Reinfección con resultado de aclaración del segundo virus; Predominio claro de uno de los dos tipos coinfectantes, que puede impedir la detección del tipo minoritario. Todas estas situaciones pueden llevar a subestimar la frecuencia de la reinfección en una población concreta.

## **1.7 TRATAMIENTO**

El objetivo del tratamiento de la hepatitis C es prevenir la progresión de la enfermedad y modificar su historia natural. El tratamiento de la infección causada por el VHC, es complicado, ya que el desarrollo de causiespecies o mutantes frente a los anticuerpos neutralizantes del huésped, origina la presencia de diferentes virus en un mismo paciente.



Además hay que considerar que los anticuerpos formados frente a un genotipo concreto, no confieren inmunidad frente a los otros genotipos. En un principio se pensó que existían unos genotipos más patógenos que otros, pues se observó que el genotipo 1b era más prevalente entre los pacientes con hepatitis crónica, pero en cuanto se pudo observar mejor la distribución geográfica de los genotipos, se comprobó que en las regiones en las que sucedía esto, el genotipo 1b era el más prevalente, cuando se estudiaban portadores crónicos no seleccionados por el hecho de sufrir una hepatitis crónica

En general, se recomienda iniciar el tratamiento antiviral en los pacientes que presenten anomalías que hacen que al hepatitis pueda evolucionar hacia una cirrosis, tales como; anticuerpos anti-VHC positivos con elevación persistente de la ALT, presencia de ARN del VHC, presencia de fibrosis hepática o cierto grado de inflamación o necrosis en la biopsia hepática (91).

Durante algunos años se han estado valorando los niveles de transaminasas como respuesta al tratamiento. En la actualidad se utiliza la determinación de ARN sobre todo después de recibir tratamiento combinado con interferón (INF) más ribavirina (RBV), ya que el tratamiento con RBV puede normalizar los valores de ALT sin modificar la viremia. Por este motivo en la actualidad se utiliza la determinación del ARN del VHC para confirmar la positividad al VHC y como indicador de eficacia terapéutica en los ensayos clínicos. En función de la evolución de estos indicadores, se establecen tres niveles de respuesta, respuesta viral sostenida, respuesta con recaídas y ausencia de respuesta (92,93). (Tabla nº 5).

**Tabla nº 5: Clasificación de la respuesta tras tratamiento de la infección VHC.**

<b>CLASIFICACIÓN DE LA RESPUESTA</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
Respuesta viral sostenida	Negativización del ARN-VHC 6 meses después de suspender la terapia (90 a 95% de estos pacientes mantendrán la negativización a largo plazo)
Respuesta con recaídas	Desaparición temporal del ARN-VHC durante el tratamiento, pero volviendo a ser positivo 6 meses después de suspender la terapia
Ausencia de respuesta	Persistencia del ARN-VHC durante la terapia y al finalizar la misma

Los factores positivos que pueden ayudar a la predicción positiva de la respuesta terapéutica son; carga viral baja, genotipo viral 2 o 3, ausencia fibrosis, sexo femenino y edad inferior a los 40 años. En contraposición los factores negativos son; carga viral elevada, genotipo viral 1, fibrosis, sexo masculino y edad superior a los 40 años. En algunos pacientes puede aparecer más de un factor, y aunque no constituyen el único elemento de decisión para decidir la conveniencia del tratamiento, si que permite obtener una orientación al respecto, ayudando a decidir la indicación del tratamiento en los casos dudosos (94).

En la década de los 90 el tratamiento para hepatitis C crónica, consistía en la administración de Interferón alfa (INF) en monoterapia, pero la eficacia de este tratamiento era solo a corto plazo, pues aproximadamente el 40-50% de los pacientes al finalizar el tratamiento recidivaban, y solo el 10-15% presentaba una respuesta duradera. En 1999 comenzó a utilizarse una terapia combinada en la que utilizaban INF alfa-2a o alfa-2b junto a un nucleósido sintético, la ribavirina (RBV) (95,96). Con esta terapia combinada se consiguió incrementar los índices de respuesta viral sostenida al doble. En un estudio realizado en 912 pacientes, tras 48 semanas de tratamiento con INF sólo, la respuesta viral sostenida fue de un 13%. Cuando se adicionó RBV la respuesta viral sostenida se incremento hasta un 38%. De este modo se puso de manifiesto la ventaja del uso de INF+RBV en el tratamiento de la hepatitis C (97). Se ha podido demostrar que la respuesta al tratamiento con interferón, solo o combinado con ribavirina, es significativamente mejor cuando el genotipo infectante es diferente del genotipo 1 y aun mejor si el paciente esta infectado por una cepa del genotipo 3, originándose respuestas viral sostenida en el 70-80% de los casos, mientras que si el genotipo infectante es el 1, la respuesta viral sostenida solo en 42-51% de los casos. Se ha estudiado que los pacientes con infección crónica por este último genotipo, suele acompañarse de un nivel de viremia inferior al que se encuentra en las infecciones debidas a otros genotipos, normalmente, un nivel basal de viremia bajo predice una mejor respuesta al tratamiento, es por este motivo por el que la determinación del genotipo infectante se ha convertido en un dato importante para decidir si un paciente con hepatitis C crónica es un buen candidato a tratamiento, y para establecer las pautas del mismo.

El uso de esta terapia combinada no siempre es eficaz, siendo frecuente tener que interrumpir el tratamiento por los efectos adversos o por problemas en el cumplimiento, pues dicho tratamiento precisa la administración subcutánea de INF tres veces por semana durante 6 a 12 meses, así como la administración de RBV oral dos veces al día.

La duración del tratamiento con INF + RBV en los pacientes infectados por el genotipo 2 o 3 puede limitarse a 24 semanas, mientras que en pacientes infectados por el genotipo 1 es preciso aumentarla hasta 48 semanas. Mediante la determinación de la carga viral se puede valorar los resultados del tratamiento, de modo que si a los 6 meses de comenzar la terapia combinada se detecta presencia de ARN de VHC, puede optarse por la suspensión del tratamiento, pues la posibilidad de alcanzar una respuesta viral sostenida tras completar el tratamiento es muy baja. (94, 95, 98).

Más recientemente, las opciones terapéuticas de tratamiento se han ampliado tras la comercialización en EE.UU y en la unión Europea del interferón pegilado o peginterferón (pegINF) para utilizarlo en combinación con RBV. El pegINF está constituido por INF estándar unido a polietilenglicol. La pegilación del INF disminuye su aclaramiento renal, prolonga su vida

media y aumenta sus concentraciones plasmáticas. Existen dos tipos de pegINF; pegINF alfa-2b y pegINF alfa-2a, ambos para su utilización junto a RBV. En los pacientes con genotipo 2 y 3 se debe tratar durante 24 semanas y los pacientes con genotipo el tratamiento se debe prolongar 48 semanas para obtener un mayor porcentaje de pacientes con respuesta sostenida. Al administrarse una sola inyección semanal, se ha conseguido un mejor cumplimiento del mismo y por tanto una mejor respuesta virológica. (95,96)

En cuanto a la eficacia tratamiento con pegINF + RBV lo demuestran diversos estudios realizados con más de 2500 pacientes en los que se compararon la terapia combinada de INF + RBV frente a la terapia pegINF + RBV obteniéndose siempre resultados similares (99, 100, 101). El primer ensayo clínico se realizó 1530 pacientes con hepatitis C, distribuidos en tres grupos diferentes de tratamiento: INFalfa-2b (3MU, 3 veces por semana) + RBV oral (1000-1200 miligramos/día); pegINFalfa-2b (1'5 g/kg/semana) + RBV (800 miligramos/día) y el tercer grupo fue pegINFalfa-2b (0'5 g/Kg./semana tras una fase inicial de 1'5 g/Kg./semana durante 4 semanas)+RBV (1000-1200 mg/día durante 48 semanas). Como criterio de evaluación se utilizó la proporción de pacientes que alcanzaron una respuesta viral sostenida en la semana 24 de seguimiento, siendo esta proporción del 54% en el grupo que recibió las dosis más elevadas de pegINF, frente al 47% en los grupos que lo recibieron a dosis más bajas o que fueron tratados con INF. No obstante, cuando se estudió los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC, se observó que las diferencias entre los distintos tratamientos eran más notoria, consiguiendo índices de respuesta viral sostenida del 42%, 34% y 33% respectivamente. Por el contrario el 80% de los pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 obtuvieron una respuesta viral sostenida, independientemente de los grupos de tratamiento (100).

Existen otros ensayos clínicos en los que se compara pegINFalfa-2<sup>a</sup> + RBV frente a INFalfa-2b + RBV y frente a INFalfa-2<sup>a</sup> sin RBV, en los que se obtuvieron los siguientes resultados; a las 24 semanas de finalizar el tratamiento el grupo 1 presentó una respuesta viral sostenida de 56%, frente al 44% del grupo 2 y frente al 29% del grupo 3. En los pacientes infectados por el genotipo 1 la respuesta viral sostenida fue del 46% del grupo 1, 36% en el grupo 2 y 21% en el grupo 3. En este caso se estudió los niveles basales del RNA del VHC y se observó que la tasa de respuesta en cada uno de los grupos fue respectivamente del 41%, 33% y 13%.

En el momento actual, los esquemas terapéuticos propuestos para incluir en la terapia combinada estándar como más eficaces son: pegINF alfa-2b (1.5 g/Kg/semana) + RBV; pegINF alfa-2<sup>a</sup> (180 g/semana) + RBV. En ambos casos la dosis de RBV sería: 800 mg/día en pacientes con un peso inferior a 65 Kg; 1000 mg/día en pacientes con un peso de 65-85 Kg; 1200 mg/día en pacientes con un peso superior a 85 Kg. La optimización clínica de los resultados se consigue ajustando el tratamiento combinado de pegINF alfa-2b (1.5

g/Kg/semana) + RBV al peso corporal de los pacientes, siendo este ajuste de 1.5 g y 10,6 mg, respectivamente, por cada Kg (99).

En nuestro medio la dosificación de RBV se establece en función del genotipo, de modo que pacientes con genotipo 1 recibían dosis de 1000-1200 mg/día, mientras que los pacientes infectados con los genotipos 2 o 3 recibían una dosis de 800 mg/día. Los genotipos infectantes también van a influir en la duración del tratamiento, de modo que en los pacientes infectados por el genotipo 1, la duración del tratamiento será de 48 semanas y será de 24 semanas para los pacientes infectados por el genotipo 2 o 3 (102).

Existen contraindicaciones y reacciones adversas asociadas al tratamiento combinado, que pueden impedir el cumplimiento del mismo, en los ensayos clínicos realizados entre un 10-14% de los pacientes se han visto obligados a suspender el tratamiento como consecuencia de los efectos adversos (102). En general suelen ser de carácter moderado o leve y desaparecen al suspender la medicación. Entre los efectos secundarios cabe destacar: síntomas pseudogripales, alteraciones hematológicas (neutropenia y trombopenia) y trastornos neuropsiquiátricos (desde irritabilidad hasta depresión grave) (98,99). Estos efectos adversos observados con pegINF son similares a los observados con INF (99,102). Con relación a la RBV, la principal reacción adversa asociada a su uso es la aparición de anemia hemolítica, aunque también puede surgir náuseas, sequedad de la piel, tos e hiperuricemia (99). La RBV es un fármaco teratogénico, con lo cual está contraindicado en mujeres embarazadas, recomendándose en pacientes en edad fértil la utilización de un método anticonceptivo eficaz hasta seis meses después del tratamiento (99, 103). La terapia combinada está contraindicada en pacientes que presentan alteraciones neuropsiquiátricas graves, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares, hemólisis, mielosupresión, alcoholismo o drogadicción e insuficiencia o trasplante renal (94, 104).

Con la terapia combinada, un 50% de los pacientes responden, pero más de la mitad recaen cuando se suspende el tratamiento, por lo que solo un 20% de los pacientes tiene una respuesta viral sostenida. Los pacientes que no han logrado una respuesta viral sostenida pueden beneficiarse de un re-tratamiento basado en la utilización de pegINF. En diferentes ensayos clínicos se ha visto que sólo del 15% al 20% de los pacientes que no han respondido al tratamiento con INF estándar más RBV alcanzan una respuesta viral sostenida al recibir tratamiento con pegINF + RBV, obteniéndose mejores resultados los pacientes infectados por el genotipo 2 o 3, que los pacientes infectados por el genotipo 1 (102).

Con gran frecuencia los ADVP infectados por VIH, también están infectados por VHC, tras el éxito de las terapias antirretrovirales de alta eficacia, el Plan Nacional del SIDA recomienda considerar el tratamiento de la infección por VHC en los pacientes que satisfagan ciertos criterios de respuesta positiva a los antirretrovirales, y entre las recomendaciones

específicas esta el hecho de estar infectado por una cepa del genotipo 3, que constituye en si mismo un criterio de inclusión. El genotipo 3 es altamente prevalente entre los pacientes ADVP. Éstos, son pacientes inmunodeprimidos, por lo que la evolución a cronicidad y la progresión a fibrosis y cirrosis es más rápida, aumentando la mortalidad entre este grupo de pacientes (99,102,105). Además son pacientes en los que se detecta una mayor concentración de ARN del VHC. A pesar de todo no se ha establecido una terapia específica, pero existen estudios (106) en pacientes con infección por VIH estable y con enfermedad hepática controlada, cuyos resultados preliminares indican que existe una mejor respuesta, cuando se utiliza un tratamiento combinado de pegINF + RBV en vez de un tratamiento combinado de INF estándar + RBV. En cualquier caso el tratamiento en estos pacientes se establece de forma individualizada y realizando un seguimiento para evitar la aparición de efectos adversos e interacciones (102).

---

## 2. Objetivos

---

Según lo expuesto en el capítulo de introducción que antecede, aún quedan muchos aspectos por esclarecer relacionados con la utilidad del antígeno core del virus de la hepatitis C, su sensibilidad clínica, su papel en la vigilancia rutinaria de pacientes en riesgo e inmunodeprimidos y su utilidad en el seguimiento y monitorización del tratamiento de las hepatitis C crónicas.

Basándonos en esto, los objetivos planteados para la realización de la presente Tesis Doctoral han sido.

1.-Validar la técnica de detección de VHC-Ag, en pacientes con sospecha de infección por el virus de la hepatitis C (VHC). Valora su sensibilidad clínica respecto al ARN del virus de la hepatitis C y analizar si la misma se ve influenciada por el genotipo infectante.

2.-Evaluar su aplicación como marcador de diagnóstico precoz en pacientes hemodializados que como consecuencia de la uremia crónica manifiestan una inmunodeficiencia que puede limitar su respuesta inmunológica. Valorar su utilidad como marcador directo de infección viral en dichos pacientes y seropositivos frente al VHC. Analizar su utilidad en la vigilancia periódica de estos pacientes.

3.-Valorar el comportamiento del antígeno core del virus de la hepatitis C en el seguimiento y monitorización del tratamiento de pacientes con hepatitis crónica producida por el virus de la hepatitis C. Analizar su utilidad como indicador de respuesta terapéutica y su posible asociación con los factores predictivos de la misma

---

## 3. Pacientes y Métodos

---



### 3.1. PACIENTES

Para cumplir el primer objetivo hemos seleccionado sueros positivos para VHC en los que se ha determinado el ARN-VHC y el antígeno de la cápside VHC que constituyen el **Grupo 1**.

Para cumplir el resto de los objetivos hemos seleccionado pacientes que en función de su situación clínica hemos dividido en cuatro grupos:

**Grupo 2:** constituido por 60 pacientes con insuficiencia renal crónica y sometidos a hemodiálisis periódica en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. De ellos 35 son varones (58.3%) y 25 mujeres (41.7%), la edad media fue de 61.1 años y la media del tiempo en diálisis de 35.57 años. En 10 seropositivos para el VHC (16.66%) y se realizó un estudio retrospectivo y prospectivo, analizándose un total de 78 muestras. En los 66 pacientes negativos para VHC, se realizó un seguimiento serológico en 32 de ellos, analizándose un total de 82 muestras.

**Grupo 3:** constituido por 51 pacientes coinfectados por el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la Hepatitis C (VHC), atendidos en el Servicio de Infecciosos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. De ellos 39 son varones (76.5%) y 12 mujeres (33.5%), la edad media fue de 39.31 años.

**Grupo 4:** constituido por 14 pacientes con hepatitis crónica por VHC, y atendidos en el Servicio de Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. De ellos 9 son varones (64.3%) y 5 mujeres 35.7 (%), la edad media fue de 37.30 años. Cinco de ellos fueron sometidos a tratamiento con Interferón y 9 a tratamiento con interferón y Ribavirina. La duración del tratamiento en 3 pacientes fue de 6 meses y en 11 pacientes de 12 meses. Se obtuvieron muestras intra y postratamiento con un total de un total de 70 muestras.

**Grupo 5:** constituido por 15 pacientes con hepatitis crónica por VHC y atendidos en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. De ellos 8 son varones (53.3%) y 7 mujeres (46.7%), la edad media fue de 37.6 años. Todos ellos fueron tratados con Interferón pegilado y Ribavirina. La duración del tratamiento fue de 6 meses en los pacientes con genotipo 3, y un año para los pacientes con genotipo 1 y 4. Se obtuvieron muestras intra y postratamiento con un total de un total de 175 muestras

## **3. 2.MÉTODOS**

### **3.2.1. Detección de Antígeno de la cápside de VHC (VHC-Ag)**

La medición del antígeno core total de la nucleocápside del VHC se ha realizado mediante un inmunoensayo cuantitativo en microplaca en suero o plasma humano, en presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHC (Ensayo Ortho® trak-C™). Es un inmunoensayo manual en dos pasos que usa varios anticuerpos monoclonales con especificidad por diferentes regiones del antígeno core VHC. Los anticuerpos monoclonales que recubren la superficie de la microplaca capturan el antígeno, y posteriormente los fragmentos Fab de los anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa de rábano se unen con el antígeno capturado. Previamente al ensayo, el procedimiento consta de una etapa de pretratamiento para romper los inmunocomplejos que puede haber presentes en la muestra.

El procedimiento del ensayo consta de cuatro etapas:

Etapa 1: La muestra se incuba con un reactivo de pretratamiento en una microplaca con el propósito de disociar cualquier inmunocomplejo y liberar el antígeno core VHC para su detección.

Etapa 2: La muestra pretratada se incuba en una microplaca recubierta con anticuerpos monoclonales que capturan el antígeno core VHC. Al final se lava la microplaca para eliminar cualquier material no unido.

Etapa 3: El conjugado, que consiste en fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales conjugados a peroxidasa de rábano, se añade a la microplaca. El conjugado se une al antígeno core VHC que está vinculado a los anticuerpos de captura recubriendo la superficie de la microplaca. El antígeno core VHC forma un puente entre los anticuerpos de captura y los conjugados. Al final se lava la microplaca para eliminar cualquier material no unido.

Etapa 4: Un sistema enzimático de detección compuesto de o-fenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno se añade a la microplaca. En presencia del conjugado unido, la OPD es oxidada, dando como resultado un producto coloreado. En esta reacción, la peroxidasa es divalentemente oxidada por el peróxido de hidrógeno para formar un compuesto intermedio, que es a su vez, reducido a su estado inicial por una subsiguiente interacción con el ión hidrógeno que dona la OPD. La forma resultante oxidada de la OPD tiene color naranja. El ácido sulfúrico se añade para parar la reacción. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de conjugado unido y, por ello, es función de la concentración de antígeno core VHC presente en la muestra. La intensidad del color se mide con un lector de microplacas (fotómetro) diseñado para medir absorbancia de luz en una microplaca.

### 1. Preparación de reactivos

1.-Preparación del tampón de lavado 1X con urea: Mezclar 150 ml de tampón de lavado 20X concentrado con 3 litros de agua destilada o desionizada. Añadir el contenido de una botella de urea a 3 litros de tampón de lavado 1X.

2.-Preparación de la solución de sustrato OPD: Para cada microplaca que se va a ensayar, deben añadirse 4 tabletas de OPD a 24 ml de tampón de sustrato. 3.-Preparación de conjugado de trabajo: Se debe preparar 30 minutos antes de su uso.

4.-Preparación de estándares y controles: Los estándares y controles se usan para la calibración y monitorización. Para fabricar el conjunto de los 6 se necesita un concentrado de estándar (800 pg/ml) y un diluyente de estándar. Las diluciones de estándar deben hacerse justo antes de su uso.

Se deben testar un control negativo, un control positivo bajo y un control positivo alto. Finalizada la técnica, el control negativo es aceptable si la concentración es  $\leq 1.1$  pg/ml. El control positivo bajo tiene 7.9 pg/ml y es aceptable entre 3.0 - 12.7 pg/ml. El control positivo alto tiene 32.5 pg/ml y se considera aceptable entre 20.5 - 44.5 pg/ml.

### 2. Preparación de la curva estándar

Dejar que el estándar concentrado se descongele a temperatura ambiente (15-30° C) antes de usar. Etiquetar 7 tubos de polipropileno del 0 al 6 y preparar los estándares según la tabla nº 6.

**Tabla nº 6:** Preparación de curva estándar

Nivel de estándar	Volumen de Diluyente estándar (ml)	Volumen de estándar Concentrado Dilución Intermedia (ml)	Concentration Real (pg/ml)
0	0.300	0.100 ml estándar Concentrado (800 pg/ml)	200 (No usado en la Curva estándar)
1	0.100	0.100 ml de estándar Nivel 0	100
2	0.150	0.050 ml de estándar Nivel 0	50
3	0.140	0.060 ml de estándar Nivel 2	15
4	0.380	0.020 ml de estándar Nivel 1	5
5	0.116	0.050 ml de estándar Nivel 4	1.5
6	0.150	0 ml	0

### 3. Metodología

1. Preparar un mapa de placa identificando la localización de los estándares, controles y muestras en la placa de pretratamiento y en placa del ensayo. Se recomienda la siguiente disposición:

- A1 Blanco
- B1 estándar 6 (0 pg/ml)
- C1 estándar 5 (1.5 pg/ml)
- D1 estándar 4 (5 pg/ml)

E1 estándar 3 (15 pg/ml)  
F1 estándar 2 (50 pg/ml)  
G1 estándar 1 (100 pg/ml)  
H1 Control 3 (Control Positivo Alto)  
A2 Control 2 (Control Positivo Bajo)  
B2 Control 1 (Control Negativo). A partir de esta posición dispensar las muestras.

2. Etapa de pretratamiento. Es necesaria para las muestras y los controles pero no para los estándares. Añadir 100  $\mu$ l de control negativo, controles positivo alto y bajo y muestras a los pocillos de la microplaca de pretratamiento con una punta de pipeta distinta para cada tipo de reactivo o muestra. Añadir 50  $\mu$ L de tampón de pretratamiento a cada pocillo. Cubrir la placa con el sellador de microplaca e incubar a 25°C+ 1°C durante 1 minuto a 900rpm y posteriormente a 56°C+ 1°C durante 30 minutos.

3. Etapa de incubación de muestras. Dejar las muestras pretratadas que se enfríen durante 10 minutos. Colocar la microplaca de pretratamiento en el incubador a 25°C+ 1°C durante 1 minuto a 900rpm. Sacar la placa de ensayo de su bolsa y añadir 100 $\mu$ l tampón de reacción a todos los pocillos excepto al A1. Tener cuidado de no salpicar con reactivo fuera del pocillo o en el borde del pocillo. Usando una punta de pipeta diferente para cada reactivo o muestra, añadir 100 $\mu$ l de controles pretratados y muestras pretratadas a los pocillos correspondientes de la placa del ensayo. Añadir 100 $\mu$ l de los estándares diluidos a los pocillos correspondientes. Cubrir la placa con un sellador de placa. Incubar con agitación a 900 rpm durante 60 minutos a 25°C+ 1°C. Lavar la placa del ensayo usando tampón de lavado con urea 1X.

4. Etapa de incubación de conjugado. Añadir 200  $\mu$ l de conjugado de trabajo a todos los pocillos excepto al A1 y cubrir con un sellador de placa. Incubar sin agitación durante 30 minutos a 25°C+ 1°C. El sellador de placa debe permanecer colocado hasta que la placa del ensayo se lave. Inmediatamente antes del lavado, retirar el sellador cuidadosamente. Lavar la placa de ensayo usando tampón de lavado con urea 1X.

5. Etapa de incubación de sustrato. Añadir 200  $\mu$ l de solución de sustrato OPD a todos los pocillos. Incubar a temperatura ambiente (15–30 ° C) en oscuridad durante 30 minutos. Añadir 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 4N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a cada pocillo.

6. Lectura de la placa. Leer la placa en un lector a 490nm o 492nm con filtro de referencia a 620nm o 630nm.

7. Validación de la placa. El ensayo es validado si todos los criterios siguientes se cumplen:

a. Criterios de densidad óptica: El blanco es aceptable si la  $DO < 0.030$ ; El estándar nivel 6 (0 pg/ml) es aceptable si  $DO \leq 0.050$ ; el estándar nivel 1 (100 pg/ml) es aceptable si  $DO \geq 0.900$  y  $\leq 2.200$ ; La diferencia entre el DO del estándar nivel 5 (1.5 pg/ml) y el DO del estándar nivel 6 (0 pg/ml) debe ser  $\geq 0.010$ .

b. Concentraciones de los controles interpolados en la curva obtenida deben encontrarse dentro de los intervalos esperados.

#### **4. Resultados**

1. Sustraer el valor de DO del blanco a todos los valores de DO de los estándares, controles y muestras y trazar una curva lineal de concentración / DO de los estándares.
2. Utilizar los resultados de la curva para determinar la concentración de los estándares y todas las muestras basándose en la ecuación de una recta,  $y = mx + b$  ( $y = y$ -axis variable (DO);  $m =$  pendiente de la recta;  $x = x$ -axis variable (concentración del antígeno core del VHC  $b = y$ -corte)
3. Las concentraciones de antígeno core total VHC de los controles y muestras (pg/ml) pueden ser calculadas usando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = (\text{DO}_{\text{muestra}} - \text{DO}_{\text{corte}}) / \text{pendiente}$$

#### **3.2.2. Detección de Anticuerpos de tipo IgG.**

En todos los sueros se ha determinado la presencia anticuerpos de tipo IgG frente a al Virus de la Hepatitis C mediante técnicas inmunoenzimáticas (ORTHO® VHC 3.0 SAVE Potenciado). Es un inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en suero o plasma humano. La presencia de anti-VHC no constituye un diagnóstico de hepatitis C, pero puede ser indicativo de infección reciente o pasada. Un resultado no reactivo no excluye la posibilidad de exposición al virus de la hepatitis C ya que los niveles de anti-VHC pueden ser indetectables en fases tempranas de infección, pero la determinación de anticuerpos puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico en conjunción con la determinación de enzimas hepáticas, marcadores serológicos adicionales y valoración clínica. Es un ELISA que utiliza micropocillos recubiertos con antígenos recombinantes codificados del virus de la hepatitis C como fase sólida, c22-3, c200 y NS5. El antígeno c22-3 procede de una región estructural del genoma que codifica la nucleocápside fijadora de ARN. La proteína c200 es codificada por las regiones NS3 y NS4 del genoma del VHC, por último, la proteína recombinante NS5 es codificada por la región NS5 de genoma del virus. El procedimiento consta de tres fases, durante la primera etapa, se incubaba una muestra diluida en el pocillo de pruebas durante un periodo determinado de tiempo. Si en la muestra existen anticuerpos frente a cualquiera de los tres antígenos, se formarán complejos de antígenos-anticuerpo en la superficie del micropocillo. Si no existen VHC-Ac, no se formarán dichos complejos. En la etapa de lavado que sigue, se eliminarán las proteínas del suero o plasma que no se hayan unido.

En la segunda etapa, se añade al micropocillo un anticuerpo monoclonal de rata conjugado con peroxidasa de rábano. El conjugado se une específicamente a la porción de la IgG humana de los complejos antígeno- anticuerpo. Si estos complejos antígeno-anticuerpo no se hallan presentes, el conjugado que no se ha unido, se eliminará en la siguiente fase de lavado.

En la tercera etapa, se añade al pocillo un sistema de detección de enzima compuesto de ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno. Si existe conjugado unido, el OPD se oxidará y dará lugar a un producto coloreado. En esta reacción la peroxidasa se oxida de forma divalente mediante el peróxido de hidrógeno y forma un compuesto intermedio, que a su vez, se reduce a su estado inicial mediante interacción subsiguiente con el OPD donador de ión hidrógeno. Para completar la reacción se le añade ácido sulfúrico.

La intensidad de color depende de la cantidad de conjugado unido, y por tanto, está en función de la concentración de anti-VHC presente en la muestra. La intensidad de color se mide con un fotómetro, para cuantificar la absorbancia de la luz en un micropocillo.

### **1. Preparación de reactivos**

1.-Tampón de lavado: Se añaden 50 ml de tampón de lavado y 950 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Esta solución es estable 30 días a temperatura ambiente o 60 días a 4° C.

2.- Sustrato: Para cada 24 muestras, se disuelve una pastilla en 6ml de tampón sustrato.

3.- Solución parada: ácido sulfúrico 4N.

### **2. Metodología**

1.- Se necesita un tubo blanco, tres negativos y dos positivos. Se diluyen el suero y controles al 1/10 dispensando en la placa 20µl suero y 200µl de diluyente de muestra. En el pocillo del blanco se dispensa 200µl de diluyente. Incubar una hora a 37° C. Se lava cinco veces consecutivas.

2.- Añadir 200µl de conjugado (listo para usar), incluido el blanco. Incubar una hora a 37° C. Lavar cinco veces.

3.- Añadir 200µl de sustrato recién preparado en todos los pocillos. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

4.- Añadir 50 µl de solución parada SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> en todos los pocillos. Leer a 490-492nm /620-630nm.

### **3. Resultados**

Como control de calidad, se valorarán las absorbancias del blanco, del control positivo y del control negativo, de modo que los valores deberán oscilar: blanco: mayor o igual 0,02 y menor o igual 0,05; negativo: mayor o igual a -0,05 y menor o igual 0,120; positivo suele ser un valor superior a 0,800.

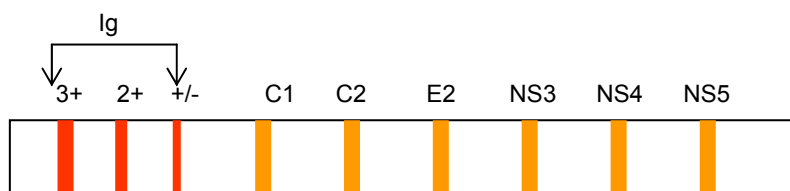
El valor límite se establece sumando la media de los controles negativos (Ncx) y el valor de cada lote (generalmente 0.600) (Ncx + 0.600).

Se considera un suero positivo cuando su absorbancia es superior a la del valor límite y negativo cuando su absorbancia es inferior a la del valor límite.

### 3.2.3. Detección de Anticuerpos diferenciados frente a diversos antígenos

Para ello se utiliza un inmunoensayo en línea (INNO-LIA™ VHCAb III update Innogenetic) que está indicado como ensayo suplementario, de mayor especificidad, para la confirmación de muestras de suero o plasma humano presuntamente positivas que se han mostrado reactivas utilizando un procedimiento de análisis de anticuerpos contra el VHC. Es un inmunoensayo en línea de tercera generación que contiene antígenos del VHC derivados de la región central, de la hipervariable E2 (HRV), de la región de la helicasa NS3, así como de las regiones NS4A, NS4B y NS5A del VHC. El ensayo se basa en una tira de nylon con soporte de plástico, recubierta con los antígenos mencionados, en forma de seis bandas. Además, la tira incorpora cuatro bandas de control: línea de control de estreptavidina, como controles positivos, tiene una IgG anti-humana 3+, y una IgG humana 1+, más una banda de punto de corte ± (IgG humana) como muestra la figura nº 16.

La técnica se realiza en una cubeta, se incuba una muestra diluida junto con la tira de ensayo LIA, si los anticuerpos contra el VHC están presentes en la muestra, estos se unirán a las bandas de antígenos de VHC que recubren la tira. Posteriormente, se añade un conjugado de anti-IgG de cabra anti-humano marcado con fosfatasa alcalina purificado por afinidad, que reacciona de forma específica con los complejos antígenos-anticuerpo, siempre y cuando éstos se hayan formado previamente. La incubación con el sustrato enzimático produce un color marrón cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos de VHC capturados en la muestra en cualquier banda dada.



**Figura nº 16:** Representación de los antígenos de VHC.

#### 1. Preparación de reactivos

1.- Tampón de lavado: La dilución es 1/5 en agua destilada. Esta solución permanece estable durante dos semanas a una temperatura de 2- 8° C.

2.- Conjugado: Se diluye al 1/100 en el momento de uso y ha de mantenerse en condiciones de oscuridad.

3.- Sustrato: La dilución es al 1/100 en el momento de uso y ha de mantenerse en condiciones de oscuridad.

## **2. Metodología**

1.- Se necesita un control negativo y uno control positivo. Se adiciona en las bandejas 1ml de diluyente de muestra, excepto en las correspondientes a los controles. A continuación se añade 10µl de suero problema y 1ml de control positivo y negativo en las bandejas correspondientes. Incubar toda la noche a temperatura ambiente y en rotación. Lavar tres veces con 1ml de líquido de lavado.

2.- Se añade 1ml de conjugado reconstituido en cada bandeja. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y en rotación. Lavar dos veces con solución de lavado y una vez con tampón sustrato.

3.- Añadir 1ml de sustrato reconstituido a cada bandeja. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y en rotación. Aspirar y añadir 1ml de ácido sulfúrico. Incubar 10-20 minutos a temperatura ambiente. Extraer las tiras.

## **3. Resultados**

Para que el ensayo se considere válido, debe salir coloreada los controles internos de IgG; 3+, 1+, +/-, siendo la intensidad del control de nivel 3+ superior que la del nivel 1+ y esta a su vez superior a la del nivel +/- . De igual modo la banda correspondiente a la anti-estreptavidina, a de mantenerse sin color.

Se considera un resultado Negativo ausencia de bandas. El resultado será Positivo si al menos una banda entre 3+ y 1+ tienen reactividad o dos bandas iguales a 1+. Un resultado es indeterminado si existe una banda igual a 1+ o más de una banda iguales a +/-.

### **3.2.4. Detección de Anticuerpos de tipo IgM.**

Es una técnica que ha sido diseñada para obtener una sensibilidad elevada para la detección de anticuerpos de tipo IgM frente a una proteína del core del VHC, sin interferencias debidas al factor reumatoide (VHC IgM EIA 2.0. ABBOTT) Diversos estudios recientes, han documentado que incrementos de los nivel de IgM del core en pacientes con hepatitis crónica C son predictores de baja respuesta al interferón alfa. También se ha demostrado una alta asociación entre la IgM y el ARN.

El plasma o suero humano se diluye y posteriormente se incuba con una esfera de poliestireno recubierta con antígeno recombinante (E.coli) estructural (core) del VHC. El diluyente contiene anticuerpos de cabra contra la IgG humana, con objeto de reducir las interferencias de la IgG frente al VHC presente en el suero. El proceso de dilución en dos pasos minimiza la interferencia con la IgG humana específica para el VHC en la muestra, especialmente cuando esa muestra contiene factor reumatoide. Si la IgM específica contra la proteína estructural del VHC está presente en la muestra, se unirá al antígeno durante la incubación. Tras la adición del conjugado, la IgM presente formará un inmunocomplejo, que



será detectado con una solución que contiene peroxidasa de rábano reactiva contra el anticuerpo de cabra, que su vez está unido a la IgM humana. Mediante la adición de OPD, que contiene peróxido de hidrógeno, se pone de manifiesto, en función del color amarillo-anaranjado, la cantidad de VHC-IgM presente en cada muestra.

Un resultado no reactivo no excluye la posibilidad de exposición o infección con VHC ya que esta técnica no es un método de cribado. La respuesta de IgM puede ser variable en diferentes grupos de pacientes, debido a esta variabilidad biológica el test no discriminaría entre hepatitis crónica y aguda.

## **2. Metodología**

1.- Se necesitan tres controles negativos y tres controles positivos. Se diluyen las muestras problema y los controles: 10µl de suero o control en 200µl de diluyente de muestra. Pasar 20µl de cada dilución a los pocillos de la placa de reacción y añadir 200µl de diluyente de muestra, más una bolita recubierta del antígeno del core del VHC. Se tapa e incuba dos horas y media a 40° C en rotación.

2.- Se añade el conjugado, previamente reconstituido una hora antes. La incubación se realiza durante una hora a 40° C en rotación. Posteriormente se lava.

3.- Se vuelcan las bolitas en los tubos de reacción y se añade 300µl de OPD recién preparada (1 pastilla en 5ml de diluyente). Se prepara un tubo en blanco y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Parar con 1ml de sulfúrico y leer a 492-600.

## **3. Resultados**

La media de los controles negativos debe estar entre 0.100-0.130; La media de los controles positivos debe estar entre 0.680-1.860. El valor límite se establece sumando 0.150 a la media de los controles negativos. Toda muestra con valores superiores al valor límite se considera positivo.

### **3.2.5. Detección del ARN-VHC**

Las técnicas directas que detectan componentes virales, en este caso el ARN indican la presencia de replicación vírica. En el VHC podemos detectar el ARN de forma cualitativa o cuantitativa. La técnica que hemos realizado es la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

#### ***a.- Fundamento reacción en cadena de la polimerasa o PCR***

Es un método enzimático que permite copiar de forma exponencial una zona concreta de un genoma, pudiéndose obtener múltiples copias de ella. Consta de dos pasos fundamentales:

### **a.1.- Extracción de ácidos nucleicos**

Esta es la primera etapa para la realización de cualquier técnica de Biología Molecular. Consiste en hacer accesible la diana, es decir, el ácido nucleico del VHC, que se encuentra dentro de la cápside viral. Para ello se realiza un pretratamiento del suero que se conoce como lisis, posteriormente se procede a separar el ácido nucleico de los restos virales y de las proteínas séricas (generalmente se hace por unión a una partícula sólida o por precipitación); finalmente se lava el ácido nucleico y se purifica, quedando al final una solución que contiene el ARN viral en condiciones de poder ser utilizado para la amplificación.

### **a.2.- Amplificación de ácidos nucleicos: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para realizar la amplificación repetimos de forma cíclica tres fases térmicas: desnaturalización (separación de las dos hebras de ADN), acoplamiento (unión de los *primers* o iniciadores) y polimerización (síntesis de la hebra complementaria).

Los elementos necesarios para la PCR son: ADN de la muestra, dos *primers*, enzima de polimerización, mezcla de los cuatro nucleótidos y un tampón adecuado: como enzima de polimerización se suele emplear la Taq polimerasa, ya que es estable a las altas temperaturas de desnaturalización, permitiéndole permanecer activa durante toda la reacción de PCR; en la reacción de amplificación son necesarios cuatro nucleótidos que componen el ADN (dATP, deoxiadenintrifosfato; dGTP, deoxiguanidintrifosfato; dCTP, deoxicitosintrifosfato; dTTP, deoxitimidintrifosfato), utilizados en solución a pH 7 y a concentraciones equivalentes de cada uno; Los *Primers* son moléculas de ADN monocatenario, en la PCR se suelen utilizar dos, de manera que cada uno se acople a cada hebra complementaria del ADN diana; la Taq polimerasa requiere para su actuación de un pequeño iniciador o *primer* que forma un duplex de ADN con el ADN diana y le indique de esta forma donde empezar la amplificación; los componentes fundamentales del Tampón de amplificación son Tris-HCl (pH 8,3-8,8), KCl y MgCl<sub>2</sub>. Este último es muy importante, ya que una ligera variación en su concentración puede afectar al rendimiento de la reacción

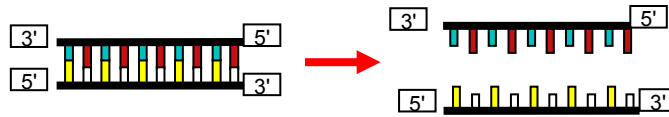
Las fases de la PCR son:

- Desnaturalización. Cuando el ADN se calienta a elevadas temperaturas se separan las dos hebras que forman la cadena debido a la rotura de los enlaces por puentes de hidrógeno por efecto del calor.
- Hibridación o acoplamiento. Los *primers* se unen a la molécula de ADN diana desnaturalizada, cada uno en un extremo del fragmento a amplificar.
- Elongación o polimerización. En este paso la Taq polimerasa comienza a copiar la hebra de ADN diana, que actúa como molde, a partir del extremo 3' que le indica el *primer*.

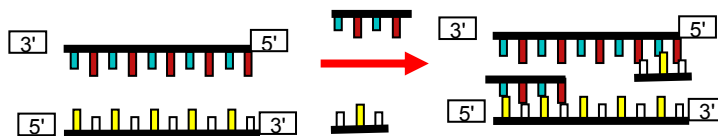
Este proceso se repite  $n$  veces para obtener  $2^n$  copias de esa zona concreta del genoma (figura nº 17).

1.-Extracción del ácido nucleico

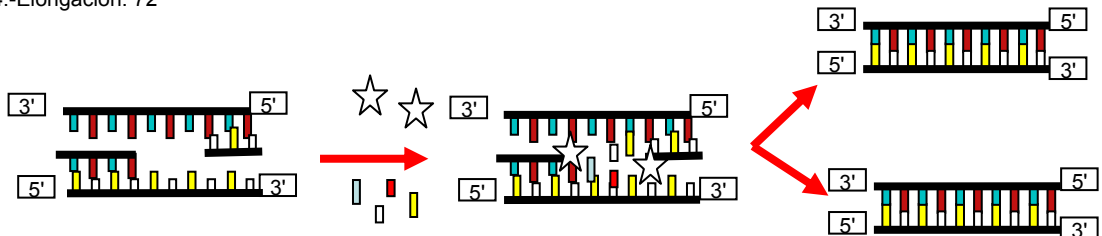
2.-Desnaturalización: 90-95°C



3.-Hibridación: 35-65° C



4.-Elongación: 72°



**Figura nº 17:** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### **a.3.- Detección del ácido nucleico**

Una vez realizada la amplificación tenemos que detectar el producto amplificado. Hemos descrito las características generales de una PCR, pero nosotros emplearemos algunas modificaciones de esta técnica, como partimos de muestras con ARN viral, es preciso realizar, antes de la amplificación, la síntesis de ADNc (ADN complementario), esto es una. RT-PCR y esto es posible gracias a la realización previa de una transcripción inversa con la enzima AMV (transcriptasa inversa de retrovirus aviar).

#### **b.- Reacción en cadena de la Polimerasa ( Amplicor 2.0)**

Es la técnica que hemos utilizado y consta de tres pasos:

*b.1 Reactivos y preparación*

*b.2 Preparación de muestras y controles*

*b.3 Amplificación automatizada y detección*

### ***b.1. Reactivos y preparación***

El *Master Mix* es el reactivo principal utilizado en PCR y contiene los siguientes componentes, que permiten la amplificación específica de la secuencia-diana:

- Nucleótidos (dNTPs): Unidades individuales de dATP, dGTP, dUTP y dCTP.
- Cofactores enzimáticos:  $Mg^{2+}$  para *Taq* DNA polimerasa o  $Mn^{2+}$  para *rTth* DNA polimerasa.
- *Taq* DNA polimerasa o *rTth* DNA polimerasa. Enzimas usados para replicar DNA o RNA.
- AmpErase<sup>®</sup> (UNG): Uracil-N-glicosilasa es una enzima que promueve la amplificación selectiva de un ácido nucleico diana a la vez que minimiza la contaminación con otros amplicones. Los productos de amplificación del DNA (amplicones) contienen desoxiuridina debido a que la dTTP es sustituida por dUTP en el *Master Mix*. Por ello, todos los productos amplificados son bioquímicamente distintos del DNA nativo ya que la desoxiuridina no se presenta en éste.

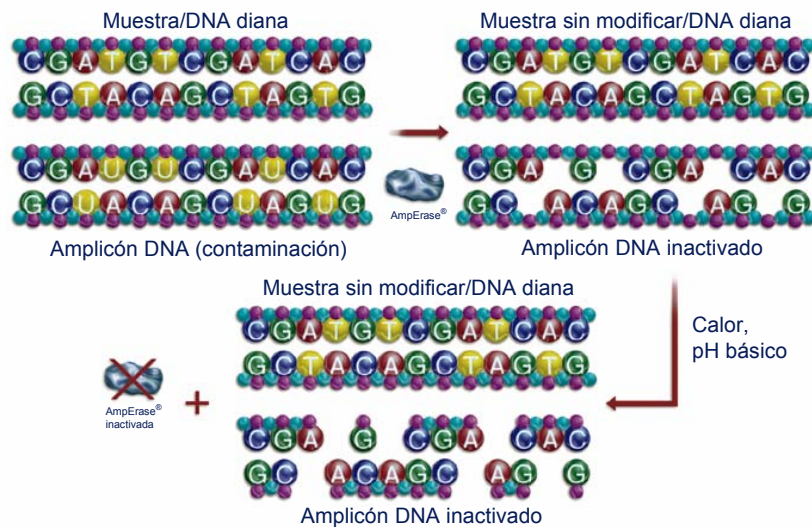
La incorporación de AmpErase<sup>®</sup>, el enzima uracil-N-glicosilasa (UNG), dentro del *Master Mix* permite la destrucción selectiva de los productos de contaminación (*carryover*; que contienen desoxiuridina) procedentes de amplificaciones previas. La UNG cataliza la ruptura de la desoxiuridina contenida en el DNA a residuos de desoxiuridina debido a la apertura de la desoxirribosa en el carbono 1.

Cuando se eleva la temperatura en el primer paso del proceso cíclico de PCR al pH alcalino del *Master Mix*, los amplicones de DNA se rompen en las posiciones marcadas por las desoxiuridinas, evitando su amplificación.

La UNG es específica para las moléculas de desoxirribosa de la desoxiuridina y, por lo tanto, no degrada el DNA original (que contiene desoxitimidina) ni, en su caso, el RNA original (que contiene uridina, no desoxiuridina). Efectivamente, las moléculas de RNA no son degradadas dado que éstas contienen ribosa, que no es sustrato para UNG.

Los nuevos amplicones, mantenidos a unos 55°C, no se degradarán, habida cuenta que UNG es inactivo a esta temperatura. Tras la amplificación, la temperatura del termociclador se mantiene a 72°C para que los nuevos amplicones no puedan ser destruidos.

AmpErase<sup>®</sup> es químicamente desnaturalizada (y, por lo tanto, inactivada) después de la amplificación por adición de una solución apropiada. (Figura nº 18)



**Figura n° 18:** Amplificación selectiva utilizando Amperase.

- Tampones. Utilizados para mantener un adecuado pH, así como una correcta concentración de sales.
- Primers. Secuencias sintéticas cortas de cadenas simples de DNA consistentes en 20-30 bases, característicamente marcadas con biotina en su extremo 5' Son complementarias de la secuencia de DNA/RNA objeto de interés.

### **b.2 Preparación de las muestras y controles**

La técnica de preparación de las muestras variará dependiendo del tipo de ácido nucleico del organismo patógeno objeto de extracción o aislamiento, el VHC RNA se aísla de plasma o suero mediante lisis de las partículas víricas por un agente caotropro seguido de precipitación del ARN o ADN con un alcohol. Después de que el ácido nucleico ha sido extraído de la muestra, se añade a un tubo que contiene el reactivo *Master Mix*.

**Control Interno:** Se trata de una secuencia ADN o ARN no infectiva que contiene la misma región de unión para los *primers* que el ADN o ARN original del organismo objeto de detección.

La secuencia amplificada del control interno tiene la misma longitud que la región amplificada del ácido nucleico original, así como un contenido de bases similar y una exclusiva región de unión con la sonda de detección, que permite que el amplicón control interno pueda distinguirse del amplicón-diana.

El control interno se amplifica y detecta a la vez que la muestra, con el fin de identificar inhibidores del proceso de amplificación y de controlar los pasos de preparación y amplificación de dicha muestra.

*Estándar de cuantificación (QS):* El estándar de cuantificación es una secuencia ADN o ARN no infectiva que contiene idénticas regiones de unión con los *primers* que el ADN o ARN original, así como una única región de unión con la sonda de detección, lo que permite que el amplicón estándar de cuantificación pueda distinguirse del amplicón-diana.

El estándar de cuantificación se añade a la mezcla de reacción durante la preparación de la muestra y contiene un número conocido de copias. El resultado del *test* se calcula en función de la relación entre la absorbancia del ácido nucleico diana y el estándar de cuantificación, teniendo en cuenta el factor de dilución y el número de copias del estándar de cuantificación según la siguiente fórmula:

$$\text{Copias / mL} = \frac{\text{Abs.DNA / RNA} \times \text{QS} \times \text{DF}}{\text{Abs.QS}}$$

Donde:

Abs.ADN/ARN = absorbancia de la muestra por el factor de dilución

QS = número de copias/PCR del QS

DF = factor de dilución para convertir copias/PCR en copias/ml

Abs.QS = absorbancia del QS por el factor de dilución

### ***b.3. Amplificación automatizada y detección***

Se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Inicialmente es necesario un proceso de transcripción inversa para generar una cadena complementaria de ADN. Durante la alineación-unión de los *primers* estos quedan fijados a la secuencia diana. *rTth* ADN polimerasa extiende el *primer* a través de la cadena de ADN utilizando los nucleótidos de la solución. El resultado es una cadena de cADN idéntica a la original de ARN.

Los sucesivos ciclos de PCR dan lugar a un número cada vez mayor de copias de la secuencia original, se puede dividir en varias partes:

*a. Desnaturalización e hibridación*

*b. Unión del conjugado y del sustrato*

*c. Lectura de absorbancias*

#### *a. Desnaturalización e hibridación*

Inmediatamente tras la amplificación, cada cadena se desnaturaliza químicamente mediante la adición automática de una solución alcalina en los tubos que contienen los amplicones

Después de la desnaturalización se transfiere una porción de cada muestra a los tubos de detección que se colocan automáticamente en un incubador a 37°C y se añade la solución de hibridación, que contiene la sonda específica de captura unida a micropartículas magnéticas. La sonda consta de una secuencia complementaria a la que se pretende estudiar.

Durante la hibridación, los amplicones se unen a las sondas fijadas a las partículas magnéticas. En el cuarto paso de lavado, éstas quedan inmovilizadas por la acción de un campo magnético y los amplicones no unidos son eliminados. El proceso de hibridación define la especificidad del *test* y representa, a la vez, un paso crítico del proceso de detección.

#### *b. Adición del conjugado y del sustrato*

El sistema añade automáticamente una solución de conjugado Av-HRP en cada tubo de detección, siendo estos incubados a 37°C. La avidina tiene una alta afinidad por la biotina, por lo que aquella quedará unida a los amplicones biotinilados, fijados a su vez a las micropartículas magnéticas. El tubo de detección vuelve a ser colocado en el incubador.

Durante la tercera incubación, en el tubo de detección, se añade TMB y una solución de peróxido de hidrógeno. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxidasa cataliza la oxidación de TMB para formar un complejo de color azul.

#### *c. Medida de la absorbancia*

Al final de la incubación, cada tubo de detección se transfiere al fotómetro, donde se mide la absorbancia de la solución a 660 nm. Se valora tanto la absorbancia de un blanco de sustrato como de la mezcla de reacción, restándose aquella del valor de esta última.

### **3.2.5. 1 Detección del ARN Cualitativo**

Se ha realizado mediante una técnica automatizada (Cobas Amplicor).

#### ***a. Preparación de Reactivos***

1. Añadir 100 µl de VHC Mn<sup>+2</sup> a un vial de *MasterMix*. Mezclar por inversión. Tiene una estabilidad de 4 horas.
2. Pipetear 50 µl de *Master Mix* en cada tubo del anillo. No cerrar los tubos.
3. Colocar el anillo en su correspondiente bolsa de seguridad y almacenarlo entre 2-8°C. Su estabilidad es de 4 horas.
4. Atemperar el tampón de lisis a 25-37°C y mezclar por inversión para disolver cualquier

precipitado.

5. Preparar el buffer de lisis añadiendo 100 µl de control interno a un vial de tampón de lisis. Mezclar por inversión. Una vez preparado, debe usarse desechando la cantidad sobrante. Su estabilidad es de 8 horas.

### **b. Preparación de Muestras**

1. Añadir 400 µl de buffer de lisis a cada un tubo de muestra o control.

2. Preparación de los controles (1 positivo y 1 negativo):

Añadir 200µl de plasma negativo humano a los tubos que contienen los 400µl de buffer de lisis y mezclar en vortex. Añadir 20µl de control de VHC (-) y 20µl de control VHC (+) a sus respectivos tubos. Mezclar en vortex.

3. Mezclar en vortex las muestras. Añadir 200µl de muestra y volver a mezclar en vortex.

4. Incubar los tubos (muestras y controles) durante 10 minutos a 60° C. Mezclar en vortex.

5. Añadir 600µl de Isopropanol a cada tubo y mezclar en vortex.

6. Incubar todos los tubos durante 2 minutos a temperatura ambiente.

7. Centrifugar los tubos (12.500-16.000 g) a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Es conveniente marcar los tubos en el lugar donde se va a formar el pellet.

8. Desechar el sobrenadante con cuidado de no alterar el pellet. (Puede no ser visible).

9. Añadir a cada muestra y control 1.0 ml de Etanol al 70%, recién preparado y mezclar en vortex.

10. Centrifugar los tubos (12.500-16.000 g) a temperatura ambiente durante 5 minutos colocándolos con la marca en la posición correspondiente.

11. Descartar totalmente el sobrenadante de cada tubo.

12. Centrifugar los tubos (12.500-16.000 g) a temperatura ambiente durante 3-5 segundos y descartar de nuevo totalmente el sobrenadante de cada tubo.

13. Resuspender los pellets con 200µl de diluyente. Las muestras deberán amplificarse en las siguientes 3 horas.

14. Pipetear 50µl de los controles y muestras en los respectivos tubos del anillo (con 50µl de Master Mix) teniendo cuidado de no pipetear material precipitado.

15. Llevar el anillo al COBAS *AMPLICOR*.

### **c. Preparación de Reactivos de Amplificación**

#### **1. Reactivos Especificos**

○ *Sonda de Captura Amplicón VHC*: Mezclar en vortex el vial CX PS1 y transferir 2,5 ml al vial CX4. La estabilidad es de 30 días a 2-8°C.

○ *Sonda de Captura Amplicón Control Interno*: Mezclar en vortex el vial control interno y transferir 2,5 ml al vial IC4. Estabilidad 30 días a 2-8°C.



## 2. Reactivos Genéricos

○ *Desnaturalizante y Conjugado*: Listos para el uso. Su estabilidad es de 30 días a 2-8°C.

○ *Sustrato*: Transferir 5,0 ml del vial SB al vial SB3 y mezclar con la pipeta. Estabilidad 16 horas.

### d. Amplificación y detección

Los anillos, que contienen el *Master Mix* y las muestras y controles procesados, se colocan en los segmentos del termociclador. En su interior se amplifica el ácido nucleico para producir múltiples copias del ARN original.

Los productos de la PCR (amplicones) son desnaturalizados, hibridados con la sonda de captura –unida a su vez a las partículas magnéticas- y detectados mediante una reacción colorimétrica, efectuándose la medida de la absorbancia a 660 nm. Estos pasos tienen lugar automáticamente en el autoanalizador.

### e. Interpretación de resultados

El resultado analítico correspondiente al control negativo para VHC debe ser inferior a 0.20 unidades  $A_{660}$ . El resultado para el control positivo de VHC debe ser igual o superior a 1.0 unidades  $A_{660}$ . En la interpretación de resultados con detección de control interno se debe comprobar que en la impresión de los avisos y comentarios confirmen su validez. Los resultados de las muestras se interpretan según los criterios que se expresan en la tabla nº 7.

**Tabla nº 7:** Criterios de interpretación de VHC-ARN cualitativo

Resultado Muestra		Resultado Control Interno		Interpretación
$A_{660}$	Comentario	$A_{660}$	Comentario	
$\leq 0.2$	Negativo	$> 0.2$	Positivo	Muestra presuntamente negativa para el VHC.
$> 1$	Positivo	Cualquier valor	-	Muestra positiva para el VHC.
0.2-1	Zona Gris	-	-	Repetir

Las muestras con valores de absorbancia dudosos (mayor o igual a 0.2 e inferior a 1) deben de analizarse nuevamente por duplicado. En caso de mantenerse en la franja gris es preciso solicitar nueva muestra.

### **3.2.5. 2 Detección de la carga vírica VHC**

#### *a.-Fundamento*

Podemos definir la carga viral como el número de moléculas de ARN que se encuentran presentes en la muestra analizada, generalmente se determina en plasma y se expresa como número de copias o  $\log_{10}$  / ml. La cuantificación de las partículas virales circulando es de gran importancia para monitorizar la eficacia de la terapia en el tratamiento de la hepatitis crónica.

Existen diferentes técnicas de cuantificación de la carga viral y aunque difieren en concepto y práctica, todas están basadas en una propiedad del ARN que es la complementariedad de secuencia. En toda PCR cuantitativa se utilizan unos controles o estándares de ADN de cantidad conocida, que se amplifican junto con la muestra y van a servir para compararlos con la cantidad de producto sintetizado de la muestra problema y así poder determinar su concentración. Se emplea un estándar interno sintético que corresponde al mismo fragmento de ADN que se quiere amplificar con la diferencia de que se le ha quitado o añadido artificialmente unos cuantos nucleótidos para aumentar o reducir el tamaño del amplicon y así distinguirlo de la secuencia de interés.

El Amplicor Monitor está basado en cinco procesos fundamentales: obtención de la muestra; transcripción inversa para generar ADNc a partir de ARN; amplificación por PCR de este ADNc con iniciadores o primers específicos, hibridación de los productos amplificados con sondas oligonucleótidas específicas para las dianas; detección por colorimetría de los productos amplificados y unidos a las sondas.

El material de partida es ARN plasmático al que se añade un control interno de cuantificación, que consiste en un número conocido de copias de ARN, de tamaño y composición de bases igual al del producto amplificado al ARN del VHC. Sobre esta mezcla se realiza una retrotranscripción y a continuación la amplificación tanto de la cadena control como del problema presente en la muestra. La detección se realiza en una microplaca y los pocillos se ocupan con diluciones seriadas del producto de la amplificación.

Los productos amplificados son cuantificados con ayuda de un conjugado avidín-peroxidasa y por una reacción colorimétrica con ayuda de una peroxidasa. La placa se lee a una determinada longitud de onda y con los resultados de la lectura, a partir de los datos obtenidos con el control interno, se estima el número de copias de ARN viral presente en la muestra problema. El límite de detección es de 600 UI/ml.

#### *b.-Metodología*

Consta de varias fases:

### **b.1. Preparación de Reactivos**

1. Atemperar el tampón de lisis 25-37°C y mezclar por inversión para disolver cualquier precipitado.

2. Preparar el tampón de lisis añadiendo 100 µl de estándar de cuantificación a un vial de tampón de lisis. Una vez preparado, debe usarse desechando la cantidad sobrante. La estabilidad del este reactivo es de cuatro horas.

3. Añadir 100 µl de  $Mn^{+2}$  a un vial de *MasterMix*. Mezclar por inversión. La estabilidad de este reactivo es de cuatro horas.

4. Pipetear 50 µl de *Master Mix* en cada tubo del anillo. Sin cerrar los tubos se colocar el anillo en su correspondiente bolsa de seguridad y almacenarlo a 2-8°C.

### **b.2. Preparación de Muestras**

1. Añadir 400 µl de tampón de lisis a cada tubo de 1.5 ml (incluidos Control Negativo, Positivo Bajo y Positivo Alto).

2. Añadir 100 µl de muestra y mezclar en vortex.

3. Preparar los controles: Pipetear 100 µl de plasma negativo humano (NHP). Mezclar en vortex. Añadir 100 µl de *Control Negativo (VHC -)*, *Control Positivo Bajo (VHC L+)* y *Control Positivo Alto (VHC H+)* según corresponda. Mezclar bien en vortex.

4. Incubar durante 10 minutos a 60°C. Mezclar en vortex.

5. Añadir 500 µl de isopropanol a cada tubo y mezclar en vortex.

6. Incubar todos los tubos durante 2 minutos a temperatura ambiente.

7. Centrifugar los tubos (12.500–16.000 g) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Es conveniente marcar los tubos en el lugar donde se va a formar el pellet.

8. Preparar el Etanol al 70% mezclando etanol absoluto con agua destilada en las proporciones correspondientes. Cada muestra procesada necesitará 1 ml de etanol al 70%. Se debe utilizar etanol 70% recién preparado.

9. Desechar el sobrenadante con cuidado de no alterar el pellet. (Puede no ser visible).

10. Añadir 1.0 ml de etanol al 70% y mezclar en vortex.

11. Centrifugar los tubos (12.500-16.000 g) a temperatura ambiente durante 5 minutos colocándolos con la marca en la posición correspondiente.

12. Descartar totalmente el sobrenadante de cada tubo.

13. Resuspender los pellets con 1.0 ml de diluyente. Las muestras deberán amplificarse en las siguientes 3 horas ó almacenarse a -70°C.

14. Pipetear 50 µl de los controles y muestras en los respectivos tubos del anillo (con 50 µl de *Master Mix*) teniendo cuidado de no pipetear material precipitado.

15. Llevar el anillo al COBAS *AMPLICOR*.

### **b.3.. Preparación de reactivos de amplificación**

1. Reactivos Específicos

- *Diluyente Amplicones*: Listo para el uso. Su estabilidad es de 30 días a 2-8°C.

- *Sonda de Captura Amplicón VHC*: Mezclar en vortex el vial y transferir 2,5 ml al vial CM4. La estabilidad es de 30 días a 2-8°C.

- *Sonda de Captura Amplicón estándar de cuantificación*: Mezclar en vortex el vial y transferir 2,5 ml al vial CQ4. Estabilidad 30 días a 2-8°C.

## 2. Reactivos Genéricos

- *Desnaturalizante y Conjugado y CN4 ( )*: Listo para el uso. Su estabilidad es de 30 días a 2-8°C.

- *Sustrato*: Transferir 5,0 ml del vial SB al vial SB3 y mezclar con la pipeta. Estabilidad 16 horas.

### **b.4. Amplificación y detección**

Los anillos, que contienen el *Master Mix* y las muestras y controles procesados, se colocan en los segmentos del termociclador. En su interior se amplifica el ácido nucleico para producir múltiples copias del ARN original.

Los productos de la PCR (amplicones) son desnaturalizados, hibridados con la sonda de captura –unida a su vez a las partículas magnéticas- y detectados mediante una reacción colorimétrica, efectuándose la medida de la absorbancia a 660 nm. Estos pasos tienen lugar automáticamente en el autoanalizador.

### **b.5. Interpretación de resultados**

El límite de sensibilidad se establece en 600 UI/ml y el rango de linealidad está establecido entre 600 UI/ml-500000 UI/ml. Para valores superiores a 500000 UI/ml se ha de diluir la muestra hasta que entre en el rango de linealidad para poder cuantificar la muestra.

### **3.2.6. Detección de genotipo VHC**

Para el desarrollo de técnicas de genotipaje, hay que tener en cuenta que la región del genoma elegida para el análisis genotípico debe ser lo suficientemente conservada para el desarrollo de iniciadores específicos para cada genotipo, pero lo suficientemente variable para discriminar los distintos subtipos.

El método que hemos utilizado es el LiPA (*Line Probe Assay*, Innogenetics, Bélgica) (Stuyver, 1997) basado en el principio de hibridación a sondas. Permite conocer todos los genotipos. Para la amplificación se utilizan iniciadores específicos de la región 5'UTR. El ADN amplificado es desnaturalizado, se marca con biotina y se hibrida con sondas específicas del genotipo fijadas a una tira de nitrocelulosa. Después de la hibridación se añade estreptavidina y fosfatasa alcalina que se unirá al complejo ADN-sonda. La incubación con un compuesto

cromógeno produce un precipitado de color púrpura que nos indicará el genotipo de cada muestra.

La técnica permite diferenciar coinfecciones por dos genotipos distintos. Se puede emplear el producto amplificado tanto de la detección de ARN cualitativo como cuantitativo, ya que en la amplificación de las tres técnicas se utilizan los mismos iniciadores. En la actualidad la identificación del genotipo resulta importante en la epidemiología, decisión y duración del tratamiento.

La técnica utilizada ha sido INNO-LIPA VHC-RT. Para su realización se parte del amplificado obtenido para detectar el ARN cualitativo o cuantitativo y posteriormente se realiza la hibridación en tiras de nitrocelulosa que contiene 19 bandas con sondas de ADN y 2 bandas de controles.

El primer paso consistirá en la desnaturalización e hibridación de la muestra con sondas específicas inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa. La temperatura de hibridación será el paso más crítico ya que debe ser la adecuada para una unión correcta entre muestra y sonda. Después de la hibridación se añade estreptavidina y fosfatasa alcalina (conjugado) que se unirá a la biotina. La incubación con un compuesto cromógeno (sustrato) produce un precipitado de color púrpura-marrón que nos indicará las mutaciones presentes. (Figura nº 19). El proceso se puede dividir en las siguientes fases:

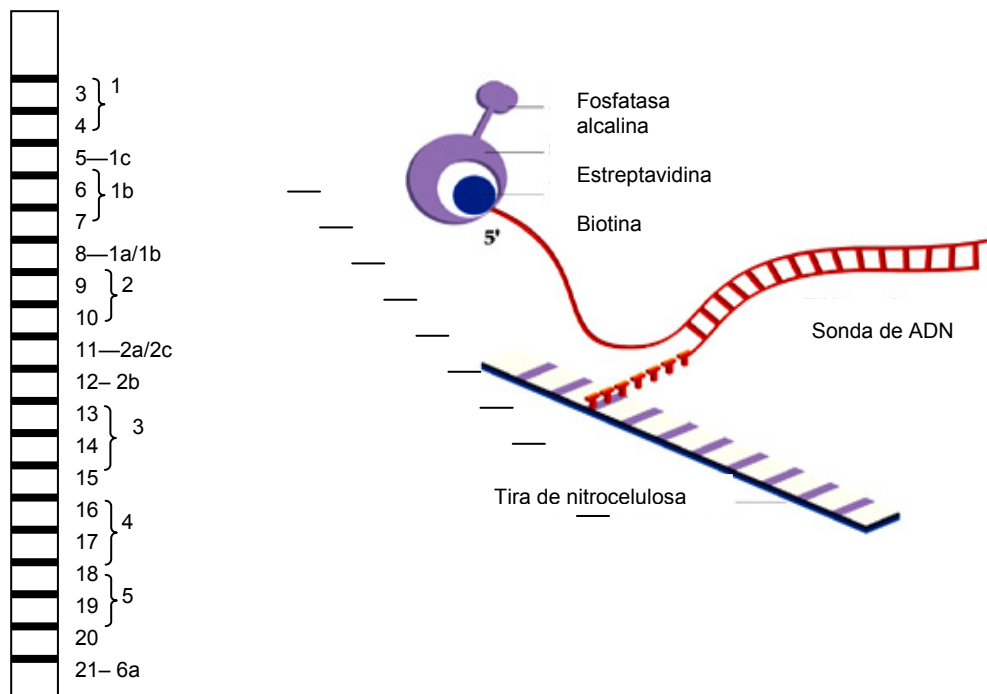


Figura nº 19: Representación esquemática de INNO LIPA.

## **1. Preparación de los reactivos**

1. Solución de lavado: se prepara 10 ml para cada tira; la solución está concentrada 5x y se diluye con agua destilada.

2. Solución de conjugado: se preparan 2 ml para cada tira; el conjugado va concentrado 100x y se diluye en diluyente de conjugado.

3. Solución de sustrato: se preparan 2 ml para cada tira; el sustrato va concentrado 100x y se diluye con tampón de sustrato

## **2. Metodología**

### *1. Desnaturalización del ADN*

No es necesario ya que el producto de partida ya está desnaturalizado.

### *2. Hibridación*

Se lleva a cabo en un baño de agua tapado con agitación ya temperatura exacta de 50° C.

- Añadir 2 ml de solución de hibridación precalentada a 50° C a cada una de las cubetas.
- Añadir una tira (numerada con lápiz) a su correspondiente cubeta.
- Incubar a 50° C/30'.

### *3. Lavado riguroso*

Se lleva a cabo bajo las mismas condiciones del paso anterior.

- Eliminar la solución de las cubetas y lavar dos veces (10-20") con 2 ml de solución de lavado riguroso precalentada a 50° C.
- Eliminar la solución de las cubetas, añadir 2 ml de solución de lavado riguroso.
- Incubar a 50° C/10'.

### *4. Detección colorimétrica*

Se lleva a cabo a temperatura ambiente con agitación.

- Eliminar la solución de las cubetas y lavar dos veces con 2 ml de solución de lavado durante un minuto con agitación.
- Añadir 2 ml de solución de conjugado e incubar 30' a temperatura ambiente con agitación.
- Repetir el paso A.
- Eliminar la solución de las cubetas y lavar una vez más con 2 ml de solución de tampón del sustrato durante un minuto con agitación.
- Eliminar la solución de las cubetas y añadir 2 ml de solución de sustrato e incubar a temperatura ambiente/30' con agitación.
- Eliminar la solución de las cubetas y lavar una vez con agua destilada con agitación durante 5'.
- Eliminar el agua, secar las tiras y pegarlas en la hoja de resultados.
- Con ayuda de la plantilla, interpretar los resultados.

### **3. Interpretación de resultados**

Se requiere la inclusión de un control negativo cada vez que se realiza el análisis. Como en cualquier procedimiento de laboratorio, la inclusión de más controles positivos y negativos debe ser considerada hasta que se alcance un correcto nivel de confianza y habilidad para realizar dicho procedimiento.

La línea más alta de la tira es la línea señal, que permite corregir la orientación de la tira. La siguiente línea permite controlar la adición del reactivo conjugado y la solución sustrato durante el procedimiento. Esta línea debe ser siempre positiva y debe tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira en el mismo análisis.

El resultado de cada control negativo no debe tener ninguna señal en la tira, salvo la del control del conjugado. Las intensidades de color de las líneas pueden diferir de unas a otras.

Para una correcta interpretación la línea de control del conjugado debe ser alineada con la línea de control del conjugado en la tarjeta de lectura de plástico. La segunda línea positiva (Amplif.contr. en la tarjeta de lectura) controla la adición del material amplificado para hibridación. Esta línea debe ser positiva si el ácido nucleico amplificado del VHC esta presente.

Se han de recoger todos los números de las líneas que son positivas en la tira para deducir el genotipo utilizando el mapa de interpretación. No obstante hay que tener en cuenta que la inhibición de la polimerasa puede ser la razón del fallo total del análisis, así como que el acercamiento más seguro para el genotipado es el uso de secuencias de nucleótidos del RNA completo. El test INNO-LIPA VHC II esta basado en la variabilidad de los nucleótidos de la región no codificante 5' y la técnica concuerda en un 100% con la secuencias obtenidas de esta región (van Doorn et al., 1994). De todas formas, el subtipado puede ser estorbado por falta de variaciones de las secuencias subtipo-especificas en la región no codificante 5'.

---

## 4. Resultados

---



#### 4.1 Validación Técnica.

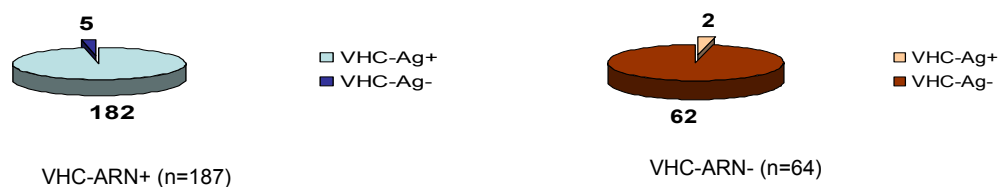
Este grupo está compuesto por 326 sueros pertenecientes a pacientes con sospecha de infección por VHC, de los cuales 251 fueron positivos para VHC-Ac (77%) y 75 (23%) fueron negativos. A todos los sueros se les determinó el VHC-ARN y el VHC-Ag. Los resultados obtenidos quedan expresados en la tabla nº 8:

**Tabla nº 8:** Resultados de VHC-ARN y VHC-Ag.

	VHC-ARN		VHC-Ag	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
VHC-Ac+ n=251	187	64	184	67
VHC-Ac- n=75	0	75	0	75
Total	187	139	184	142

En los sueros con ausencia de VHC-Ac no se detectó en ningún caso ni VHC-ARN, ni VHC-Ag. En los sueros positivos para el VHC-Ac se detectó el VHC-ARN en 187 (74.5%) y el VHC-Ag en 184 (73.3%).

En la figura nº 20 quedan expresados los resultados de VHC-ARN y VHC-Ag en el total de los 251 sueros positivos para anticuerpos del VHC:



**Figura nº 20:** Resultados de la detección de VHC-ARN y VHC-Ag en los sueros VHC-Ac+.

Para estudiar la validez de la técnica hemos comparado los resultados con la mejor prueba existente o prueba de referencia, que es la detección del RNA. La validez de una prueba puede ser interna o externa. La validez interna se mide mediante la sensibilidad, especificidad y la razón de probabilidades diagnósticas, que describe el rendimiento de una prueba. La validez externa se mide con el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la técnica de detección de VHC-Ag, posee una muy buena sensibilidad (97,3%) y especificidad (96,8%). Su alto VPP (98,9%) y VPN (92,5%) permite la utilización del antígeno como prueba de screening para la detección de replicadores, obteniéndose pocos resultados falsamente positivos y negativos.

En los 184 sueros con anticuerpos y antígeno positivos se cuantifico el VHC-Ag tanto para los VHC-ARN positivos como para los VHC-ARN negativos, quedando los resultados obtenidos resumidos en la tabla nº 9.

**Tabla nº 9:** Valores de VHC-Ag en los sueros VHC-Ac+.

VHC-Ag/pg	VHC-ARN-	VCH-ARN+	Total
<10	0	19	19
10-50	2	56	58
50-100	0	32	32
100-150	0	24	24
150-200	0	19	19
>200	0	32	32
Total	2	182	184

En esta tabla se destaca que dos sueros negativos en la prueba de detección de VHC-ARN, y fueron positivos para el VHC-Ag con valores de 14,783 pg/ml y 10,056 pg/ml.

De los 187 que eran positivos para VHC-Ac y para el VHC-ARN solo se pudo determinar la carga viral en 86 de ellos, y el genotipo en 83 de ellos, los resultados quedan expresados en la tabla nº 10:

**Tabla nº 10:** Resultados de los valores de carga viral y genotipo de los sueros VHC-Ac+.

n	Carga Viral	Genotipo								N.D
		1	1a	1b	2a	3a	4	4a	4cd	
16	>3.600-250.000	1	0	4	1	5	1	1	1	2
11	>250.000-500.000	2	2	4	0	2	0	0	1	0
12	>500.000-1.000.000	1	2	4	1	3	0	0	0	1
15	>1.000.000-2.000.000	2	3	6	1	2	1	0	0	0
10	>2.000.000-2.500.000	1	2	5	0	2	0	0	0	0
6	>2.500.000-3.000.000	2	1	2	0	1	0	0	0	0
16	>3.000.000	0	6	6	0	3	0	0	1	0
86	Total	9	16	31	3	18	2	1	3	3

N.D: No determinado

De estos 86 sueros 5 fueron negativos para el VHC-Ag, dos de ellos con cargas virales inferiores a 50.000UI/ml, otros dos con 193.000UI/ml y 103.000 UI/ml y un último suero con una carga viral alta de 1.200.000UI/ml.

Se realizó un estudio estadístico para valorar si los niveles de VHC-ARN o de VHC-Ag, se podían relacionar con un determinado genotipo. Una vez conocidas las medias de VHC-Ag y VHC-ARN para cada genotipo, se comparan los distintos genotipos mediante el test estadístico de ANOVA. Hay que resaltar que 5 pacientes quedan fuera de la comparación, tres por no poder determinarle el genotipo y 2 por obtener valores de carga viral superiores al nivel máximo de detección de la técnica. Los resultados se recogen en dos tablas, una para los valores del VHC-Ag, tabla nº 11 y otra para los valores de VHC-ARN, tabla nº 12:

**Tabla nº 11:** Resultados estadísticos del test de ANOVA para los valores de VHC-Ag.

<i>Gntp</i>	<i>N</i>	<i>Media VHC-Ag pg/ml</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>p</i>
1	9	56.7	46.63	0.869 (n.s)
1a	15	125.9	194.3	
1b	31	92.0	93.1	
2a	3	79.7	79.56	
3a	17	104.0	124.6	
4	2	58.5	58.5	
4a	1	23.3	0	
4cd	3	153.9	151.53	
Total	81	97.1	120.6	

n.s: No significativa

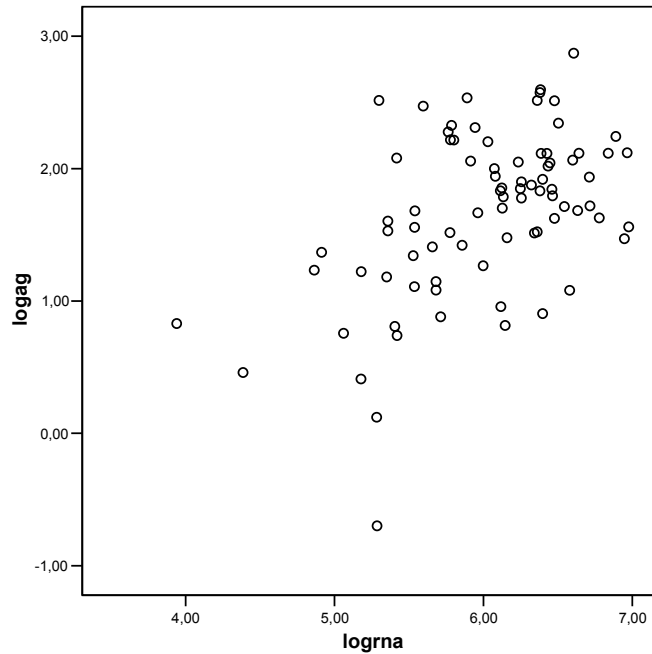
**Tabla nº 12:** Resultados estadísticos del test de ANOVA para los valores de VHC-ARN.

<i>Gntp</i>	<i>N</i>	<i>Media VHC- ARN UI/ml</i>	<i>Desviación típica</i>	<i>p</i>
1	9	1.390.811,1	1.025.139,4	0.469 (n.s)
1a	15	2.943.193,3	2.752.411,3	
1b	31	2.054.110,0	2.041.947,9	
2a	3	647.233,3	645.767,6	
3a	17	1.634.040,6	2.355.849,4	
4	2	628.910,0	786.034,0	
4a	1	81.900,0	0	
4cd	3	1.896.896,7	2.814.384,3	
Total	81	1.939.425,2	2.171.875,9	

n.s: No significativa

El resultado del test estadístico demuestra que no existen diferencias significativas para la media de ARN y/o de antígeno entre los diferentes genotipos. De igual modo se estudió si existía relación entre los niveles de antígeno y de ARN y si dicha relación se podía cuantificar. Para este caso se realizó un análisis de correlación y regresión, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. El tratamiento de los datos ha sido realizado mediante la conversión de los mismos a la escala logarítmica. El resultado de dicho test fue un coeficiente de correlación

de Pearson (r) de 0.523, con una  $p < 0.05$ , es decir existe una correlación moderada entre las variables. Esta moderada relación queda de manifiesto en el siguiente diagrama de dispersión. (Figura nº 21).



**Figura nº 21:** Diagrama de dispersión del VHC-Ag y del VHC-ARN.

Gracias a esta correlación entre ambas variables podemos calcular los coeficientes para poder obtener nuestra ecuación de correlación. Los coeficientes calculados quedan de manifiesto en la tabla nº 13:

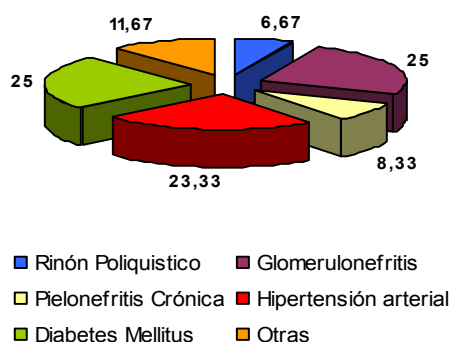
**Tabla nº 13:** Resultados estadísticos de los coeficientes de correlación entre VHC-Ag/VHC-ARN.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		
	B	Error típico	Beta	t	p
Constante	-1.621	0.611		-2.654	0.010
Carga	0.550	0.101	0.523	5.421	0.000

De este modo podemos deducir que la ecuación de correlación quedaría de la siguiente manera:  $\text{Log VHC-Ag} = 0.550 \text{ Log VHC-ARN} - 1.621$  ( $p < 0.005$ ), es decir según nuestros resultados en este grupo,  $800.000 \text{ UI/ml VHC-ARN} = 42,23 \text{ pg/ml VHC-Ag}$ .

#### 4.2 Pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis periódica.

En este grupo se estudiaron 60 pacientes, 35 varones (58.3%) y 25 mujeres (41.7%) con una edad media de 61,1 años (D.S 17.7 años). El tiempo medio en diálisis fue de 35.57 meses (D.S 45,96 meses), y la media de transfusiones sanguíneas recibidas por los pacientes fue de 2.54 (D.S 4.70 transfusiones). Los valores medios de transaminasas GOT y GPT fueron de 25.37 (D.S 20.03) y 19.73 (D.S 17.75) respectivamente. En todos ellos se estudió la enfermedad renal causante de la insuficiencia renal crónica, siendo la mas frecuente Diabetes Mellitus (26.7%), seguida de Glomerulonefritis (23.3%) y de hipertensión arterial (21.7%). El estudio de las frecuencias queda reflejado en la figura nº 22



**Figura nº 22:** Distribución de las distintas enfermedades renales.

En 10 pacientes se detectaron anticuerpos frente al VHC (16.66%), y 50 resultaron negativos (83.33%). En las tablas nº 14 y 15 quedan recogidos los datos epidemiológicos (sexo, edad, enfermedad renal, número de transfusiones, valores de GOT y GPT así como el tiempo en diálisis) de los pacientes VHC positivo y VHC negativo respectivamente.

**Tabla nº 14:** Datos epidemiológicos de los pacientes VHC positivo con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis.

Nº	Sexo	Edad	Enf. Renal	Nº transf	Actuales		Tº Diálisis (Meses)
					GOT	GPT	
1	Varón	44	Alport	4	26	27	144
2	Varón	45	Riñon poliquistico	1	27	22	36
3	Mujer	72	Hipertensión arterial	4	100	16	85
4	Varón	54	Glomerulonefritis	0	23	19	288
5	Varón	48	Hipertensión arterial	10	26	52	68
6	Mujer	38	Glomerulonefritis	0	30	18	12
7	Varón	74	Diabetes Mellitas	0	13	18	6
8	Varón	45	Glomerulonefritis	0	20	21	10
9	Mujer	67	Pielonefritis crónica	30	25	10	92
10	Varón	30	Glomerulonefritis	1	30	30	12

**Tabla nº 15:** Datos epidemiológicos de los pacientes VHC - con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis.

Nº	Sexo	Edad	Enf. Renal	Nº transf	Actuales		Tº Diálisis (Meses)
					GOT	GPT	
11	Mujer	52	Glomerulonefritis crónica	1	23	17	12
12	Mujer	59	Pielonefritis crónica	3	18	12	65
13	Varón	58	Nefropatia Interst Reflujo	0	14	16	4
14	Mujer	67	Riñon Poliquistico	5	4	9	77
15	Varón	73	Pielonefritis crónica	0	25	22	38
16	Varón	78	Diabetes Mellitus	0	13	12	12
17	Mujer	63	Nefroangioesclerosis	0	13	21	5
18	Mujer	68	Hipertensión arterial	0	18	21	26
19	Varón	44	Glomerulonefritis	0	24	32	6
20	Varón	38	Glomerulonefritis crónica	4	22	25	90
21	Mujer	85	Nefroangioesclerosis	2	18	7	5
22	Varón	61	Hipertensión arterial	2	15	13	5
23	Mujer	76	Diabetes Mellitus	2	30	7	64
24	Mujer	63	Diabetes Mellitus	0	30	12	62
25	Varón	61	Diabetes Mellitus	4	60	16	24
26	Mujer	32	Nefropatia Intersticial	0	110	14	25
27	Varón	52	Glomerulonefritis crónica	0	80	20	29
28	Varón	28	Esclerosis Tuberosa, Nefritis Intersticial	0	21	13	30
29	Varón	68	Diabetes Mellitus	0	20	16	49
30	Varón	53	Glomerulonefritis	0	14	20	5
31	Mujer	57	Glomerulonefritis	10	21	17	105
32	Mujer	72	Hipertensión arterial	2	18	18	16
33	Mujer	87	Hipertensión arterial	10	28	18	38
34	Mujer	62	Riñon Poliquistico	10	15	16	56
35	Varón	73	Diabetes Mellitus	2	18	14	11
36	Varón	75	Diabetes Mellitus	2	20	21	23
37	Varón	80	Hipertensión arterial	10	17	15	8
38	Varón	50	Diabetes Mellitus	2	22	25	8
39	Mujer	77	Diabetes Mellitus	3	27	16	16
40	Mujer	79	Hipertensión arterial	3	17	9	9
41	Varón	60	Diabetes Mellitus	0	15	10	26
42	Varón	27	Glomerulonefritis crónica	0	23	20	4
43	Varón	82	Hipertensión arterial	3	20	16	26
44	Mujer	77	Hipertensión arterial	0	15	10	12
45	Mujer	72	Hipertensión arterial	0	20	13	8
46	Mujer	63	Diabetes Mellitus	0	13	13	2
47	Varón	54	Glomerulonefritis crónica	0	30	32	23
48	Varón	86	Pielonefritis crónica	0	17	21	20
49	Varón	31	Glomerulonefritis crónica	2	83	142	44
50	Varón	68	Diabetes Mellitus	0	18	30	36
51	Varón	32	Glomerulonefritis crónica	0	16	11	124
52	Varón	81	Vasculorenal	0	15	14	4
53	Varón	80	Diabetes Mellitus	4	12	13	8
54	Varón	27	Riñon Poliquistico	2	20	12	2

55	Varón	77	Hipertensión arterial	3	14	11	16
56	Mujer	86	Pielonefritis crónica	10	20	12	25
57	Mujer	82	Diabetes Mellitus	1	27	19	18
58	Mujer	88	Diabetes Mellitus	0	14	9	29
59	Varón	40	Hipertensión arterial	0	18	20	10
60	Mujer	45	Glomerulonefritis crónica	0	17	29	21

Se relacionó la presencia de anticuerpos frente al VHC con edad, sexo, antecedentes de transfusiones, valores de transaminasas y tiempo en diálisis. Los resultados se expresan en la tabla nº 16.

**Tabla nº 16:** Relación de factores epidemiológicos con VHC-Ac

	VHC-Ac	Nº	Media	Desviación Típica	Significación (p)
Edad	+	10	51,70	4,795	0.066
	-	50	62,98	17,780	(n.s)
Transfusiones	+	10	5,00	9,333	0.346
	-	50	2,04	3,023	(n.s)
GOT	+	10	32,00	24,413	0.255
	-	50	24,04	19,059	(n.s)
GPT	+	10	23,30	11,519	0.491
	-	50	19,02	18,761	(n.s)
Tº Dialisis	+	10	75,30	87,567	0.121
	-	50	27,62	27,374	(n.s)

Al realizar la comparación de medias mediante la prueba t-student, se demuestra que no existen diferencias significativas entre el número de transfusiones, tiempo en diálisis, GOT y GPT en los pacientes VHC+ y VHC-, pero existen indicios de la diferencia respecto a la edad (p=0.066), aunque con los datos actuales no puede asegurarse, para demostrarlo habría que aumentar el tamaño de muestra.

Para el estudio de las variables cualitativas (sexo y enfermedad renal) se utilizó el test de Chi-cuadrado concluyendo que no existen diferencias significativas entre el sexo o la enfermedad renal de ambas muestras como se expresa en las tablas nº 17 y nº 18.

**Tabla nº 17:** Relación del sexo con VHC-Ac.

		VHC-Ac		p
		Negativo	Positivo	
Sexo	M	22	3	0.412
	V	28	7	(n.s)

**Tabla n° 18:** Relación de la enfermedad renal con VHC-Ac.

		VHC-Ac		p
		Negativo	Positivo	
<i>Enfermedad Renal</i>	Diabetes Mellitus	15	1	0.788
	GMN	10	4	
	GMN + HTA	1	0	
	HTA	11	2	
	Otras	6	1	
	Pielonefritis Crónica	4	1	
	Riñón Poliquístico	3	1	

HTA: Hipertensión.

GMN: Glomerulonefritis crónica

#### 4.2.1 Pacientes positivos para VHC-Ac (n=10)

En los pacientes VHC-Ac positivos, se realizó la confirmación de los mismos mediante Inmunoblot recombinante (Inno-Lia) resultando positiva en 7 de los diez pacientes (70%), indeterminado en dos casos (20%). Los pacientes 3 y 6 en los que sólo se detectó anticuerpos frente al péptido NS3), y negativa en uno de ellos (10%) lo que podría ser interpretado como un resultado falso positivo serológico.

Como marcadores de replicación vírica cuya presencia se asocia con infección aguda o crónica hemos determinado los anticuerpos IgM frente al VHC, el VHC-ARN y el VHC-Ag. Respecto al VHC-IgM hemos obtenido un resultado positivo en 5 pacientes (50%), y su presencia se ha asociado siempre con un resultado positivo con el test confirmatorio de anticuerpos. El VHC-ARN que en principio es la técnica de referencia para detectar viremia, lo hemos detectado en 7 pacientes (70%). El VHC-Ag lo hemos detectado en 6 pacientes (60%), y al cuantificarlo observamos que el rango de detección oscila entre 9 y 187 pg/ml con una media de 94.5 pg/ml. Los resultados se expresan en la tabla n° 19.

En los pacientes virémicos, se determinó el genotipo del VHC, siendo el genotipo más prevalente el 1b (57.14%), seguido del 1a (28.57%) y uno de ellos fue genotipo 4c (14.28%). El estudio estadístico para valorar diferencias en la distribución de genotipos mediante el tes de "Chi cuadrado de Pearson", mostró una  $p= 0.13$ , no existiendo por tanto diferencia significativas. (Tabla n° 20).



**Tabla n° 19:** Muestra basal de los pacientes VHC positivo con insuficiencia renal crónica, sometidos a hemodiálisis.

N° Paciente	VHC-Ac	Imno-LIA	VHC- AclgM	VHC-Ag		ARN	Genotipo
				pg	+/-		
1	+	+	+	9	+	+	1b
2	+	+	+	82	+	+	4c
3	+	ID	-	141	+	+	1b
4	+	+	+	59	+	+	1b
5	+	+	-	89	+	+	1a
6	+	ID	-	-	-	-	NP
7	+	+	+L	-	-	+	1b
8	+	+	+	187	+	+	1a
9	+	-	-	-	-	-	NP
10	+	+	-	-	-	-	NP

ID: Indeterminado.

NP: No procede

+L: Positivo límite

**Tabla n° 20:** Relación estadística del genotipo VHC con respecto VHC-Ag

		GENOTIPO				Total	Significación
		1a	1b	4c	NP		
ANTIGENO	Negativo	0	1	0	2	3	0.131 (n.s)
	Positivo	2	3	1	0	6	
Total		2	4	1	2	9	

Hemos comprobado la validez interna y externa de los anticuerpos VHC-IgM y del VHC-Ag con la técnica gold estándar, que en nuestro caso es el VHC-ARN.

Observamos que en los cinco pacientes en los que se detecta anticuerpos de tipo IgM, se detecta VHC-ARN, pero sin embargo en dos pacientes virémicos (n° 3 y 6), no se detectó IgM. Cuando se estudió la validez entre estas dos técnicas se obtuvo una sensibilidad de 71.4%, la especificidad fue de 100%, la razón de probabilidades diagnosticas fue  $\infty$ , el VPP es de 1 y el VPN de 0.6.

Respecto a la detección del antígeno observamos que en los pacientes en los que se detecta VHC-Ag, en todos ellos se detecta ARN y solo en el paciente n° 7 se detecta ARN en ausencia de VHC-Ag. Cuando se estudió la validez entre estas dos técnicas los resultados obtenidos fueron una sensibilidad de 85%, una especificidad de 100%, una razón de probabilidades diagnosticas de  $\infty$ , un VPP de 1 y un VPN de 0.75.

En los pacientes positivos para el VHC-Ac, se realizó un estudio retrospectivo y prospectivo. En las diferentes muestras se estudió la presencia de anticuerpos frente al VHC, confirmación de los mismos mediante inmunoblot recombinante, anticuerpos de tipo IgM, VHC-ARN (en aquellas muestras que estaban bien conservadas) y detección y cuantificación en los casos positivos del VHC-Ag.

Para el estudio prospectivo, se utilizaron las muestras que disponíamos de cada paciente de nuestra seroteca, y para el estudio retrospectivo, se han recogido muestras durante un periodo de tiempo que osciló entre 17 y 22 meses.

En función de los resultados obtenidos en el seguimiento y para realizar una exposición mas clara de los mismos, hemos reagrupado estos 10 pacientes en tres niveles según resultados similares:

- A. Pacientes VHC-Ag<sup>+</sup> y ARN<sup>+</sup>.
- B. Pacientes VHC-Ag<sup>-</sup> y ARN<sup>-</sup>.
- C. Pacientes VHC-Ag<sup>-</sup> y ARN<sup>+</sup>.

**A. Pacientes VHC-Ag<sup>+</sup> y ARN<sup>+</sup>.**

En este grupo se engloban los pacientes 2, 3, 4, 5 y 8, todos ellos virémicos al comienzo del estudio. De ellos 2 presentaron el genotipo 1b, uno el genotipo 1c y dos el genotipo 1a. En la tabla nº 21 quedan expresados los resultados obtenidos.

**Tabla nº 21:** Estudio evolutivo de los pacientes VHC<sup>+</sup>, con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis, con VHC-Ag<sup>+</sup> y ARN<sup>+</sup>.

Nº Paciente	Cadencia	VHC-Ac	Inmo-LIA	VHC-AcIgM	VHC-Ag		AR N	Genotipo
					pg	p/n		
<b>2</b>	-29	+	+	+	55	+		<b>4c</b>
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>82</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
	2	+	+	+	129	+	+	
	4	+	+	+	200	+		
	5	+	+	+	72	+		
	12	+	+	+	192	+	+	
	17	+	+	+	49	+		
22	+	+	+	15	+	+		
<b>3</b>	-39	+	+	-	28	+	+	<b>1b</b>
	-38	+	+	-	10	+		
	-20	+	+	-	15	+		
	-15	+	ID	-	2	+		
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>ID</b>	<b>-</b>	<b>141</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	

	4	+	+	-	57	+		
	5	+	ID	-	125	+		
	6	+	ID	-	208	+	+	
<b>4</b>	-33	+	+	-	38	+	+	
	-29	+	+	-	40	+		
	-12	+	+	-	59	+	+	
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>78</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>1b</b>
	2	+	+	+	209	+	+	
	4	+	+	+	57	+		
	12	+	+	-	117	+		
	17	+	+	-	121	+	-	
	22	+	+	-	54	+	+	
<b>5</b>	-48	+	+	+	49	+		
	-29	+	+	+	199	+		
	-12	+	+	-	114	+	-	
	-4	+	+	-	106	+		
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>88</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>1a</b>
	2	+	+	-	113	+		
	4	+	+	-	378	+	+	
	5	+	+	-	93	+		
	17	+	+	-	164	+	+	
	20	+	+	-	137	+		
<b>8</b>	-2	+	+	+	56	+	+	
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>188</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>1a</b>
	2	+	+	+	279	+	+	
	3	+	+	+	168	+		
	12	+	+	+	223	+	-	
	17	+	+	+	160	+	+	

ID: Indeterminado.

Respecto al test confirmatorio observamos que cuatro pacientes fueron siempre positivos y uno de ellos (paciente n°3) resulto indeterminado en cuatro muestras (50%) y en dos de estas muestras se detectó el VHC-ARN.

Respecto anticuerpos IgM, en los pacientes 2 y 8 fueron siempre positivos, en el paciente 3 fueron siempre negativos y en los pacientes 4 y 5 fueron positivas en 5 de las 19 muestras totales (26,31%).

Al comparar los resultados para el VHC-Ag y el VHC-ARN, observamos que en dos pacientes existe una concordancia entre ambos en el 100% de las muestras, en el paciente 4 la concordancia es del 83.33% y en los pacientes 5 y 8 es del 75%. Valorando el total de muestras estudiadas en todos los pacientes podemos decir que la concordancia es 86.36%. Los valores de VHC-Ag varían durante el seguimiento de los pacientes con valores

comprendidos entre 10pg/ml y 378pg/ml con excepción de una muestra del paciente nº 3 en la que se obtuvieron resultados positivos bajos (2pg/ml) coincidiendo con resultado indeterminado en el test confirmatorio Inno-LIA.

### B. Pacientes VHC-Ag- y ARN-.

En este grupo se engloban los pacientes 6, 9 y 10, no virémicos al comienzo del estudio. En la tabla nº 22 quedan expresados los resultados obtenidos.

**Tabla nº 22:** Estudio evolutivo de los Pacientes VHC<sup>+</sup>, con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis, con VHC-Ag<sup>-</sup> y ARN<sup>-</sup>.

Nº Paciente	Cadencia	VHC-Ac	Inmo- LIA	VHC- AcIgM	VHC-Ag		ARN	Gntpo
					pgr	p/n		
<b>6</b>	-19	+	ID	-	-	-		<b>NP</b>
	-2	+	ID	-	-	-		
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>ID</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
	2	+	ID	-	-	-		
	3	+	ID	-	-	-		
	19	+	ID	-	-	-		
<b>9</b>	-38	-	NP	NP	-	-	NP	<b>NP</b>
	-35	-	NP	NP	-	-	NP	
	-29	-	NP	NP	-	-	NP	
	-24	+L	-	-	-	-		
	-23	-	NP	NP	-	-	-	
	-7	-	NP	-	-	-		
	-4	+L	-	-	-	-		
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
	2	+	-	-	-	-	-	
4	-	NP	NP	-	-	-		
<b>10</b>	-10	+	+	-	-	-	-	<b>NP</b>
	-7	+	+	-	-	-		
	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	
	2	+	+	-	-	-	-	
	5	+	+	-	-	-	+	
	14	+	+	-	-	-	-	
	17	+	+	-	-	-	-	

NP: No Procede.

ID: Indeterminado.

+L: Positivo Limite

Al realizar el inmunoblot recombinante, observamos que en un paciente fue siempre positivo, otro fue siempre indeterminado, y otro fue negativo. Los anticuerpos de tipo IgM fueron siempre negativos.

El VHC-Ag y el VHC-ARN, fueron siempre negativos excepto en la última muestra del paciente 10 que se obtuvo un resultado positivo para el VHC-ARN y negativo para el VHC-Ag.

La paciente n° 9 podría ser considerada un falso positivo para el virus de la hepatitis C. La paciente falleció a los cuatro meses del comienzo del estudio por lo que se buscaron un mayor número de muestras anteriores a la basal.

### C. Pacientes VHC-Ag<sup>-</sup> y ARN<sup>+</sup>.

En este grupo se engloban los pacientes n° 1 y 7, virémicos al comienzo del estudio, ambos con genotipo 1b. En la tabla n° 23 quedan expresados los resultados obtenidos.

**Tabla n° 23:** Estudio evolutivo de los Pacientes VHC<sup>+</sup>, con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis, con VHC-Ag<sup>-</sup> y ARN<sup>+</sup>.

N° Paciente	Cadencia	VHC-Ac	Inmo- LIA	VHC- AclgM	VHC-Ag		ARN	Gntpo
					pgr	p/n		
1	-16	+	+	+	38	+		1b
	-3	+	+	+	13	+		
	0	+	+	+	9	+	+	
	2	+	+	+	-	-	+	
	4	+	+	+	-	-		
	5	+	+	+	-	-	+	
	12	+	+	+	-	-		
	17	+	+	+	-	-	+	
7	-5	+	+	+	-	-		1b
	0	+	+	+L	-	-	+	
	2	+	ND	ND	-	-	+	
	3	+	+	+	-	-	+	
	11	+	ND	+	-	-		
	12	+	ND	+	-	-		
	15	+	+	+L	-	-	+	
	20	+	ND	+	-	-	+	

Todas las muestras fueron positivas con el inmunoblot recombinante, al igual que sucede con los anticuerpos de tipo IgM.

Al comparar los resultados observamos que en el paciente 1, el VHC-Ag y el VHC-ARN fueron positivos en la muestra basal aunque la concentración obtenida para el VHC-Ag fue solo de 9 pg/ml. En las muestras retrospectivas el VHC-Ag fue positivo y el VHC-ARN no pudo ser determinado. En el estudio prospectivo el VHC-ARN fue siempre positivo y el VHC-Ag fue negativo. Ante estas discordancias se procedió a determinar la carga viral de VHC en las

muestras 5 y 17 obteniéndose 15.000UI/ml y 3.600UI/ml respectivamente. En el paciente nº 7 no se detectó nunca el VHC-Ag y por el contrario el ARN fue siempre positivo. En la muestra obtenida a los 20 meses se detectó la carga vírica con valores 3.380UI/ml.

#### 4.2.2 Pacientes negativos para VHC-Ac.

En los 50 pacientes VHC-Ac negativo se hizo un estudio prospectivo obteniéndose una muestra al año. Este seguimiento solo se pudo realizar en 32 pacientes, ya que 10 fallecieron, 3 cambiaron de domicilio y 5 fueron transplantados. Los resultados quedan expresados en la tabla nº 24.

**Tabla nº 24:** Resultados de los estudios prospectivos de los pacientes VHC negativo, con insuficiencia renal crónica, sometidos a hemodiálisis.

ID muestras	VHC-Ac <sup>-</sup>	VHC-Ac <sup>+</sup>	VHC-Ag <sup>+</sup>	ARN <sup>+</sup>
0	50	0	0	0
1	32	0	0	0

0: Muestras Basales.

1: Muestras al año.

Se observa una concordancia del 100% entre los resultados obtenidos para el VHC-Ag y para el ARN.

#### 4.3 Pacientes coinfectados por VIH y VHC.

En este grupo se seleccionaron 51 pacientes, 12 mujeres (23.5%) y 39 varones (76.5%) con una edad media de 39.31 años (D.S 6.73 años). La media de la GPT fue de 73.72 (D.S 73.21).

A todos los pacientes se les determinó como marcador de replicación viral el VHC-ARN y el VHC-Ag que se cuantificó cuándo se obtuvo un resultado positivo. En los pacientes VHC-ARN y que se disponía de muestra se estudió el genotipo de VHC. Los resultados se expresan en la tabla nº 25.

**Tabla nº 25:** Resultados de los estudios realizados en pacientes coinfectados (VIH<sup>+</sup>/VHC<sup>+</sup>).

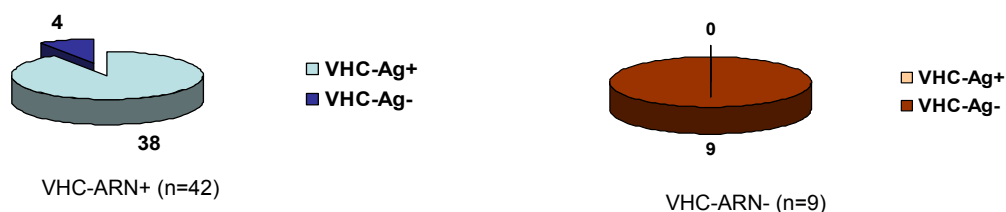
Nº Paciente	VHC-Ac	Edad	Sexo	ALT	VHC-Ag		ARN	Gntpo
					pgr	p/n		
1	+	34	V	60	95	+	+	ND
2	+	46	M	90	23	+	+	1a
3	+	31	V	45	32	+	+	1a
4	+	29	V	8	-	-	-	NP

5	+	36	V	99	140	+	+	1b
6	+	42	V	52	-	-	-	NP
7	+	43	V	55	206	+	+	1a
8	+	35	M	56	78	+	+	ND
9	+	40	V	62	151	+	+	1a
10	+	41	V	53	42	+	+	1a
11	+	36	V	84	427	+	+	1a
12	+	42	V	14	-	-	-	NP
13	+	37	M	26	71	+	+	4cd
14	+	38	V	42	476	+	+	ND
15	+	32	V	92	450	+	+	1
16	+	40	V	138	8	+	+	3a
17	+	34	M	30	54	+	+	3a
18	+	29	V	43	3	+	+	1a
19	+	33	V	34	37	+	+	4cd
20	+	37	V	90	2	+	+	3a
21	+	38	V	115	118	+	+	3a
22	+	44	V	37	-	-	-	NP
23	+	46	V	43	89	+	+	4cd
24	+	39	V	20	-	-	-	NP
25	+	37	V	82	203	+	+	ND
26	+	37	M	31	77	+	+	ND
27	+	33	V	205	174	+	+	ND
28	+	49	V	21	-	-	+	1b
29	+	38	V	160	51	+	+	1b
30	+	33	M	100	149	+	+	1a/1b
31	+	33	M	90	104	+	+	1a/1b
32	+	42	V	19	-	-	-	NP
33	+	42	V	77	17	+	+	ND
34	+	38	M	116	309	+	+	ND
35	+	38	M	142	146	+	+	ND
36	+	33	M	70	33	+	+	1b
37	+	41	M	25	-	-	+	ND
38	+	49	V	75	45	+	+	1b
39	+	44	V	65	179	+	+	ND
40	+	46	V	84	4	+	+	ND
41	+	37	V	43	87	+	+	1a
42	+	26	V	21	-	-	+	ND
43	+	33	V	26	-	-	-	NP
44	+	49	V	44	2	+	+	1b
45	+	46	V	37	-	-	-	NP
46	+	40	V	28	-	-	-	NP
47	+	40	V	64	91	+	+	ND
48	+	51	V	129	35	+	+	ND
49	+	45	V	29	262	+	+	1a
50	+	38	M	42	41	+	+	1a
51	+	65	V	496	-	-	+	1

ND: No Determinado.

NP: No Procede.

Al estudiar el VHC-ARN en estos pacientes, éste se detectó en 42 pacientes (82,46%), y fue negativo en 9 pacientes (17,6%). Al estudiar el VHC-Ag se obtuvo un resultado positivo en 38 (74,5%) y negativo en 13 pacientes (25,5%). El valor medio obtenido para el antígeno fue de 88.18pg/ml (D.S 118.53). Los resultados se reflejan en la figura nº 23.



**Figura nº 23:** Comparación entre ARN y VHC-Ac

Al estudiar la validez entre ambas técnica, tomando como técnica de refeencia el VHC-ARN, los resultados obtenidos fueron: una sensibilidad del 92%, una especificidad del 100%, un VPP de 1 y un VPN de 69%.

Analizando los datos de los 4 pacientes con resultados discordantes, observamos que dos son mujeres y otros 2 son varones. Las edades son 49, 41, 26 y 65 años. De los cuatro tres presentan cifras de transaminasas bajas (21, 25 y 21 respectivamente), y uno de ellos presentaba unos valores de transaminasas de 426 mUI/ml. Respecto al genotipo solo se pudo realizar en dos pacientes, y los genotipos resultantes fueron el 1b y el 1.

Se estudió si existían diferencias significativas entre los pacientes virémicos (VHC-ARN positivos) y los no virémicos (VHC-ARN negativos) en las variables estudiadas (edad, niveles de transaminasas). Para el estudio de estas variables cuantitativas se aplicó el test de t-student, y los resultados se expresan en la tabla nº 26.

**Tabla nº 26:** Relación de los factores epidemiológicos y el VHC-ARN.

	ARN-VHC	Nº	Media	Desviación típica	P
EDAD	+	42	39,24	7,043	0.865 (n.s)
	-	9	39,67	5,408	
ALT	+	42	82,57	77,062	0.037 (s)
	-	9	26,78	13,553	

n.s: no significativo.

s: significativo.



En los pacientes VHC-ARN positivos, se obtienen cifras de ALT más elevada que en los que no se detecta el VHC-ARN con diferencias significativas ( $p=0.037$ ).

De igual modo se estudió si existían diferencias significativas entre la presencia o ausencia de VHC-Ag con respecto a la edad y los valores de ALT, no encontrándose diferencias significativas. Los resultados quedan expresados en la tabla nº 27

**Tabla nº 27:** Relación de la edad y ALT con VHC-Ag.

	VHC-Ag	Nº	Media	Desviación típica	P
EDAD	+	36	38.36	5.26	0.119
	-	15	41.60	9.21	(n.s)
ALT	+	36	76.97	41.05	0.527
	-	15	62.53	121.54	(n.s)

n.s: no significativo.

s: significativo.

Para estudiar si existe influencia del sexo en la detección o no del VHC-ARN, el test estadístico empleado es el de Chi-cuadrado de Pearson. Este mismo test es empleado para ver si existen diferencias significativas frente a la detección o no del VHC-Ag. Los resultados se expresan en las tablas nº 28 y nº 29 respectivamente.

**Tabla nº 28:** Relación del sexo con ARN.

		ARN		Significación (P)
		Negativo	Positivo	
SEXO	M	0	12	0.067
	V	9	30	(n.s)

n.s: no significativo.

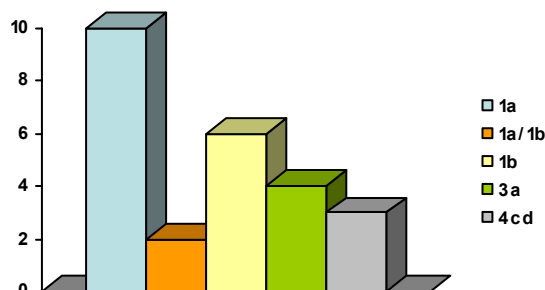
**Tabla nº 29:** Relación del sexo con VHC-Ag.

		VHC-Ag		Significación (p)
		Negativo	Positivo	
SEXO	M	1	11	0.067
	V	14	25	(n.s)

n.s: no significativo.

En ambos casos (VHC-ARN y VHC-Ag) nuestros resultados indican que no existen diferencias entre pacientes replicadores y no replicadores con respecto al sexo, aunque dado el valor tan bajo de significación en ambos casos ( $p=0.067$ ), habría que aumentar el tamaño de muestra.

En los pacientes en los que se detecto VHC-ARN, se procedió a estudiar el genotipo, siendo el más frecuente el 1a (40.4%) seguido de 1b y 3a como se expresa en la figura nº 24.



**Figura nº 24:** Distribución de genotipos

Para ver si existía diferencias significativas entre el genotipo y el VHC-Ag se estudió la media de antígeno en pg/ml en función del genotipo y se le aplicó el test estadístico Anova. No se encontraron diferencias significativas entre los mismos, con una  $p=0.06$ , es decir habría que aumentar el tamaño de la muestra para ver si realmente no existen diferencias significativas. Los resultados quedan expresados en la tabla nº 30

**Tabla nº 30:** relación entre los genotipos y la concentración de VHC-Ag

Genotipo	VHC-Ag (pg/ml)	p
1	450	0.06 (n.s)
1a	127.4	
1a/1b	126.5	
1b	54.2	
3a	45.5	
4cd	65.66	

n.s: no significativo.

#### **4.4 Pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferón o interferón más ribavirina.**

A este grupo pertenecen 14 pacientes, 5 mujeres (35.7%) y 9 varones (64.3%), con una edad media de 37.30 años (D.S 5.15) y unos niveles medios de GPT de 95.6mU/ml (D.S 48). En la tabla nº 31 se recogen los datos epidemiológicos (edad y sexo) así como el tratamiento que seguía cada paciente (interferón o interferón asociado ribavirina, durante 6 meses o 12 meses) y si era respondedor o no a dicho tratamiento. Definimos como respuesta sostenida la negativización de ARN-VHC 6 meses después de suspender la terapia, no respondedor como la presencia de ARN durante la terapia y al finalizar la misma, y respuesta

con recidivas a la desaparición temporal del ARN durante el tratamiento pero volviendo a ser positivo seis meses después de suspender la terapia.

**Tabla n° 31:** Factores epidemiológicos y tratamiento de los pacientes

N° Paciente	Sexo	Edad	Protocolo	Respuesta
1	Varón	42	INF/12M	RS
2	Mujer	52	I+R/12M	RS
3	Varón	48	I+R/12M	RV
4	Mujer	32	I+R/12M	RV
5	Varón	32	I+R/12M	RS
6	Varón	34	I+R/12M	NR
7	Varón	23	INF/12M	NR
8	Varón	28	I+R/6M	RV
9	Varón	44	INF/12M	NR
10	Mujer	46	I+R/12M	RS
11	Varón	31	INF/6M	RV
12	Mujer	52	I+R/12M	NR
13	Varón	20	INF/6M	RS
14	Mujer	25	I+R/12M	NR

INF/12M: Interferón 12 meses.

RS: Respuesta sostenida.

I+R/12M: Interferón y ribavirina 12 meses.

RV: Recidiva.

I+R/6M: Interferón y ribavirina 6 meses

NR: Ausencia de respuesta.

INF/6M: Interferón 6 meses.

Se estudió si existía relación significativa entre los datos epidemiológicos (edad y sexo) y el ser respondedor o no al tratamiento. Para un mejor estudio estadístico se han considerado como no respondedores al tratamiento tanto a no respondedores propiamente dichos como a los pacientes que ha recidivado.

En la tabla n° 32 queda reflejado los resultados estadísticos obtenidos al aplicar la t-student para hallar la significación entre la respuesta al tratamiento y la edad.

**Tabla n° 32:** Resultados estadísticos de las variables edad/respuesta al tratamiento

	Respuesta	N°	Media	Desviación típica	p
EDAD	RS	5	38.40	12.60	0.619 (n.s)
	RV/NR	9	35.22	10.35	

RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta

En la tabla nº 33 se reflejan los resultados obtenidos al aplicar el estudio estadístico chi-cuadrado, para ver si existía significación entre el sexo y la respuesta al tratamiento.

**Tabla nº 33:** Resultados estadísticos de las variables sexo/respuesta al tratamiento

		Repuesta		Significación (p)
		RV/NR	RS	
SEXO	M	3	2	0.62 (n.s)
	V	6	3	

RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta

Al comienzo del estudio se valoró en cada uno de los 14 pacientes las transaminasas basales, el VHC-Ag basal (tanto de forma cualitativa como cuantitativa), la carga viral basal y se estudió el genotipo de cada uno de ellos. En el caso del paciente nº 9 no fue posible estudiar ni la carga viral basal ni el genotipo por falta de muestra. Los resultados obtenidos en los 14 pacientes quedan reflejados en la tabla nº 34.

**Tabla nº 34:** Resultados obtenidos en las muestras basales de estos pacientes

Nº Paciente	Alt	VHC-Ag		Carga Viral	Gntpo	Respuesta
		pg	p/n			
1	239	165	+	600.000	3a	RS
2	57	33	+	596600	1b	RS
3	113	40	+	228300	1b	RV
4	50	34	+	229300	1b	RV
5	106	120	+	261300	1	RS
6	114	212	+	611000	1b	NR
7	97	17	+	151000	1b	NR
8	92	296	+	394000	3a	RV
9	471	107	+	ND	ND	NR
10	70	160	+	1071700	1b	RS
11	49	3	+	150600	3a	RV
12	109	87	+	1203000	1b	NR
13	202	15	+	223900	1b	RS
14	97	453	+	776800	1a	NR

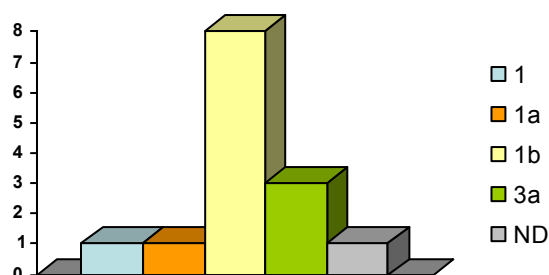
RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta.

ND: No determinado.

El genotipo más frecuente entre los 13 pacientes fue el 1b (57%), seguido del 3a (21.4%) tal y como queda reflejado en figura nº 35.



ND: No determinado.

**Figura nº 35:** Resultados de las frecuencias de los distintos genotipos.

Se estudió si existían diferencias significativas entre el genotipo detectado en cada paciente y su respuesta al tratamiento. No se encontraron diferencias significativas. Los resultados están reflejados en la tabla nº 35.

**Tabla nº 35:** Resultados estadísticos del genotipo frente a la respuesta al tratamiento.

Genotipo	Respuesta		p
	RV/NR	RS	
1	0	1	0,57 (n.s)
1a	1	0	
1b	5	3	
3a	2	1	
ND	1	0	

ND: No determinado.

También se valoraron los resultados basales de VHC-Ag, carga viral y ALT de los 14 pacientes frente a la respuesta del tratamiento sin encontrarse diferencias significativas en ninguno de los casos. Los resultados están resumidos en la tabla nº 36

**Tabla nº 36:** Resultados estadísticos del VHC-Ag, Carga viral y ALT frente a la respuesta al tratamiento.

	Respuesta	Nº	Media	Desviación típica	p
VHC-Ag pg/ml	RS	5	98,4	71,8	0.591 (n.s)
	RV/NR	9	138,7	152,6	
Carga Viral UI/ml	RS	5	550,7	341.514,6	0.696 (n.s)
	RV/NR	8*	467.875	373.717,19	
ALT mU/ml	RS	5	134,8	81,32	0.97 (n.s)
	RV/NR	9	132,4	129,0	

RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta

En este grupo, también se valoró la correlación existente entre los niveles basales de antígeno y los niveles basales de VHC-ARN y se vio si dicha relación se podía cuantificar, aunque el número de muestra fuera relativamente pequeño. Se realizó un análisis de correlación y regresión, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, para posteriormente calcular la ecuación de correlación de este grupo. El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) que obtuvimos fue de 0.709 con una  $p < 0.05$ , es decir la correlación existente entre ambas variables es moderada. La ecuación de correlación que calculamos fue  $\text{Log VHC-Ag} = -5,943 + 1.383 \text{ Log VHC-ARN}$ , es decir en este grupo y considerando la ecuación de correlación obtenida, 800.000UI/ml VHC-ARN equivaldrían a 166 pg/ml de VHC-Ag. Esta buena correlación queda de manifiesto en la grafica de dispersión. (Figura nº 36).

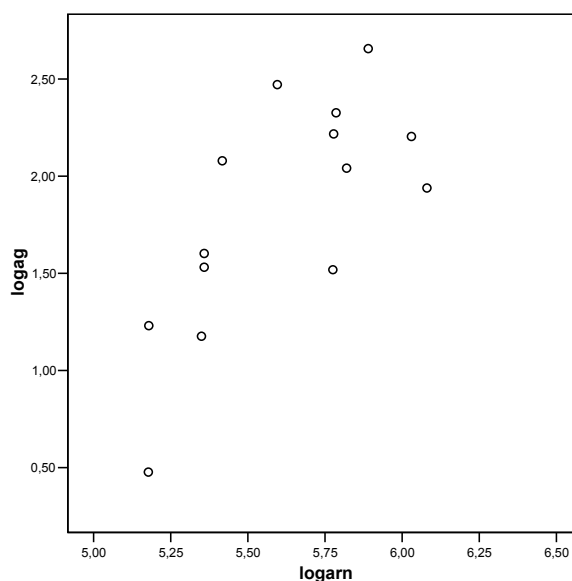


Figura nº 36: Diagrama de dispersión del VHC-Ag/VHC-ARN en el grupo de pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferon o interferon-ribavirina.

En función de la respuesta al tratamiento hemos agrupado los pacientes en respondedores en tres niveles:

- A. Respuesta Sostenida
- B. Recidivas
- C. Ausencia de respuesta.

**A. Pacientes con respuesta sostenida**

A este grupo pertenecen 5 pacientes, el 35,71 % de los pacientes tratados. De los cinco pacientes, tres fueron tratados con interferón y ribavirina durante 12 meses, uno con interferón durante 12 meses y otro con interferón durante 6 meses. En estos pacientes se estudió en la muestra basal antes del comienzo del tratamiento las transaminasas (ALT), la carga viral expresada en UI/ml, el genotipo y el VHC-Ag cuantificándose en pg/ml cuando fue positivo. En todos los pacientes se realizó un seguimiento aproximadamente cada cuatro

meses durante el tratamiento y una vez finalizado el mismo (a los siete u ocho meses). En todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo. En la tabla n° 37 se expresan los resultados obtenidos durante dicho seguimiento

**Tabla n° 37:** Resultados obtenidos en los pacientes con respuesta sostenida.

N° Paciente	Cadencia (meses)	Protocolo	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral (UI/ml)	Gntpo
				pg	p/n			
1	0	INF/12M	239	165	+	+	600000	3a
	4		20	-	-	+		
	9		18	-	-	-		
	14		39	-	-	-		
	19		17	-	-	-		
2	0	I+R/12M	57	33	+	+	596600	1b
	3		13	-	-	-		
	9		11	-	-	-		
	15		17	-	-	-		
	20		17	-	-	-		
5	0	I+R/12M	106	120	+	+	261300	1
	2		25	6	+	+		
	9		26	-	-	+		
	17		32	-	-	-		
	21		ND	-	-	-		
10	0	I+R/12M	70	160	+	+	1071700	1b
	3		18	-	-	-		
	9		35	-	-	-		
	15		18	-	-	-		
	20		12	-	-	-		
13	0	INF/6M	202	15	+	+	223900	1b
	3		30	-	-	-		
	9		16	-	-	-		
	11		14	-	-	-		

INF/12M: Interferón 12 meses.

I+R/12M: Interferón y ribavirina 12 meses.

INF/6M: Interferón 6 meses.

Destacamos que cuatro pacientes (80%) presentaban una carga viral basal inferior a 800.000 UI/ml. Tres de de los cinco pacientes (60%) tenían genotipo 1b, uno (20%) el genotipo 3a y otro (20%) genotipo 1. Respecto al VHC-Ag, tres de ellos (60%) presentaban valores superiores a 100 pg/ml. En cuanto los valores iniciales de transaminasas, tres de ellos (60%) presentaban valores superiores a 100 mU/ml.

Durante el tratamiento se produjo la normalización de las cifras de transaminasas en todos los pacientes, con caídas importantes a los tres meses de iniciarse el mismo. En tres pacientes (60%), la negativización del VHC-ARN y el VHC-Ag se produce a los tres meses; en los dos pacientes restantes la negativización del VHC-Ag precede a la del VHC-ARN.

### **B. Pacientes que recidivan**

En este grupo se engloban a 4 pacientes que representa un 28 % del total. De los cuatro pacientes tres fueron tratados con interferón y ribavirina, dos de ellos durante 12 meses, y uno durante 6 meses. El otro paciente fue tratado con interferón durante 6 meses. En estos pacientes se estudió en la muestra basal del tratamiento las transaminasas (ALT), la carga viral expresada en UI/ml, el genotipo y el VHC-Ag cuantificándose en pg/ml cuando fue positivo. En todos los pacientes se realizó un seguimiento, aproximadamente cada cuatro meses durante el tratamiento, y una vez finalizado el mismo (a los seis, siete, diecisiete y nueve meses). En todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo. En la tabla nº 38 se expresan los resultados obtenidos durante dicho seguimiento.

**Tabla nº 38:** Resultados obtenidos en los pacientes que recidivan durante el tratamiento

Nº Paciente	Cadencia	Protocolo	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral	Gntpo
				pg	p/n			
3	0	I+R/12M	113	40	+	+	228300	1b
	3		18	-	-	-		
	8		11	-	-	-		
	15		55	16	+	+		
	18		181	18	+	+		
4	0	I+R/12M	50	34	+	+	229300	1b
	3		26	5	+	+		
	8		17	-	-	-		
	12		36	2	+	-		
	19		74	29	+	+		
8	0	I+R/6M	92	296	+	+	394000	3a
	4		33	-	-	-		
	12		332	175	+	+		
	19		120	475	+	+		
	25		ND	468	+	+		
11	0	INF/6M	49	3	+	+	150600	3a
	2		21	-	-	-		
	4		13	-	-	-		
	7		79	10	+	+		
	15		56	2	+	+		

I+R/12M: Interferón y ribavirina 12 meses.



I+R/6M: Interferón y ribavirina 6 meses

INF/6M: Interferón 6 meses.

Destacamos que los cuatro pacientes 100% tenían una carga viral basal inferior a 800.000 UI/ml, dos de ellos 50% tenían genotipo 1b y dos 50% genotipo 3a. Respecto al VHC-Ag, uno de ellos 25% presentaba valores superiores a 100 pg/ml. Respecto los valores iniciales de transaminasas, solamente uno de ellos 25% presentaban valores superiores a 100 mU/ml.

Durante el tratamiento destaca que en todos los pacientes se producen la normalización de las cifras de transaminasas a los tres meses del inicio, pero posteriormente se elevan alcanzando valores superiores a los iniciales cuando finalizan el tratamiento. En todos los pacientes el comportamiento del VHC-ARN y el VHC-Ag es el mismo, es decir la negativización y la recidiva se produce a la vez con la única excepción del paciente nº 4.

### C. Ausencia de respuesta

A este grupo pertenecen 5 pacientes que representan un 35.71% del total. De los cinco pacientes tres fueron tratados con interferón y ribavirina durante 12 meses y dos con interferón durante 12 meses. En estos pacientes se estudió en la muestra basal las transaminasas (ALT), la carga viral expresada en UI/ml, el genotipo y el VHC-Ag cuantificándose en pg/ml cuando fue positivo. En todos los pacientes se realizó un seguimiento aproximadamente cada cuatro meses durante el tratamiento y una vez finalizado el mismo (a los siete u ocho meses). En todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo. En la tabla nº 39 se expresan los resultados obtenidos durante dicho seguimiento.

**Tabla nº 39:** Resultados obtenidos en los pacientes no respondedores

Nº Paciente	Cadencia	Protocolo	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral	Gntpo
				pg	p/n			
6	0	I+R/12M	114	212	+	+	611000	1b
	3		40	11	+			
	8		35	20	+			
	12		45	42	+			
	14		105	94	+			
	29		ND	110	+			
7	0	INF/12M	97	17	+	+	151000	1b
	3		50	4	+			
	9		170	8	+			
	12		116	9	+			
	19		81	13	+			
9	0	INF/12M	471	107	+	+	ND	ND

	4		59	46	+	+		
	9		24	-	-	+		
	14		50	124	+	+		
	20		245	77	+	+		
12	0	I+R/12M	109	87	+	+	1203000	1b
	3		47	5	+	+		
	8		23	3	+	+		
	14		ND	36	+	+		
	20		46	92	+	+		
14	0	I+R/12M	97	453	+	+	776800	1a
	3		41	12	+	+		
	8		39	29	+	+		
	15		64	165	+	+		
	18		ND	100	+	+		

INF/12M: Interferón 12 meses.

I+R/12M: Interferón y ribavirina 12 meses.

Destacamos que tres pacientes (60%) tenían una carga viral basal inferior a 800.000 UI/ml, y en uno de ellos no pudo ser determinada. Tres de ellos (60%) tenían genotipo 1b, uno (20%) genotipo 1a y otro no pudo ser determinado. Respecto al VHC-Ag, tres de ellos (60%) presentaban valores superiores a 100 pg/ml. En cuanto los valores iniciales de transaminasas, tres de ellos (60%) presentaban valores superiores a 100 mU/ml y dos de ellos de 97 mU/ml.

Durante el tratamiento, a los tres meses se produce una disminución en las cifra de transaminasas pero en todos hay una elevación de las mismas al finalizar el tratamiento. En ningún paciente se negativiza el VHC-ARN ni el VHC-Ag aunque se observa una disminución de los niveles de antígeno a los tres meses de comenzar el tratamiento y una elevación de la concentración del mismo. Solo existe una excepción en una muestra puntual del paciente nº 9 en la se produce la negativización del VHC-Ag.

#### **4.5 Pacientes con hepatitis crónica en tratamiento con interferon pegilado y ribavirina.**

A este grupo pertenecen 15 pacientes, 7 mujeres (46.7%) y 8 varones (53.3%), con una edad media de 37.6 años (D.S 5.15) y unos niveles medios de ALT de 95.60 mU/ml (D.S 123.306). En la tabla nº 40 se recogen los datos epidemiológicos (edad y sexo). Todos fueron tratados con interferon pegilado y ribavirina dependiendo la pauta del genotipo. Los pacientes con genotipo 3 fueron sometidos a tratamiento durante 6 meses y se les realizó un control a los 12 meses, los pacientes con genotipo 1 y 4 se trataron durante un año y se les realizó un control a los 18 meses En la tabla nº se reflejan los datos epidemiológicos y la respuesta de los pacientes al tratamiento. Definimos como respuesta sostenida la negativización de ARN-

VHC 6 meses después de suspender la terapia, no respondedor como la presencia de ARN durante la terapia y al finalizar la misma, y respuesta con recidivas a la desaparición temporal del ARN durante el tratamiento pero volviendo a ser positivo seis meses después de suspender la terapia.

**Tabla nº 40:** Factores epidemiológicos y tratamiento de los pacientes

Nº Paciente	Sexo	Edad	Protocolo	Respuesta
1	V	30	INFPR	RS
2	V	29	INFPR	RS
3	V	43	INFPR	NR
4	V	39	INFPR	RV
5	M	38	INFPR	RS
6	V	44	INFPR	RS
7	M	37	INFPR	NR
8	M	42	INFPR	NR
9	M	34	INFPR	RS
10	V	46	INFPR	RS
11	M	34	INFPR	RS
12	V	33	INFPR	RS
13	V	41	INFPR	NR
14	M	40	INFPR	NR
15	M	34	INFPR	RV

RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta.

INFPR: Interferón pegilado y ribavirina.

Al igual que con los pacientes pertenecientes al grupo anterior, se consideró para realizar el estudio estadístico como no respondedor tanto a los no respondedores propiamente dichos como a los pacientes que recidivaron. Se relacionó los datos epidemiológicos, edad y sexo, con la respuesta al tratamiento de cada paciente y los resultados obtenidos se reflejan en la tabla nº 41

**Tabla nº 41:** Resultado estadístico de la edad frente a la respuesta del paciente

	Respuesta	Nº	Media	Desviación típica	P
EDAD	RS	7	36.43	6.57	0.43 (n.s)
	RV/NR	8	38.63	3.66	

RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta.

En la tabla nº 42 se reflejan los resultados obtenidos al aplicar el test estadístico chi-cuadrado, para ver si existía significación entre el sexo y la respuesta al tratamiento.

**Tabla n° 42:** Resultado estadístico del sexo frente a la respuesta del paciente

		Repuesta		Significación (p)
		RV/NR	RS	
SEXO	M	4	4	0.78 (n.s)
	V	4	3	

RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta.

Al comienzo del estudio se determinó en cada uno de los 15 pacientes las transaminasas basales, el VHC-Ag basal (tanto de forma cualitativa como cuantitativa), la carga viral basal y se estudió el genotipo de cada uno de ellos, en el paciente n° 7 no fue posible estudiar la carga viral basal por falta de muestra. Los resultados obtenidos en los 15 pacientes quedan reflejados en la tabla n° 43

**Tabla n° 43:** Resultados obtenidos en las muestras basales

N° Paciente	Alt	VHC-Ag		Carga Viral	Gntpo	Respuesta
		pg	p/n			
1	117	744	+	4041100	1a	RS
2	18	36	+	345000	1a	RS
3	114	220	+	3190000	1a	NR
4	312	112	+	1714330	3a	RV
5	43	327	+	2299160	3a	RS
6	24	86	+	5145550	4cd	RS
7	32	71	+	ND	4cd	NR
8	48	327	+	198760	4cd	NR
9	72	189	+	580000	3a	RS
10	42	114	+	820000	3a	RS
11	26	63	+	2911600	3a	RS
12	50	48	+	346380	4cd	RV
13	454	395	+	2419640	1b	NR
14	30	204	+	880000	1b	NR
15	52	99	+	1184720	4	RV

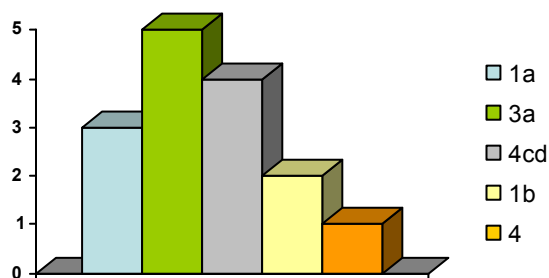
RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta.

N.D: No determinado.

El genotipo mas frecuente fue el 3a (33.3%), seguido del 4cd (26.27%). La frecuencia de los distintos genotipos en este grupo de pacientes queda reflejada en la figura n° 37



**Figura n° 37:** Distribución de la frecuencia de los genotipos.

De igual modo se intento ver si existían diferencias significativas entre el genotipo detectado en cada paciente y su respuesta al tratamiento sin encontrar diferencias significativas. Los resultados están reflejados en la tabla n° 44.

**Tabla n° 44:** Resultado estadístico del genotipo frente a la respuesta del paciente

Genotipo	Respuesta		p
	RV/NR	RS	
1a	1	2	0.19 (n.s)
3a	1	4	
4cd	3	1	
1b	2	-	
4	1	-	

También se valoraron los resultados basales de VHC-Ag, carga viral y ALT de los 15 pacientes frente a la respuesta del tratamiento sin encontrarse diferencias significativas en ninguno de los casos. Los resultados están resumidos en la tabla n° 45.

**Tabla n° 45:** Resultados estadísticos del VHC-Ag, Carga Viral, ALT frente a la respuesta del paciente

	Respuesta	Nº	Media	Desviación típica	P
VHC-Ag	RS	7	222,71	249,87	0.70 (n.s)
	RV/NR	8	184,50	125,54	
Carga Viral	RS	7	2.306.059	1.847.214,44	0,29 (n.s)
	RV/NR*	7	1.419.119	1.096.194,06	
ALT	RS	7	48,86	35,00	0,16 (n.s)
	RV/NR	8	136,50	158,938	

\*En el paciente n° 7 la carga viral basal no pudo ser determinada

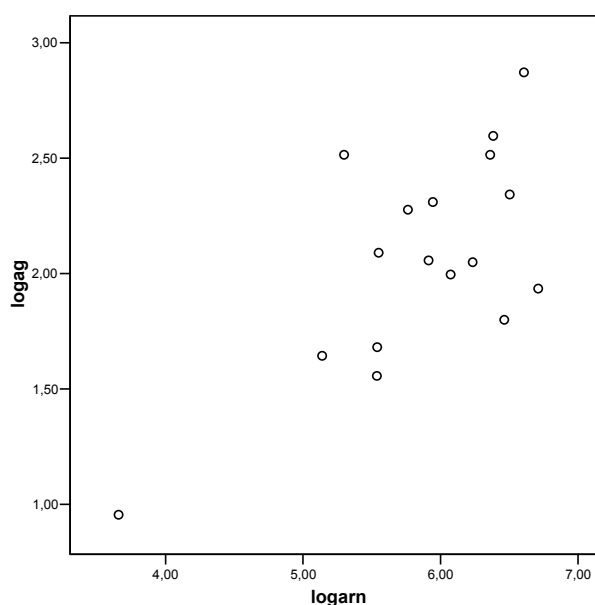
RS: Respuesta sostenida.

RV: Recidiva.

NR: Ausencia de respuesta.

N.D: No determinado.

También se estudió si existía una correlación entre los niveles basales de VHC-Ag y los de VHC-ARN y si se podía cuantificar dicha relación. Se aplicó un análisis de correlación y regresión, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y se obtuvimos una  $r = 0.687$  con una  $p < 0.05$ , es decir en este grupo también existe una buena correlación entre ambas variables. De igual modo calculamos la ecuación de correlación y el resultado fue  $\text{Log VHC-Ag} = - 0,448 + 0,409 \text{ Log VHC-ARN}$ . En este grupo, teniendo en cuenta la ecuación de correlación obtenida, 800.000 UI/ml de VHC-ARN equivaldrían a 92,547 pg/ml. Los resultados de la correlación existente entre ambas variables queda representada en el siguiente gráfico de dispersión. (Figura nº 38).



**Figura nº 38:** Diagrama de dispersión del VHC-Ag/VHC-ARN en el grupo de pacientes con hepatitis crónica tratados con interferón pegilado-rivabirina.

En todos los pacientes se realizó un seguimiento durante el tratamiento y una vez finalizado el mismo y al igual que en los grupos anteriores, para un mejor estudio del seguimiento se dividieron los pacientes en función de su respuesta al tratamiento en tres niveles:

- A. Respuesta Sostenida
- B. Ausencia de respuesta
- C. Recidivas.

**A. Pacientes con respuesta sostenida**

A este grupo pertenecen 7 pacientes que corresponden al 46.67% de los pacientes tratados. En todos los pacientes se realizó un seguimiento cada mes o cada dos meses aproximadamente, durante el tratamiento y una vez finalizado el mismo (cada tres meses). En

todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo. En la tabla n° 46 se expresan los resultados obtenidos durante dicho seguimiento

**Tabla n° 46:** Resultados obtenidos en los pacientes con respuesta sostenida

N° Paciente	Cadencia (meses)	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral	Gntpo	N° Paciente	Cadencia	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral	Gntpo		
			pg	p/n							pg	p/n					
1	0	117	744	+	+	4041100	1a	9	0	72	189	+	+	580000	3a		
	1	90	-	-	+	61960			15 días	ND	123	+	+	355000			
	2	35	-	-	+	1610000			1	ND	-	-	+	11500			
	3	43	-	-	-				2	18	-	-	ND				
	6	ND	-	-	+				3	ND	-	-	+				
	7	171	-	-	-				4	16	-	-	ND				
	8	225	-	-	ND				5	32	-	-	-				
	9	200	-	-	ND				6	34	-	-	ND				
	12	198	-	-	-				7	37	-	-	-				
	13	167	-	-	ND				10	24	-	-	ND				
	15	47	-	-	ND				11	30	-	-	-				
	18	55	-	-	-				13	24	-	-	ND				
	2	0	18	36	+	+			345000	1a	10	0	42	114		+	+
1		ND	-	-	+		1	ND	-			-	-				
2		13	-	-	+		3	20	-			-	-				
4		9	-	-	-		4	15	-			-	ND				
6		11	-	-	PL		5	ND	-			-	ND				
7		19	-	-	ND		6	16	-			-	-				
8		ND	-	-	-		10	26	-			-	ND				
9		ND	-	-	ND		11	20	-			-	-				
10		12	-	-	-		13	21	-			-	ND				
11		7	-	-	ND		18	16	-			-	-				
12		8	-	-	-		19	ND	-			-	-				
13		14	-	-	ND		11	0	26			63	+	+	2911600	3a	
16		6	-	-	-			1	ND			-	-	+			
18	7	3	+	+		2		ND	-	-	-						
19	ND	-	-	ND		3		30	-	-	-						
20	6	-	-	-		4		ND	-	-	-						
5	0	43	327	+	+	2299160		3a	5	ND	-	-	ND				
	1	ND	-	-	+				6	30	-	-	-				
	2	40	-	-	PL				7	12	-	-	-				
	3	32	-	-	ND				8	13	-	-	-				
	5	43	-	-	-				12	26	-	-	ND				
	6	51	-	-	ND				13	23	-	-	ND				
	7	46	-	-	-				16	23	-	-	-				
	10	28	-	-	ND												
	12	41	-	-	-												
	16	24	-	-	ND												

	20	20	-	-	-			18	20	-	-	ND		
6	0	24	86	+	+	5145550	4cd	21	14	-	-	-		
	1	30	-	-	+									
	2	21	-	-	-									
	4	37	-	-	-									
	7	15	-	-	-									
	8	16	-	-	ND									
	11	16	-	-	ND									
	12	19	-	-	-									
	13	28	-	-	ND									
	15	20	-	-	ND									
	18	14	-	-	-									

N.D: No determinado.

Destacamos que solo dos pacientes (28,57%) presentaban una carga viral basal inferior a 800.000 UI/ml siendo sus genotipos 3a y 1a respectivamente. El resto de los pacientes presentaban los genotipos 1a, 3a y 4cd. Respecto al VHC-Ag, cuatro de ellos (57,14%) presentaban valores superiores a 100 pg/ml.

En cuanto los valores iniciales de transaminasas, solo uno de ellos (14,28%) presentaban valores superiores a 100 mU/ml. Durante el tratamiento se normalizaron las cifras de transaminasas en todos los pacientes excepto en el paciente n°1.

El VHC-ARN se negativiza en un paciente al mes de comenzar el tratamiento (14,25%), en dos pacientes (28,5%) a los dos meses de comenzar el tratamiento, en un paciente (14,25%) a los tres meses, en un paciente (14,25%) a los 4 meses y en los otros dos pacientes (28,5%) a los siete meses de comenzar el tratamiento, es decir se consigue la negativización global del ARN a los 7 meses. En cuanto a la negativización del VHC-Ag se puede observar que siempre precede a la negativización del VHC-ARN, ya que en todos los pacientes el VHC-Ag es negativo al mes del comienzo del tratamiento.

### **B. Pacientes con ausencia de respuesta**

A este grupo pertenecen 5 pacientes que corresponden al 33,33% de los pacientes tratados. Al igual que en los pacientes con respuesta sostenida, se realizó un seguimiento cada mes o cada dos meses aproximadamente, durante el tratamiento y una vez finalizado el mismo (cada tres meses). En todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo. En la tabla n° 47 se expresan los resultados obtenidos durante dicho seguimiento.



**Tabla nº 47:** Resultados obtenidos en los pacientes con ausencia de respuesta.

Nº Paciente	Cadencia	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral	Gntpo
			pg	p/n			
3	0	114	220	+	+	3190000	1a
	1	91	213	+	+		
	2	ND	180	+	+		
	4	53	141	+	+		
	7	59	108	+	+		
	10	109	216	+	+		
	16	151	216	+	+		
7	0	32	71	+	+	ND	4cd
	1	ND	3	+	ND		
	2	26	-	-	+		
	4	26	2	+	+		
	7	19	-	-	+		
	8	33	4	+	+		
	9	35	2	+	ND		
	15	42	7	+	ND		
	16	ND	6	+	ND		
	18	37	5	+	+		
	8	0	48	327	+		
1		ND	197	+	ND		
2		47	121	+	+		
4		28	19	+	+		
5		22	30	+	ND		
6		23	35	+	+		
7		32	207	+	+		
9		49	222	+	+		
11		28	174	+	ND		
12		39	174	+	+		
14		32	157	+	ND		
16		45	333	+	+		
13		0	454	395	+	+	2419640
	15 días	ND	53	+	ND		
	1	130	196	+	ND		
	2	ND	143	+	+		
	3	ND	94	+	ND		
	4	58	45	+	ND		
	5	36	58	+	+		
	8	93	158	+	ND		
	10	46	157	+	ND		
	12	ND	333	+	+		

14							
	0	30	204	+	+	880000	1b
	1	35	2	+	ND		
	2	ND	5	+	+		
	3	34	-	-	ND		
	4	36	-	-	+		
	6	50	3	+	ND		
	7	32	-	-	-		
	9	32	-	-	+		

N.D: No determinado.

Destacamos que dos de los pacientes estudiados (nº 8,14) tenían una carga viral de 198.760 y 880.000 UI/ml respectivamente. Los genotipos de estos pacientes eran el 4cd y 1b respectivamente. El resto de pacientes tenía cargas virales muy superiores a 800.000 UI/ml a excepción del paciente nº 7 en el cual no se pudo determinar la carga viral por falta de muestra. Respecto al genotipo, se puede concluir que el 40% tenían genotipo 1b, otro 40% el genotipo 4cd y un 20% de ellos el genotipo 1a.

En cuanto a los valores iniciales de transaminasas, 2 de ellos (40,0%) presentaba valores superiores a 100 mU/ml. Durante el tratamiento se normalizan las cifras de transaminasas en todos los pacientes excepto en el paciente nº 3.

Respecto al VHC-Ag, cuatro de ellos (57,14%) presentaban valores superiores a 100 pg/ml. De los valores de VHC-Ag durante el tratamiento observamos que aunque se produce una disminución de los mismos en algunos momentos, cuando los pacientes finalizan el tratamiento, 3 de ellos obtienen valores de VHC-Ag similares a los basales, siendo la carga viral basal muy elevada en 2 de estos 3 pacientes (3.190.000 UI/ml y 2.419.640 UI/ml). En el paciente nº 7 si se produce un descenso marcado que se mantiene hasta los 18 meses después del comienzo del tratamiento, sin llegar a obtenerse una negativización del VHC-Ag.

En el seguimiento de estos pacientes destacamos que el paciente nº 14 fue considerado como paciente con ausencia de respuesta basándonos en los resultados obtenidos de VHC-ARN, aunque la negativización del VHC-Ag se produjo a los 3 meses del tratamiento volviéndose a detectar con valores muy bajos (3pg/ml) a los 6 meses y negativizándose de nuevo a los 7 meses. En la muestra obtenida en dicho paciente a los 7 meses fue negativo tanto el ARN como el VHC-Ag, y a los 9 meses se volvió a detectar VHC-ARN. En este paciente no se le pudo continuar con el seguimiento porque tuvo que suspender el tratamiento.

### C. Pacientes con recidivas

A este grupo pertenecen 3 pacientes que corresponden al 20% de los pacientes tratados. De igual modo que en los casos anteriores, en todos los pacientes se realizó un seguimiento cada mes o cada dos meses aproximadamente, durante el tratamiento y una vez finalizado el mismo (cada tres meses). En todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo. En la tabla nº 48 se expresan los resultados obtenidos durante dicho seguimiento

**Tabla nº 48:** Resultados obtenidos en los pacientes con recidivas.

Nº Paciente	Cadencia	Alt	VHC-Ag		ARN	Carga Viral	Gntpo
			pg	p/n			
4	0	312	112	+	+	1714330	3a
	3	94	-	-	+		
	4	130	-	-	-		
	6	115	-	-	ND		
	7	123	-	-	-		
	8	191	-	-	ND		
	10	180	-	-	-		
	11	173	-	-	ND		
	12	110	-	-	-		
	13	87	-	-	ND		
	15	577	54	+	ND		
	18	216	39	+	+		
21	105	40	+	+			
12	0	50	48	+	+	346380	4cd
	15 días	26	9	+	+	138000	
	1	32	44	+	+		
	2	ND	38	+	ND		
	3	30	8	+	+		
	4	ND	10	+	ND		
	5	ND	-	-	+		
	6	25	-	-	+		
	7	14	-	-	-		
	9	17	-	-	-		
	10	20	-	-	ND		
	11	11	-	-	-		
	14	12	-	-	ND		
	16	24	33	+	ND		
18	16	9	+	+	4.554		
15	0	52	99	+	+	1184720	4
	1	33	-	-	+		
	2	30	-	-	-		
	4	40	-	-	ND		
	5	38	-	-	-		

	8	48	-	-	ND	
	9	40	-	-	ND	
	12	38	-	-	-	
	14	136	91	+	ND	
	18	42	200	+	+	

N.D: No Determinado

Destacamos que dos de los pacientes (nº 4 y nº 15) tenían una carga viral muy superiores a 800.000 UI/ml y cuyo genotipo era respectivamente el 3a y el 4. En cuanto al VHC-Ag, dos de los tres pacientes presentaban valores cercanos a 100 pg/ml.

Respecto los valores iniciales de transaminasas, solo uno de ellos (14,28%) presentaban valores superiores a 100 mU/ml. Durante el tratamiento la normalización de las cifras de transaminasas se mantuvo en dos de los tres pacientes estudiados.

Durante el seguimiento destacamos que en un paciente el VHC-ARN se negativiza a los 2 meses, en otro a los 4 meses y en el otro a los 7 meses observándose que este último es el que tenía la carga viral basal más baja (346.380 UI/ml) y el VHC-Ag basal también bajo (48 pg/ml), el genotipo que presentaba dicho paciente era el 4cd.

En todos los casos la negativización del VHC-Ag siempre precede a la del VHC-ARN. También se puede observar que la recidiva de ARN se detecta en todos en el control realizado a los 18 meses, sin embargo la detección del VHC-Ag ha sido positiva en estos pacientes en los meses 15, 16 y 14 respectivamente.

---

## 5. Discusión

---

## 5.1 VALIDACIÓN TÉCNICA

El VHC es el agente causal de la hepatitis C cuyo mecanismo fundamental de transmisión es a través de la sangre infectada por VHC o por contacto con material contaminado con esta. En el año 2002 existían más de 170 millones de personas infectadas crónicamente por el VHC, lo que supondría el 3% de la población mundial. Durante el año 2001 el VHC fue responsable de 1.4 millones de muertes, de ellas 796.000 debido a cirrosis y 616.000 a cáncer de hígado (107).

En el año 1987 se clonó el genoma del VHC, lo que permitió el desarrollo de las técnicas de detección de anticuerpos frente al mismo, que ayudaron en la identificación de las personas infectadas con el VHC. La puesta en marcha del primer ensayo de detección de anticuerpos VHC en 1989, redujo drásticamente la transmisión del virus de la hepatitis C por transfusiones sanguíneas pero su sensibilidad no era demasiado elevada y sólo permitía la detección de anticuerpos a los 150 días de la infección. Posteriores ensayos de segunda y tercera generación, que incluían como base antigénica otros antígenos víricos, incrementaron la sensibilidad y redujeron el periodo de ventana a 82 y 66 días respectivamente. Estas técnicas de detección de anticuerpos se diseñaron para la selección de sangre en bancos y el diagnóstico, pero las infecciones que se encuentran en fases iniciales pueden no ser detectadas. Por otra parte, como ya hemos comentado, la detección de anticuerpos no permite distinguir entre personas con infección pasada y aquellas con infección activa, ni permite realizar la monitorización del tratamiento.

Para solucionar estas situaciones, y para reducir el riesgo de infección se propuso incluir la detección de ARN de forma rutinaria en los bancos de sangre, mediante técnicas de biología molecular que permiten demostrar su presencia a los 13 días de la infección. Su utilización no es siempre factible por diversas razones logísticas como su laboriosidad, complejidad, exigencias estrictas en el diseño de instalaciones, relación costo-beneficio, necesidad de personal cualificado, son relativamente caras, etc., condiciones que implican que dicha prueba no sea accesible a todos los laboratorios (108).

Recientemente se desarrollaron métodos que permiten detectar antígeno vírico aplicando un anticuerpo monoclonal de la cápside del VHC, estas técnicas permiten asimismo acortar el periodo ventana siendo muy útiles en el estudio de donantes de sangre. Algunos estudios demuestran que el antígeno puede ser detectado a los 14 días de la infección, es decir, 1 a 2 días tras el ARN (109 y 110). El primer método desarrollado por Takahashi K y cols (111) permitía únicamente detectar el antígeno libre en suero y requería la concentración y fraccionamiento del VHC, presentaba una baja sensibilidad y por ello sus aplicaciones clínicas estaban limitadas. Posteriormente se desarrolló una técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA)

que permitió detectar el antígeno de la cápside libre y formador de inmunocomplejos. Esta técnica permitía la detección del antígeno tanto de forma cualitativa como cuantitativa mediante un pretratamiento del suero y la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen a los seis genotipos del VHC (112).

Esta técnica es más fácil, mas barata, conlleva menos riesgo de contaminación que la PCR, y tiene buena sensibilidad siendo, por tanto útil para el diagnóstico tanto en hepatitis agudas y crónicas, y asimismo algunos autores la consideran una alternativa en la monitorización del tratamiento (113). Se ha documentado que las técnicas de PCR pueden dar resultados falsamente negativos en presencia de heparina, y sin embargo el antígeno no se inhibe cuando hay este anticoagulante (114).

La posibilidad de detectar y cuantificar una proteína estructural e independiente del VHC hace que este ensayo, que puede ser fácilmente incorporado a la rutina del laboratorio, sea una nueva herramienta en el diagnóstico y un marcador directo de la infección viral. Asimismo Zanetti A y cols (115), y Tanaka E y cols (113) ponen de manifiesto que puede ser utilizado en la monitorización del tratamiento, ya que este requiere protocolos con técnicas rápidas y reproducibles, que permitan evaluar con más frecuencia al paciente para poder modificar los regímenes terapéuticos si fuera necesario.

Nuestro primer objetivo ha sido validar la técnica de detección de VHC-Ag, y para ello se seleccionaron 326 sueros pertenecientes a pacientes con sospecha de infección por VHC, de los cuales 251 (77%) fueron positivos para VHC-Ac y 75 (23%) fueron negativos. A todos los sueros se les determinó el VHC-ARN y el VHC-Ag.

En los 75 sueros con ausencia de VHC-Ac no se detectó en ningún caso ni VHC-ARN, ni VHC-Ag. En un trabajo realizado por Icardi G y cols (116) para evaluar la sensibilidad y especificidad del VHC-Ag, en ninguno de los 3134 sueros VHC-Ac negativos, no detectaron VHC-ARN y solamente en tres sueros detectó VHC-Ag, es decir, obtuvo un 0.095% de falsos positivos. En un estudio similar realizado por Gaudy C y cols (117) en 2395 muestras con VHC-Ac negativo, detectaron VHC-Ag en 17 muestras con niveles comprendidos entre 1.5-87.5 pg/ml y en ausencia de VHC-ARN. Al realizar un seguimiento en estos 17 pacientes obtuvieron resultados negativos en todos los pacientes, tanto de VHC-Ag y VHC-ARN, concluyendo por tanto que con la técnica de VHC-Ag se puede obtener resultados falsamente positivos, porcentaje que ese estudio es de 0.71%.

En los 251 sueros positivos para el VHC-Ac se detectó VHC-ARN en 187 (74.5%) y VHC-Ag en 184 (73.3%). Considerando como técnica de referencia la detección de VHC-ARN, la técnica de VHC-Ag, posee una muy buena sensibilidad (97.3%) y especificidad (96.8%). Datos similares obtienen Garcia Bermejo I y cols (118) con una sensibilidad y especificidad del

92,8% y 98,8% respectivamente, y Zanetti A, y cols (115) con una especificidad del 99,5%. Cividini A y cols, (119) realiza un estudio en 9 pacientes con hepatitis aguda en seguimiento, demostrando que el Ag-VHC es un buen marcador de infección reciente, ya que se detecta antes que los anticuerpos, posee una especificidad del 99,9% y una sensibilidad respecto al ARN del 98,6% obteniendo una muy buena correlación con los niveles de ARN. Diversos autores evalúan la sensibilidad de esta técnica en diversos paneles de seroconversión con muy buenos resultados, así Iacardi G y cols (116) demuestra que en muestras procedentes de pacientes que seroconvirtieron a VHC, detecta VHC-ARN en ausencia de VHC-Ac, y en el 95% de ellas detecta VHC-Ag. En un estudio realizado por Tobler LH y cols (120) en paneles de seroconversión demuestra que el comportamiento del VHC-Ag y VHC-ARN es similar en el 54% de los casos, en el 5% la detección del VHC-Ag es más precoz que el VHC-ARN y en el 41% de los casos el VHC-Ag se detecta posteriormente al VHC-ARN en un rango que oscila de 2.1-5.5 días por tanto pone de manifiesto que es una técnica de gran sensibilidad para demostrar infectividad en ausencia de anticuerpos. En un estudio realizado por Nubling CM y cols (121), en 494 muestras de 52 donates de VHC-Ac negativos demuestran que el 81,6% de las muestras se asocia con la presencia de VHC-Ag y VHC-ARN, en 91 muestra detectan VHC-ARN en ausencia de VHC-Ag, de ellas 26 tenían una carga inferior a 300 UI/ml y 65 tuvieron cargas virales 300-10.000 UI/ml. En muestras posteriores de estos pacientes el VHC-Ag se positivizó en intervalos que oscilaron de 2 a 5 días. Asimismo Kurtz JB y cols (122) demuestra que la detección de VHC-Ag es paralela a la del VHC-ARN ya que realiza un estudio en 200 donantes de sangre con anticuerpos positivos y RIBA indeterminado, de ellos 196 eran negativos para VHC-Ag y VHC-ARN y los cuatro restantes positivos para VHC-ARN y para VHC-Ag.

En nuestro estudio, de los 251 sueros positivos para VHC-Ac, 62 fueron negativos para VHC-Ag y para VHC-ARN, 182 fueron positivos para ambos marcadores, lo que indica una concordancia del 97,2%. En 7 sueros se obtuvieron resultados discordantes, en 5 de ellos no se detectó el antígeno y sí el ARN y en 2 por el contrario se detectó el antígeno y no el ARN. Resultados similares aunque ligeramente inferiores obtiene García Bernejo I (118) que estudia 277 sueros con una concordancia del 96,38% entre ambas técnicas, resultando sólo 10 sueros discrepantes; 2 fueron VHC-ARN negativo/VHC-Ag positivo (demostrándose que eran falsos positivos) y 8 fueron VHC-ARN positivo/VHC-Ag negativo. En los estudios realizados por Richter SS y cols (110) obtienen una correlación del 94,5% y Zanetti A (115) del 82,1%, observando que las discrepancias se producen en pacientes con cargas víricas que oscilan entre 1.410 y 48.600 UI/ml.

Algunos autores demuestran que las discrepancias observadas entre la detección de VHC-Ag y el VHC-ARN, se pueden deber a las diferencias de sensibilidad existentes entre los dos ensayos (115), o bien como indica Richter SS, (110) a que las técnicas de amplificación pueden a veces perder sensibilidad en los genotipos 2 y 3.



El valor predictivo positivo (VPP) que hemos obtenido ha sido del 98,9% y el valor predictivo negativo (VPN) del 92,5%. Datos similares obtienen García Bermejo I y cols (118) con un VPP de 98% y un VPN de 95,5%. Estos resultados ponen de manifiesto que esta técnica puede ser utilizada como prueba de screening para la detección de pacientes replicadores, obteniéndose pocos resultados falsamente positivos y negativos.

En los 184 sueros con anticuerpos y antígeno positivos se cuantificó el VHC-Ag independientemente de que se detectara o no el VHC-ARN. En un 10,32% de las muestras se obtuvieron concentraciones de antígeno con valores muy bajos comprendidos entre 1,5-10 pg/ml y en 17,3 % se obtuvieron concentraciones de antígeno superiores a 200 pg/ml. Destacamos que en los en los que no se detectó VHC-ARN, los valores para VHC-Ag fueron de 14,783 pg/ml y 10,056 pg/ml. Estos datos podrían ser interpretados como falsos positivos del antígeno o que esta técnica no se ve interferida por la presencia de heparina en suero que si puede afectar a la detección de ARN (114).

De los 187 que eran positivos para VHC-Ac y para VHC-ARN sólo se pudo determinar la carga viral en 86 de ellos. Se observó que de los 5 sueros negativos para el VHC-Ag, cuatro tenían cargas virales bajas, dos de ellos inferiores a 50.000 UI/ml, otro con 193.000 UI/ml, otro con 103.000 UI/ml y un último suero con una carga viral alta de 1.200.000 UI/ml. Algunos autores demuestran que las discrepancias observadas entre la detección de VHC-Ag y el VHC-ARN, se obtienen en muestras con una baja carga viral (<50.000 IU/ml). (115 y 123) Esta diferencia se puede deber o a la diferencia de sensibilidad existentes entre los dos ensayos o a la diferencia en las cinéticas de aclaramiento de la proteína libre del core y la del virión completo que se asocia al ARN. Resultados similares obtienen García Bermejo I (118) que de 8 muestras con resultados discrepantes 7 pertenecían a un grupo de pacientes con tratamiento y carga viral comprendida entre 10.200-18.500 UI/ml y el otro suero pertenecía a un paciente sin tratamiento con una carga viral de 5.800 UI/ml y un valor de VHC-Ag próximo al punto de corte. Estos resultados ponen de manifiesto que las principales discrepancias de ambos marcadores se encuentran en muestras con carga viral inferior a 20.000 UI/ml, coincidiendo con los resultados obtenidos por Khaja MN y cols (123).

Se estudió si existía relación entre los niveles de antígeno y de ARN y si dicha relación se podía cuantificar. Para este caso se realizó un análisis de correlación y regresión, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. El resultado fue  $r = 0.523$ , ( $p < 0.05$ ), es decir existe una moderada relación lineal entre las variables. Nuestra ecuación de correlación sería:  $\text{Log VHC-Ag} = -1.621 + 0.550 \text{ Log VHC-ARN}$  y al aplicar la misma, 800.000 UI/ml de VHC-ARN equivaldrían a 42.23 pg/ml de VHC-Ag. En el estudio realizado por Bouvier-Alias M y cols, (123) en 392 sueros, obtienen una buena relación entre el VHC-Ag y VHC-ARN, basándose en la aplicación de su ecuación de correlación. Sus resultados demuestran que 800.000 UI/ml de

ARN equivaldrían a 97.31pg/ml de VHC-Ag. Estas diferencias con nuestro estudio se pueden deber a la diferente forma de establecer el valor límite entre ambos y por otra parte a que nosotros cuantificamos entre 1pg/ml y 100pg/ml y ellos utilizan un estándar de 400pg/ml.

De los 187 sueros positivos para VHC-Ac y VHC-ARN se determinó el genotipo en 83 de ellos, siendo el genotipo más frecuente el 1b (37,35%), seguido del 3a con 21,68%, el 1a 19,27% y el 1 con un 10,8%. En un trabajo realizado por Khaja MN y cols (124) se obtuvo asimismo una prevalencia de 44.08% para el genotipo 1b.

Se realizó un estudio estadístico para valorar si los niveles de VHC-ARN o de VHC-Ag, se podían relacionar con un determinado genotipo. Una vez conocidas las medias de VHC-Ag y VHC-ARN para cada genotipo, comparamos los distintos genotipos mediante el test estadístico de ANOVA. Se demostró que no existen diferencias significativas para la media de ARN y/o de antígeno entre los diferentes genotipos. Esos resultados coinciden con los obtenidos por Veillon P y cols(108) y Garcia Bermejo (118) indicándonos que la detección de antígeno es independiente del genotipo que posea el paciente. Igualmente en un estudio realizado por Moreira RC y cols (125) se demuestra que la detección de VHC-Ag es independiente del genotipo que posea el paciente, ya que lo detectan en el 93,4% de los pacientes con genotipo 1, en el 94,8% de los pacientes con genotipo 4 y en el 100% de los pacientes con genotipo 2 o 3.

A la vista de nuestros resultados podemos deducir que la detección y cuantificación del antígeno core del VHC es un marcador directo de infección viral que debido a su fácil realización puede ser incorporado a la rutina del laboratorio como una nueva herramienta en el diagnóstico de la infección por VHC.

## **5.2 PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA SOMETIDOS A HEMODIÁLISIS PERIÓDICA**

La transmisión del VHC es eminentemente parenteral, siendo responsable del 80-90% de las hepatitis postransfusionales; por ello son fundamentalmente los receptores de trasfusiones de sangre, hemofílicos, hemodializados y usuarios a drogas por vía parenteral (UDVP), los individuos con mayor factor de riesgo para infectarse por el mismo (126).

Los primeros estudios realizados entre los pacientes hemodializados permitieron observar una elevada prevalencia de infección por VHC con diferencias muy llamativas entre las diferentes áreas geográficas estudiadas. En Europa oscilan desde el 35% en el área mediterránea al 5% en los países del norte de Europa. Estas diferencias geográficas pueden ser explicadas por la diferente aplicación de medidas de prevención en las unidades de

hemodiálisis, por las condiciones higiénico-ambientales de las unidades de diálisis, o por la propia nefritogenicidad del virus (127).

En los pacientes hemodializados e infectados por VHC, a veces no se detectan anticuerpos debido a la inmunodeficiencia asociada a la uremia crónica, que puede limitar la respuesta inmunológica de estos pacientes. Ello implica que para la detección de pacientes infectados, se deben utilizar marcadores de replicación vírica en pacientes seronegativos sobre todo si presentan alteración de sus niveles de transaminasas (110). El marcador de replicación más utilizado en estos pacientes ha sido la detección de ARN-VHC. Fabrizzi F y cols (128) realizó un estudio en 292 hemodializados, de ellos 125 VHC-Ac negativos, y 167 VHC-Ac positivos. En todas las muestras realizó la determinación de VHC-ARN y de VHC-Ag como marcadores de replicación y demostró que 89 pacientes fueron positivos para VHC-Ag y VHC-ARN, 191 fueron negativos para ambos marcadores y se obtuvieron 12 resultados discordantes (4%). De estos discrepantes, 5 fueron VHC-Ag positivo y VHC-ARN negativo y 7 por el contrario VHC-Ag negativo y VHC-ARN positivo, correspondiendo a pacientes con carga viral baja. Este trabajo pone de manifiesto que el VHC-Ag es una buena técnica, reproducible, fácil, barata y rápida lo cual puede ser una alternativa a la PCR en pacientes hemodializados tanto seropositivos como seronegativos.

Estudiamos 60 pacientes, 35 varones y 25 mujeres con un tiempo medio en diálisis de 35.57 meses (D.S 45,97 meses), y que recibieron una media de transfusiones sanguíneas de 2.54 (D.S 4.70 transfusiones). Los valores medios de transaminasas GOT y GPT fueron de 25.37 (D.S 20.04) y 19.73 (D.S 17.75) respectivamente. En todos ellos se estudió la enfermedad renal causante de la insuficiencia renal crónica, siendo la más frecuente la diabetes mellitus (26.7%), seguida de glomerulonefritis (23.3%) y de hipertensión arterial (21.7%). Se ha documentado que el VHC se asocia a la producción de enfermedad renal mediada inmunológicamente (129). Un alto porcentaje de pacientes infectados por VHC desarrollan una enfermedad renal de causa glomerular, relación que viene avalada por la alta prevalencia de VHC en pacientes con enfermedad crónica renal y la íntima relación que existe entre la presencia de VHC y la crioglobulinemia. (130, 131).

En 10 pacientes se detectaron anticuerpos frente al VHC (16.66%), y 50 resultaron negativos (83.33%). Como ya se mencionó anteriormente, las cifras de prevalencia de infección por VHC en hemodiálisis son muy dispares ya que oscilan entre el 5-50% (132). La media de prevalencia en Europa es del 17%, siendo ligeramente inferior en los países del norte (133). Por tanto nuestros datos son similares a la media europea.

Esta elevada prevalencia en las unidades de diálisis se debe a que este tratamiento ocasiona un riesgo importante de exposición a este virus. Para algunos autores son las

transfusiones de sangre el factor de riesgo más importante en la transmisión de esta infección (134). Sin embargo en el momento actual como consecuencia de la administración de eritropoyetina y la identificación de los donantes de sangre VHC, las transfusiones han dejado de ser un factor de transmisión importante. Ello no evita que debido al periodo ventana relativamente amplio de aparición de anticuerpos, puedan ser las transfusiones las responsables de algún caso aislado de seroconversión (127). Todo ello permite pensar que existan otros factores epidemiológicos relacionados con la duración del tratamiento e implicados en la transmisión del VHC. Algunos autores han notificado prevalencias de VHC superiores al 39% en pacientes que nunca han sido transfundidos, por lo cual asocian el tiempo en diálisis como un factor de mayor riesgo de padecer la infección (135). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sandhu J y cols (136), que indican que no existe una relación de la presencia de anticuerpos con las transfusiones recibidas en diálisis y si con el tiempo en diálisis y el incremento de las ALT durante seis meses.

Existen trabajos que indican que esta elevada prevalencia de VHC podría deberse a una transmisión paciente a paciente a través de la maquina de diálisis. El VHC no puede penetrar en la membrana del dializador ya que es 10 veces más grande que el tamaño del poro de la membrana, pero durante la propia diálisis puede suceder la ruptura de la membrana y por tanto el paso del virus (137). En cualquier caso la posibilidad del que el virus atraviese el dializador es controvertida, aunque existe alguna evidencia de transmisión en maquinas con circuito cerrado de diálisis. En las maquinas con circuito abierto esta posibilidad disminuye y además los filtros, dializadores, etc se pueden desinfectar eficazmente y por tanto no se podría transmitir la infección por este mecanismo (138). En cualquier caso, para prevenir la infección y desde 1993 se recomienda aislar a los pacientes VHC positivos (127), de esta forma se elimina la transmisión horizontal paciente-paciente, pero no se puede erradicar la transmisión horizontal por otros vectores como contaminación de instrumental, superficie contaminada con sangre contagiada e incluso por el uso de viales multiuso que mal utilizados podrían ser una fuente de infección, por ejemplo en la administración de heparina a estos pacientes(138), por lo que la guías de diálisis (139) aconsejan dedicar personal con dedicación única a estos pacientes durante el tratamiento.

En nuestro trabajo al realizar el estudio estadístico de la presencia de anticuerpos frente al VHC con edad, sexo, antecedentes de transfusiones, valores de transaminasas, tiempo en diálisis y enfermedad renal, se demuestra que no existen diferencias significativas entre los pacientes VHC-Ac positivos y VHC-Ac negativos. En cuanto a la edad existen indicios de diferencia significativa ( $p=0.066$ ), aunque con los datos actuales no puede asegurarse, para demostrarlo habría que aumentar el tamaño de muestra. En nuestra unidad existe aislamiento de los pacientes VHC-Ac positivo en maquinas especialmente dedicadas a ellos y con personal con dedicación exclusiva, y aunque se dializan dentro de la misma sala, el hecho de haber intensificado las medidas universales de prevención y la administración de eritropoyetina (con

la disminución del número de transfusiones) no se ha producido ninguna seroconversión en los últimos 12 años.

En los pacientes VHC-Ac positivos, se realizó la confirmación de los mismos mediante Inmunoblot recombinante (Inno-Lia) confirmándose la infección en el 70% de los pacientes, en el 20% se obtuvo un resultado indeterminado con detección de anticuerpos de forma aislada frente al péptido NS3, (pacientes 3 y 6) y 1 paciente resultó negativo. En los dos pacientes con resultados indeterminados al realizar las técnicas de replicación vírica observamos que en uno de ellos se detecta el VHC-Ag y el VHC-ARN, por tanto el resultado indeterminado puede deberse a la inmunosupresión de estos pacientes que condiciona una mala respuesta inmunitaria específica. Sin embargo en los otros dos pacientes con resultados no concluyentes en la detección de anticuerpos, no se detectó ni VHC-Ag ni VHC-ARN, podrían a priori ser interpretados como falsos positivos de VHC. En un estudio realizado por Valcavi P y cols (140) demuestran que la presencia de VHC-Ag y VHC-ARN no se ve influenciada por el patrón del inmunoblot recombinante, pues observaron la existencia de pacientes con VHC-ARN positivo, VHC-ARN negativo, VHC-Ag positivo y VHC-Ag negativo tanto con 4, 3, 2 péptidos.

Como marcadores de replicación vírica se estudió la presencia de anticuerpos IgM frente al VHC, el VHC-ARN y el VHC-Ag. La detección de IgM frente a diversos péptidos del VHC se propuso como marcador de infección aguda, y su persistencia como marcador de progresión a la cronicidad. Se demostró que la mejor base antigénica para detectar anticuerpos de tipo IgM era la región core, ya que otras como c-100-3 se podían ver influenciadas por la variabilidad del VHC (141). Este marcador en hepatitis crónica se asocia con niveles alterados de transaminasas y su desaparición con una buena respuesta en pacientes sometidos a tratamiento. Por el contrario, su reaparición se asocia por algunos autores a exacerbaciones de la enfermedad (142). Al analizar el VHC-IgM hemos obtenido un resultado positivo en 5 pacientes (50%), y su presencia ha estado siempre ligada con un resultado positivo en el test confirmatorio de anticuerpos. En el estudio realizado por Ritcher S S y cols (110), se observa que los anticuerpos de tipo IgM se detecta entre 50-93% de la hepatitis agudas y en el 50-70% de hepatitis crónicas, lo que pone de manifiesto que es una técnica con baja sensibilidad para detectar replicación vírica. Nuestros resultados son similares a lo que reflejan los diferentes trabajos, así en un estudio realizado por Papatheodoridis GV y cols (143) para investigar la relación existente entre VHC-IgM, datos epidemiológicos, bioquímicos y virológicos demuestra que de 112 pacientes con hepatitis crónica, con transaminasas elevadas y presencia de ARN-VHC, sólo se demuestra la presencia de IgM en 62 pacientes es decir en el 70% de los casos y observa que en los pacientes con IgM positiva, las transaminasas están más altas, y que este anticuerpo es más frecuente en mujeres y en pacientes con genotipo 1b. En nuestro caso sin embargo la presencia de IgM no se asocia ni con las cifras de transaminasas ni con el sexo femenino ya que de los tres mujeres positivas ninguna presentaban IgM. En nuestro estudio el 60% de los pacientes con IgM positiva poseen el genotipo 1b.

El VHC-ARN que en principio es la técnica de referencia para detectar viremia, se detectó en 7 pacientes (70%), la correlación entre la presencia de anticuerpos y la detección de ARN oscilan del 54-92%, y en unidades de hemodiálisis, estos datos oscilan desde 38,5% (144) hasta 94% (133), resultados que se pueden ver influenciados por la técnica utilizada para la detección de VHC-ARN. Su detección indicaría replicación vírica, y por tanto infectividad, lo cual justificaría el aislamiento de estos pacientes y la aplicación de las medidas internacionales de prevención de infecciones por virus hemáticos. No hemos encontrado ninguna asociación entre la presencia de ARN y las cifras de transaminasas ya que de los 7 pacientes ARN positivo, en 6 de ellos se encontraban las transaminasas elevadas, pero en los 3 pacientes no virémicos las transaminasas fueron elevadas, datos que concuerdan con los obtenidos por otros autores (145) El VHC-Ag lo detectamos en 6 pacientes, con un rango de detección al cuantificarlo en este grupo entre 9 y 187 pg/ml y una media de 94.5 pg/ml. Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos con el VHC-ARN, ya existe un paciente que sería replicativo al detectar VHC-ARN y en el que por el contrario no se detectó VHC-Ag.

Al enfrentar las tres técnicas que detectan replicación vírica y tomando como técnicas de referencia el VHC-ARN observamos que la IgM presenta una baja sensibilidad (71,4%), esto se puede explicar porque la IgM aparece en hepatitis aguda y fases tempranas de hepatitis crónica pero sus títulos decrecen con el tiempo, por tanto no es un buen marcador para diferenciar pacientes virémicos y no virémicos (146). Por otro lado la presencia de IgM podría verse influenciada por las mutaciones víricas que pueden afectar a su síntesis, lo cual nos indica que no es un buen marcador para detectar replicación vírica (143). Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Quiroga JA y cols (146) que detecta la IgM en el 51% de hepatitis crónica y el 64% de hepatitis aguda. Por el contrario Brillante S y cols (147) lo detecta en el 82,5 de pacientes con hepatitis crónica y en ningún paciente asintomático de los cuales en el 80% detecta VHC-ARN. Nuestros resultados son ligeramente inferiores y se podrían explicar con la inmunosupresión de estos pacientes que afectaría a la respuesta inmune.

En cuanto al VHC-Ag presenta una sensibilidad del 85%, datos que coinciden con el trabajo realizado por Bouzgarrou N y cols (148) en una unidad de hemodiálisis de Túnez que obtiene una sensibilidad del 84%. Estos resultados a priori indican que la detección de VHC-Ag en los pacientes hemodializados no se ve influenciada por la inmunosupresión.

En los pacientes virémicos, se determinó el genotipo del VHC, siendo el genotipo más prevalente el 1b (57.14%), seguido del 1a (28.57%) y uno de ellos fue genotipo 4c (14.28%). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Khaja MN y cols (149), que de 45 pacientes hemodializados con VHC-ARN el 43.4% poseían el genotipo 1b. En un brote producido en una unidad de hemodiálisis, el genotipo que se detectó en los pacientes infectados fue el 4d, y sin embargo el más prevalente en la unidad antes del brote era el 1b

(150). Nosotros estudiamos si existía alguna diferencia en la distribución de genotipos en pacientes con VHC-Ag positivos y con VHC-Ag negativos, no encontrándose diferencia significativa.

En el estudio retrospectivo y prospectivo, se diferenciaron tres grupos. En el primero de ellos se englobaron a cinco de los siete pacientes virémicos. Debido a la inmunodepresión se puede observar que el inmunoblot recombinante a veces resulta indeterminado, sin que se modifiquen los parámetros de replicación vírica, VHC-ARN y VHC-Ag. Los anticuerpos de tipo IgM son los que muestran un comportamiento menos homogéneo pues en dos pacientes fueron siempre positivos, en uno nunca se demostró su presencia, y en los otros dos apareció en alguna muestra aislada. Este comportamiento se puede justificar por la inmunosupresión de estos pacientes, o por el propio comportamiento de la IgM como ya hemos comentado. Al valorar la presencia de IgM con los niveles de antígeno, observamos que no existe relación entre el nivel del Ag y la presencia de IgM ya que ésta se detecta a veces con concentraciones de 50 pg/ml y por el contrario es indetectable en muestras con concentraciones altas incluso superiores a 350 pg/ml. Este comportamiento ratifica la teoría de que la presencia de IgM no es un buen marcador de replicación vírica. En todas las muestras se detectó VHC-Ag aunque con variaciones en su concentración entre 10 pg/ml y 378 pg/ml durante el seguimiento. Sin embargo el VHC-ARN no se detectó en todas las muestras estudiadas. Estas discrepancias podrían explicarse por las diferencias de sensibilidad entre los dos ensayos que en este caso podrían explicarse por cinética deferente de estas dos moléculas o como indica Barrera JM y cols (151), podrían deberse a los cambios en la replicación vírica que acontecen en la infección por el virus de la hepatitis C que se corresponden con negativizaciones temporales del VHC-ARN sérico.

En los tres pacientes no virémicos el comportamiento es diferente. Uno de ellos fue siempre indeterminado en el inmunoblot recombinante y nunca se detectó ningún marcador que se asocie a replicación, podría por tanto corresponder a una infección persistente sin replicación, ya que una vez resuelta la enfermedad sólo persiste el recuerdo serológico (13). En otro el comportamiento ha sido similar con la diferencia de que el resultado con inmunoblot recombinante ha sido siempre positivo y los marcadores de replicación vírica fueron siempre negativos, excepto en una muestra en la que se detectó ARN. Estos resultados serían compatibles con un pico de replicación vírica sin detección de VHC-Ag o con un resultado de ARN falsamente positivo. El tercer paciente de este grupo puede ser considerado un falso positivo para VHC ya que nunca fue confirmado por inmunoblot recombinante ni presentó ningún marcador de replicación vírica. Estos resultados apoyan las directrices que aconsejan confirmar los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos independientemente de los factores de riesgo de infección del paciente (110).

En el caso de los pacientes con resultados discordantes de VHC-ARN y VHC-Ag destacamos que la IgM y el VHC-ARN fueron siempre positivos y ambos tenían un genotipo 1b. Esto apoya la teoría de que la presencia de IgM se asocia al genotipo 1b (143). En uno de ellos se detectó el VHC-Ag aunque valores inferiores a 40 pg/ml, en las muestras iniciales y posteriormente se negativizó. En el otro en ninguna muestra se detectó el VHC-Ag. Estos resultados hablan de una baja sensibilidad del VHC-Ag en estos pacientes, se procedió a realizar el estudio de carga vírica de los mismos demostrándose que ésta era baja, con valores inferiores a 15.000 UI/ml. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Laperche S y cols (112) que en el estudio de un panel de seroconversión, obtienen una muestra discordante cuya carga viral era de 1.800 UI/ml, en una muestra obtenida 5 días más tarde la carga viral era de  $2 \times 10^6$  copias/ml y el VHC-Ag tenía una concentración de 260 pg/ml.

Existen diversos estudios que indican que los pacientes hemodializados pueden mostrar ARN del VHC en ausencia de anticuerpos (152), este hecho adquiere una gran importancia porque indicaría que estos pacientes pueden ser un mecanismo de transmisión por su sangre. Estos hechos podrían ser explicados por la utilización de técnicas de enzoinmunoensayo de baja sensibilidad que no detectan los anticuerpos existentes a títulos bajos en estos pacientes por causa de la inmunosupresión. Este problema se ha resuelto con la utilización de técnicas de tercera generación que utilizan en su base antigénica las proteínas E1 y E2 que tienen una gran capacidad inmunógena, existen trabajos que demuestran que con las técnicas de tercera generación, el porcentaje de pacientes virémicos seronegativos disminuye de forma importante (153). Nosotros no hemos detectado ni VHC-ARN ni VHC-Ag en los 50 pacientes VHC-Ac negativos, estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en pacientes hemodializados (154). Para confirmar estos resultados se realizó un seguimiento sólo en 32 pacientes, ya que 10 fallecieron, 3 cambiaron de domicilio y 5 fueron transplantados, confirmándose la ausencia de VHC-Ac, VHC-ARN y VHC-Ag en todas las muestras. Recientemente la guía sobre enfermedades víricas en hemodiálisis (139), aconsejan realizar la detección de VHC-ARN en los pacientes hemodializados seronegativos y con elevación de transaminasas para determinar su infectividad. En el trabajo realizado por Laperche S y cols (112) demuestra que en 58 pacientes negativos para VHC-Ac, 58 fueron positivos para el VHC-ARN, y 57 fueron positivos para el VHC-Ag, es decir existe una correlación de ambas técnicas casi del 100%, lo que indica que en estas situaciones podría ser utilizado el VHC-Ag, ya que es más fácil de realizar y estaría al alcance de los laboratorios de diagnóstico microbiológico. Existen estudios que ponen de manifiesto la presencia de seroconversiones en unidad en hemodiálisis en pacientes sometidos a seguimiento serológico, y en dichas seroconversiones el comportamiento del VHC-Ag y del VHC-ARN es semejante, y su presencia en el suero siempre precede a la aparición de anticuerpo hasta en cuatro semanas (155, 156, 157). Esto demuestra que esta técnica se puede utilizar en la rutina para detectar primoinfecciones en VHC.



### 5.3 PACIENTES COINFECTADOS POR VIH Y VHC.

La presencia de coinfección por VHC y VIH es frecuente y afecta a más de una tercera parte de los infectados por VIH. En estos pacientes se detecta niveles más altos de VHC y al estar inmunodeprimidos la hepatitis crónica puede progresar con mayor rapidez a cirrosis, aumentando la mortalidad (158) También se ha documentado que la coinfección complica el tratamiento de la infección y el curso de la misma (159).

La alta prevalencia de la coinfección VIH y VHC se atribuye a que comparten factores de riesgo, siendo el más importante la adicción a drogas por vía parenteral. Aproximadamente el 80-90% de los usuarios a drogas por vía parenteral están infectados por VHC y de ellos del 15-30% están infectados por VIH (160). La incidencia de VIH en UDVP, ha disminuido pero sin embargo la infección por VHC es endémica en estas poblaciones. (161)

La coinfección por VIH puede oscilar del 15-80% dependiendo del área geográfica estudiada. En España hay pocos estudios realizados sobre prevalencias de infección por VHC, en pacientes infectados por VIH. Recientemente Rubio M y cols (162) en un trabajo realizado en 767 pacientes infectados por VIH, detectan anticuerpos de VHC en 546 (71,78%) siendo el 91,39% usuarios a drogas por vía parenteral. En 221 paciente no detectan anticuerpos para VHC y de ellos 211 se habían contagiado de VIH por vía sexual lo que evidencia la menos transmisión de VHC por esta vía. Otros trabajos indican que aproximadamente dos tercios de los pacientes infectados por VIH han estado expuestos al VHC. Esta elevada prevalencia de exposición indica la necesidad de su investigación habitual en los pacientes infectados por VIH como recomiendan las guías específicas (163).

De los 51 pacientes coinfectados estudiados, 39 fueron varones y 12 fueron mujeres; la edad media fue de 39,31 (D.S 6,73) años. El VHC tiene una muy baja transmisión por vía sexual y materno-fetal, sin embargo en las mujeres la coinfección VHC/VIH adquiere una mayor importancia, ya que puede facilitar la transmisión de ambos virus por vía perinatal, esto puede ser atribuido a la mayor carga viral de VHC en los pacientes coinfectados con VIH (164).

La media de ALT fue de 73,72 mU/ml y solamente 12 pacientes presentaban cifras inferiores a 32 mU/ml, datos similares a los aportados por Rubio M (162).

El VHC-ARN se detectó en 42 pacientes (82,46%), y fue negativo en 9 pacientes (17,6%), datos similares a los obtenidos por Rubio M y cols (162) que detectan el VHC-ARN en el 89,83% de los pacientes. En los pacientes VHC-ARN positivos, se obtienen cifras de ALT más elevadas que en los que no se detecta el VHC-ARN con diferencias significativas ( $p=0.037$ ); estos datos son similares a los obtenidos por Gonzalez- Garcia y cols (165) en cuyo

trabajo los pacientes VHC-ARN negativo presentaban ALT normales considerando que habían aclarado espontáneamente el virus.

En los pacientes en los que se detectó VHC-ARN, se procedió a estudiar el genotipo, siendo el más frecuente el 1 con el 72.4% y el subtipo más frecuente el 1a (40.4%) seguido de 1b y 3a. Datos semejantes obtiene Backus I y cols (159) en un estudio realizado en Estados Unidos que detecta el genotipo 1 en el 86%, el 2 en el 6.8%, el 3 en el 5.8%, y el 4 en el 0.8%. En otros estudios realizados por Gonzalez y cols Garcia(165 )) el genotipo más frecuente sigue siendo el 1 pero con cifras ligeramente inferiores, 54%. En el estudio realizado por Rubio M y cols (162) observan un cambio en la distribución de genotipos dependiendo de la antigüedad del contagio con un incremento del genotipo 1 una disminución del genotipo 3 y un aumento del genotipo 4.

El VHC-Ag fue positivo en 38 pacientes (74,5%) con un valor medio de 88.18 pg/ml y no se detectó en 13 pacientes (25,5%). De los 4 pacientes con resultados discordantes (VHC-ARN positivo/VHC-Ag negativo) tres presentan cifras de transaminasas inferiores a 32 mU/ml, y solamente uno de ellos presentaba valores de transaminasas de 426 mU/ml. La sensibilidad del VHC-Ag fue del 92% comparándola con el VHC-ARN. De estos cuatro pacientes con resultados discordantes, el genotipo solo se pudo realizar en dos, que se identificaron como 1b y 1.

No se encontraron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de VHC-Ag y los valores de ALT. Nuestros resultados indican que no existen diferencias entre pacientes replicadores y no replicadores (VHC-ARN y VHC-Ag) con respecto al sexo, aunque dado el valor tan bajo de significación en ambos casos ( $p=0.067$ ), habría que aumentar el tamaño de muestra.

Para ver si existían diferencias significativas entre el genotipo y el VHC-Ag se estudió la media de la concentración de antígeno en pg/ml en función del genotipo y se le aplicó el test estadístico t-Student sin encontrarse diferencias significativas entre los mismos. Aunque si observamos que en el total de pacientes con genotipo 1 la media de VHC-Ag es de 112.40 pg/ml frente a 45.5 pg/ml de los que presentan el genotipo 3a y 65 pg/ml del genotipo 4cd. Estas diferencias no son significativas debido a la gran desviación típica y no las podemos comparar a los de otros autores por no existir ningún trabajo que utilice VHC-Ag para medir la replicación en coinfectados por VIH.

#### **5.4 PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA EN TRATAMIENTO CON INTERFERÓN O INTERFERÓN MÁS RIBAVIRINA.**

La hepatitis C, crónica en un elevado porcentaje de casos siendo una de las principales causas de trasplante hepático. El objetivo ideal del tratamiento antiviral es suprimir la replicación vírica, inicialmente las distintas estrategias para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C se basaron en la administración de interferón y posteriormente en la administración de interferón con ribavirina. El tratamiento con interferón se vió dificultado por los efectos adversos del interferón que con frecuencia ocasionaban la interrupción del mismo y por la dificultad de las pautas terapéuticas que dificultaban el cumplimiento del mismo. Con la utilización de la terapia combinada se consiguió incrementar los índices de respuesta sostenida al doble de los obtenidos con terapia única con interferón (166).

De estos 14 pacientes diagnosticados de hepatitis crónica por VHC, 5 se sometieron a tratamiento con interferón y 9 a interferón con ribavirina. La respuesta al tratamiento se definió como la negativización del ARN-VHC 6 meses después de suspender la terapia. Se definió como no respondedor la presencia de ARN durante la terapia y al finalizar la misma, y respuesta con recidivas a la desaparición temporal del ARN durante el tratamiento pero volviendo a positivizarse seis meses después de suspender la terapia. De todos los pacientes estudiados y siguiendo estos criterios, 5 fueron clasificados como respondedores, 5 como no respondedores y 4 presentaron recidivas.

Clásicamente la definición de respuesta se efectuaba de acuerdo a las cifras de transaminasas, en la actualidad es más fiable valorar la respuesta según la presencia de VHC-ARN en suero sobre todo desde que se emplea la terapia combinada con ribavirina, ya que ésta puede normalizar las cifras de transaminasas sin modificar la viremia. En nuestra serie no se han obtenido diferencias significativas entre los cifras de ALT basales y ser respondedor (media 134,8) y no respondedor (media 132,4). Olaso V y cols (167) indica que el 73% de los pacientes con valores de ALT inferiores a 26 mU/ml, muestran respuesta sostenida, mientras que el 87,6% de aquellos con valores de ALT superiores a 26 mU/ml no respondieron al tratamiento. En nuestro estudio todos los pacientes tenían cifras de ALT superiores a 26 mU/ml, por lo que no se ha podido estudiar esta relación.

En la actualidad la determinación del VHC-ARN es el indicador más eficaz de respuesta terapéutica, existiendo algunos factores que pueden ayudar a la predicción de dicha respuesta tanto en sentido positivo como negativo (edad, sexo, carga viral y genotipo) (94). Nosotros hemos valorado la utilidad del VHC-Ag como indicador de respuesta terapéutica, y su posible asociación con los factores predictivos de respuesta al tratamiento.

Respecto al sexo y edad, 5 eran mujeres y 9 varones, con una edad media de 37.30 (D.S 5.15) años. Está descrito que responden mejor al tratamiento las mujeres que los hombres, y aquellos pacientes con edad inferior a 40 años frente a los de edad superior a 40 años (166). En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre ser respondedor y el sexo, aunque el porcentaje de mujeres que han respondido (40%) ha sido mayor que el de los hombres (33%). Sin embargo respecto a la edad de los 8 pacientes con edades inferiores a 40 años solo respondieron dos de ellos (25%).

Se acepta que los pacientes con cargas virales basales bajas (< 800.000 UI/ml) responden mejor al tratamiento (168, 169). Nosotros no observamos diferencias significativas entre ser respondedor y la carga viral, al igual que ocurre en el estudio realizado por Olaso V y cols (170), y destacamos que de los 2 pacientes con carga superior a 800.000 UI/ml responde uno.

Está descrito que responden mejor los pacientes con genotipo 2 o 3 (171), en nuestro caso solamente tenemos tres pacientes con genotipo 3a y solo responde 1 (33%). El poseer el genotipo 1 es un factor negativo de respuesta al tratamiento, en nuestro caso de 10 pacientes que lo poseen respondieron 4 (40%). No se encontraron diferencias significativas entre el genotipo y la respuesta al tratamiento.

Respecto al VHC-Ag, se detectó en todos los pacientes independientemente del genotipo infectante, este hecho ya ha sido documentado por otros autores Veillon P y cols (108). Los valores medios de VHC-Ag en los pacientes respondedores fue 98,4 pg/ml y en los no respondedores fue superior 138,7 pg/ml pero no se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,591$ ), es decir la concentración de VHC-Ag en la muestra basal no está relacionada con la respuesta al tratamiento, al igual que sucedía con la carga viral.

Basándonos en la ecuación de correlación obtenida para este grupo, 800.000 UI/ml de VHC-ARN corresponderían a 166 pg/ml de VHC-Ag. Teniendo en cuenta que según Calleja JL y cols (166) una carga viral basal superior a 800.000UI/ml sería un valor predictivo negativo de respuesta al tratamiento, podríamos aceptar como valor predictivo negativo el poseer más de 166 pg/ml en la muestra basal. En nuestro caso de los 3 pacientes que poseen más de 166 pg/ml, dos son no respondedores (66,66%) y en uno se produjo una recidiva, no obstante en tres pacientes no respondedores la concentración basal de VHC-Ag fue inferior a 110 pg/ml. Aunque el número de casos estudiados es pequeño podríamos decir que valores de VHC-Ag superiores a 166 pg/ml, podría implicar una mala respuesta al tratamiento. Hay que resaltar que con concentraciones bajas de VHC-Ag también se pueden producir una ausencia de respuesta al tratamiento, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre la respuesta al tratamiento y los valores basales de VHC-Ag al igual ocurre con la carga vírica. Estos resultados son similares a los obtenidos por Olaso V y cols (167) que indica que las

características basales de los pacientes antes de iniciar el tratamiento no predicen siempre la adecuada respuesta al mismo.

En los pacientes tratados uno de los objetivos propuestos, fue evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del VHC-Ag respecto al ARN durante la monitorización del tratamiento. En todas las muestras se estudiaron las transaminasas, el VHC-Ag tanto cualitativamente como cuantitativamente y el ARN-VHC cualitativo

De los 5 pacientes con respuesta sostenida, 3 fueron tratados con interferón y ribavirina durante 12 meses, uno con interferón durante 12 meses y el otro con interferón durante 6 meses. En todos se realizó un seguimiento aproximadamente cada 4 meses y una vez finalizado el mismo a los 7 u 8 meses.

Destacamos que cuatro pacientes (80%) presentaban una carga viral basal inferior a 800.000 UI/ml, que de acuerdo a los criterios aceptados es un buen factor predictivo de respuesta al tratamiento (166). Tres de los cinco pacientes (60%) tenían genotipo 1b, otro el genotipo 1 (20%) y solamente uno (20%) posee el genotipo 3a que es buen predictor de respuesta al tratamiento. Respecto al VHC-Ag, todos presentaban valores inferiores a 166 pg/ml, que como hemos comentado sería un buen factor de predicción al tratamiento. Veillon P y cols (108) documentan que los pacientes con VHC-Ag y carga vírica baja son los que mejor responden al tratamiento. En cuanto los valores iniciales de transaminasas, todos ellos presentaban a valores superiores superiores a 26 mU/ml y de ellos tres (60%) 100 mU/ml.

Durante el tratamiento se produjo la normalización de las cifras de transaminasas en todos los pacientes, con caídas importantes a los tres meses de iniciarse el mismo, esto nos sugiere que la normalización de las ALT al inicio del tratamiento se podría utilizar como predictor de respuesta, como sugieren otros autores (167). En tres pacientes (60%), la negativización del VHC-ARN y el VHC-Ag se produce a los tres meses; en los dos pacientes restantes la negativización del VHC-Ag precede a la del VHC-ARN, por tanto ambos parámetros son buenos predictores de respuesta al tratamiento, como indican Calleja JL y cols y Venero y cols (167, 172). En el estudio realizado por Bouvier-Alias M y cols (123) en pacientes con hepatitis crónica y sometidos a tratamiento, concluyen que el VHC-Ag presenta una buena cinética de aclaración siendo un buen marcador de valor predictivo de respuesta virológica.

De los 4 pacientes que recidivaron durante el tratamiento, tres fueron tratados con interferón y ribavirina, dos de ellos durante 12 meses, y uno durante 6 meses. El otro paciente fue tratado con interferón durante 6 meses.

Destacamos que los cuatro pacientes 100% tenían una carga viral basal inferior a 800.000 UI/ml y todos presentaban valores de VHC-Ag inferiores a 166 pg/ml. parámetros que a priori son unos factores predictivos positivos de buena evolución (173, 174, 175). Dos de ellos 50% tenían genotipo 1b y dos 50% genotipo 3a por tanto en estos pacientes no hemos encontrado diferencias entre el genotipo 3a (factor predictivo positivo) y el genotipo 1 (factor predictivo negativo). Respecto los valores iniciales de transaminasas, solamente uno de ellos 25% presentaban valores superiores a 100 mU/ml.

Durante el tratamiento destaca que en estos pacientes existe un paralelismo en la normalización de las cifras de transaminasas, la negativización del VHC-Ag y del VHC-ARN. La recidiva se produce en todos los casos una vez finalizado el tratamiento y se puede manifiesta por la detección simultanea de VHC-ARN y el VHC-Ag y elevación de las cifras de transaminasas que alcanzan valores superiores a los iniciales. En el paciente 4 la detección de VHC-Ag precede a la del VHC-ARN, es decir en este caso el VHC-Ag posee una mayor sensibilidad. Este dato no concuerda con los obtenidos por Castro A y cols (176) que indica que el VHC-Ag puede mostrar falsos negativos en valores de viremia muy bajos, por lo que puede perder utilidad en la monitorización y toma de decisiones sobre interrumpir o mantener la terapia antivírica.

Cinco pacientes, que representan un 35.71% del total, no respondieron al tratamiento, tres fueron tratados con interferón y ribavirina durante 12 meses y dos con interferón durante 12 meses.

En los cuatro pacientes que se determino el genotipo tres de ellos eran 1b y el otro 1a, dato que podría predecir una mala respuesta al tratamiento. Respecto los valores iniciales de transaminasas, tres de ellos (60%) presentaban valores superiores a 100 mU/ml y dos de ellos de 97 mU/ml.

Destacamos que en tres pacientes la carga viral basal era inferior a 800.000 UI/ml, y solamente uno presentaba una carga viral de 1.203.000 UI/ml. Respecto al VHC-Ag, 2 de ellos (20%) presentaban valores superiores a 166 pg/ml. Destacamos que uno de los pacientes posee concentraciones bajas de carga viral y VHC-Ag, datos que en principio podría favorecer la respuesta al tratamiento pero posee el genotipo 1b y fue tratado sólo con interferón.

Durante el tratamiento, a los tres meses se produjo una disminución en las cifras de transaminasas lo que podría predecir una buena respuesta. Esta disminución podría deberse al efecto inmunomodulador de la propia acción de la ribavirina (170) y no estaría relacionada con la disminución de la replicación vírica. En ningún paciente se negativizó el VHC-ARN ni el VHC-Ag aunque se observa una disminución de los niveles de antígeno a los tres meses de

comenzar el tratamiento y una posterior elevación del mismo antes de finalizar el tratamiento, hecho que ha sido documentado también por Veillon P y cols (108). Sólo en una muestra puntual del paciente nº 9 en el se produce la negativización del VHC-Ag en presencia de VHC-ARN. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Venero P y cols (172) y nos indican que su presencia mantenida a los tres o cuatro meses del comienzo del tratamiento nos predice una falta de respuesta como documenta también Seme K y cols (177).

## **5.5 PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA EN TRATAMIENTO CON INTERFERÓN PEGILADO Y RIBAVIRINA.**

Como ya se ha comentado previamente, el tratamiento de la hepatitis crónica con interferón y ribavirina se ha visto dificultado por los efectos adversos y por la complejidad de la pauta terapéutica. La comercialización del interferón pegilado ha producido avances en al terapia de esta enfermedad, como es la posibilidad de tratar a pacientes que no respondieron al interferón y la mayor adherencia del tratamiento, al ser su administración más fácil (una sola inyección semanal). Este tratamiento ha mostrado una eficacia superior al tratamiento estándar de interferón con ribavirina, pues al estar el interferon pegilado (unido a un polietilenglicol), disminuye su aclaramiento renal, prolongando su vida media y aumentando sus concentraciones plasmáticas.

Hemos valorado la utilidad del VHC-Ag como indicador de respuesta terapéutica, y su posible asociación con los factores predictivos de respuesta al tratamiento expuestos en el grupo anterior

De los 15 pacientes tratados con interferón pegilado y ribavirina, 7 eran mujeres y 8 eran varones, con una edad media de 37.6 años. Al relacionar los datos epidemiológicos, de edad y sexo, con la respuesta al tratamiento no se encontraron diferencias significativas, ya que la edad media de los respondedores y no respondedores es muy similar (36.43 años vs. 38.63 años), pese a que la edad inferior a 40 años es un factor positivo de predicción de respuesta al tratamiento.

Al comienzo del estudio se determinaron en cada uno de los 15 pacientes las transaminasas basales con una media ALT de 95.60 mU/ml. Al relacionar los niveles basales de transaminasas con la respuesta al tratamiento no se obtuvieron diferencias significativas entre respondedores y no respondedores. Los tres pacientes cuyas ALT basales presentaban valores inferiores a 26 mU/ml, tuvieron respuesta sostenida al tratamiento, dato concordante con los obtenidos por Calleja P y cols (166) y y Olaso V y cols (167), que indican que con niveles bajos de transaminasas se obtiene una mejor respuesta al tratamiento. En nuestro estudio no siempre hay una relación entre ALT y respuesta al tratamiento, ya que de los cinco

pacientes con ALT comprendidas entre 26 y 50 mU/ml solamente responden dos, y de los cuatro con valores superiores a 100 mU/ml uno de ellos tiene una respuesta sostenida. Estos datos son similares a los obtenidos por Olaso V y cols (170), que demuestran que las ALT no son un buen factor predictivo de respuesta al tratamiento.

El genotipo más frecuente fue el 3a, que a priori se asocia con una mejor respuesta al tratamiento (178), de hecho en nuestro caso de cinco pacientes con dicho genotipo, 4 respondieron al tratamiento aunque no se han obtenido diferencias significativas por el pequeño tamaño de la muestra.

También se valoraron los resultados basales de VHC-Ag y carga viral de los 15 pacientes frente a la respuesta del tratamiento sin encontrarse diferencias significativas en ninguno de los casos. De los pacientes con carga viral superior a 800.000 UI/ml, el 50% de ellos obtuvieron una respuesta sostenida al tratamiento y así mismo de los que tenían carga viral inferior a 800.000 UI/ml sólo respondió el 50% de los casos, por tanto en nuestros pacientes la respuesta al tratamiento no se ve influenciada por la carga viral basal. (179)

En este grupo la correlación cuantitativa entre el VHC-Ag y el VHC-ARN ha sido moderada ( $r = 0.687$ ), basándonos en la ecuación de correlación obtenida para este grupo, 800.000 UI/ml equivaldrían a 92.547pg/ml. Observamos que en cuatro de los cinco pacientes no respondedores la concentración basal de VHC-Ag es superior a 92.547 pg/ml y sin embargo de los 7 pacientes respondedores solamente tres tenían concentraciones de VHC-Ag inferiores a 92.547pg/ml, por tanto no obtenemos una mejor relación entre la respuesta al tratamiento y los niveles bajos de VHC-Ag.

De los 7 pacientes con respuesta sostenida y considerando como factores predictivos de respuesta positiva la carga viral inferior a 800.000 UI/ml, el genotipo 2 ó 3, niveles de transaminasas inferiores a 26 mU/ml, sexo femenino y edad inferior a 40 años (180), en 4 de ellos se asocian más de tres estos factores.

Durante la monitorización del tratamiento se normalizaron las cifras de transaminasas en todos los pacientes excepto en el paciente nº1, es decir, este paciente hubiera sido considerado no respondedor siguiendo los criterios de no normalización de ALT. Al analizar el comportamiento del VHC-ARN, del VHC-Ag y de las ALT durante el seguimiento, tenemos que indicar que las transaminasas son el peor factor predictivo de respuesta precoz, ya que solo en un paciente se normalizaron las cifras a los tres meses y en el resto de los pacientes, la normalización se consiguió como mínimo a los 7 meses del comienzo del tratamiento. La negativización del VHC-ARN en tres pacientes (42.85%) de los casos se produjo a partir del quinto mes, en un paciente a los tres meses, en dos pacientes a los dos meses y solamente en un paciente se produjo al mes del inicio del tratamiento. El comportamiento del VHC-Ag fue



igual en todos los pacientes ya que se obtuvo la negativización al mes del tratamiento, por tanto este parámetro es el que ha demostrado un mejor valor predictivo de respuesta viral temprana e independiente de las cifras basales de VHC-Ag, del genotipo infectante y de la carga vírica. Nuestros resultados coinciden con diversos estudios en los cuales la negativización del VHC-Ag tiene un 100% de valor predictivo de respuesta en todos ellos, en cuanto al valor predictivo de respuesta viral temprana del VHC-ARN los resultados oscilan del 80-100%. De acuerdo a estos estudios Seme K, y cols (177), Zanetti A (115) y cols, Olaso V y cols (167) y indican que, el VHC-Ag, puede ser usado como una alternativa a la PCR, en predicción de pacientes respondedores tratados con INF-peg más Ribavirina.

De los 5 pacientes no respondedores, tres de ellos presentaban el genotipo 1 y carga viral superior a 800.000 UI/ml que podrían condicionar la ausencia de respuesta.

Durante la monitorización se produjo un descenso en las cifras de ALT en cuatro pacientes, en dos de ellos el descenso no fue muy significativo porque las transaminasas basales estaban sólo ligeramente alteradas (32 y 48 UI/ml) en los otros dos el descenso es más marcado pero nunca llegan a normalizarse este descenso podría ser causado por la ribavirina. En todos los pacientes, cuando finalizan el tratamiento (12 meses) las cifras de ALT estaban por encima de la normalidad,

Al analizar el comportamiento del VHC-ARN y del VHC-Ag durante el seguimiento de estos pacientes, destacamos que el VHC-ARN sólo se negativizó en la muestra del paciente nº 14 siendo de nuevo positivo en la muestra determinada a los 9 meses. Esto se puede explicar porque la carga viral basal de este paciente es de 880.000, y quizás el tratamiento pudo haber producido una disminución en la replicación con niveles de carga indetectables. En tres de los pacientes el VHC-Ag se detecta en todas las muestras, aunque con niveles oscilantes. En dos pacientes el VHC-Ag no se detecta en alguna muestra, en uno de ellos no se pudo determinar la carga viral basal, y en el otro, la carga viral basal era de 880.000UI/ml. La ausencia de VHC-Ag en alguna muestra de estos pacientes, podría corresponder a una falta de sensibilidad de la técnica, hecho que se ha descrito en muestras con cargas víricas bajas (177).

Tres de los pacientes tratados recidivaron. Ninguno poseía el genotipo 1, y 2 tenían cargas virales superiores a 800.000UI/ml.

Durante el tratamiento en dos pacientes se produjo una disminución de las cifras de transaminasas pero nunca una normalización, produciéndose picos durante la evolución. En el otro paciente la cifra basal es de 50mU/ml y se produce una normalización hasta el sexto mes de tratamiento; este paciente tiene una carga viral de 346.380 UI/ml.

Al analizar el comportamiento del VHC-ARN, del VHC-Ag durante el seguimiento de estos pacientes destacamos que en los tres casos la negativización del VHC-Ag precede al del VHC-ARN en un mes, hecho documentado por Soffredini R y cols (181). En la recidiva el comportamiento de ambos es similar pero debido a que el VHC-ARN no se pudo determinar en todas las muestras no sabríamos si la detección de VHC-Ag precedería al la detección de VHC-ARN. Cabe destacar el paciente nº 9 que se detecta el VHC-Ag con una concentración de 9 pg/ml y la carga viral en esa muestra es de 4.554 UI/ml, lo cual pone de manifiesto que aunque la sensibilidad del VHC-Ag disminuye con cargas virales baja, no siempre sucede así.

---

## 6. Conclusiones

---

1.- La técnica de detección de antígeno core del virus de la hepatitis C posee una sensibilidad del 97,3% y una especificidad del 96,8%. Es por tanto un buen marcador directo de la infección viral que puede ser usado en la práctica clínica para la detección de viremia.

2.- Se obtiene una buena concordancia entre la detección de antígeno core del virus de la hepatitis C y la presencia de ARN del VHC. Se demuestra que las discrepancias se obtienen en pacientes con carga viral baja. Su detección no se ve influenciada por el genotipo infectante ya que no existen diferencias entre la concentración de antígeno core del virus de la hepatitis C y los diferentes genotipos

3.- Durante el periodo estudiado no se ha producido ninguna seroconversión en la unidad de hemodiálisis y en los pacientes hemodializados seronegativos para el virus de la hepatitis C, el comportamiento del antígeno core del virus de la hepatitis C ha sido paralelo al del ARN por tanto es un buen marcador que se puede utilizar en la vigilancia periódica de estos pacientes.

4.- En los pacientes hemodializados y seropositivos para el virus de la hepatitis C, ratificamos que los anticuerpos de tipo IgM frente al virus de la hepatitis C son un mal marcador de replicación vírica. En estos pacientes la sensibilidad clínica del antígeno core del virus de la hepatitis ha sido inferior al del ARN como consecuencia de las diferentes cinéticas de aclaración de la proteína libre core y la del virión completo que se asocia al ARN.

5.- En los pacientes con hepatitis crónica por virus de la hepatitis C, la concentración del antígeno core del virus de la hepatitis C en la muestra basal no se relaciona con la respuesta al tratamiento antiviral.

6.- En los pacientes con hepatitis crónica por virus de la hepatitis C que no responden al tratamiento el comportamiento del antígeno core del virus de la hepatitis C ha sido paralelo al del ARN. Su utilización es una alternativa en la monitorización del tratamiento, y en la toma de decisión sobre interrupción de terapia antiviral.

7.- En los pacientes con hepatitis crónica por virus de la hepatitis C que responden al tratamiento, la negativización del antígeno core del virus de la hepatitis C precede a la del ARN. Es por tanto un marcador precoz predictivo de respuesta virológica e independiente de las cifras basales del antígeno core del virus de la hepatitis C, del genotipo infectante y de la carga vírica.

---

## 7. Bibliografía

---

- 1.-Dienstag J.L. Non-A, non B hepatitis. I. Recognition, Epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85: 439-462.
- 2.-Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kulns WJ, Hazzi C, Levine RW et al. Long-incubation posttransfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet* 1974; 241-246.
- 3.-Anonymous. Non-A, non-B? *Lancet* 1975; 1: 64-65.
- 4.-Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, McCaustland KA, Elbert, Dolana GH et al. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials. Recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979; 3: 253-269.
- 5.-Bradley DW, Maynard JE, Cook EH, Ebert JW, Gravelle CR, Tsiquaye KN et al. Non A, non B hepatitis in experimentally infected chimpanzees: cross-challenge and electron microscopic studies. *J Med Virol* 1980; 6: 185-201.
- 6.-Bradley DW, Maynard JE, Popper H, Cook EH, Ebert JW, McCaustland KA, et al. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* 1983; 148: 254-265.
- 7.-Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JA, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779.
- 8.-Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- 9.-Kouo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A non B hepatitis. *Science*; 1989; 244: 362-364.
- 10.-Pena MJ, Mosquera MM, Pérez MC et al. Prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis C : epidemiología y características histológicas. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 1998; 16: 456-460.
- 11.-Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP et al. *Virus Taxonomy. Sixth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag Wien-New York 1997: 415-427.

- 12.-Han JH, Shyamola V, Richman H et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1991; 88: 1711-1715.
- 13.-Alonso Alonso A, San Miguel Hernández A, Eiros Bouza JM, Orduña Domingo A, Rodriguez Torres A. *El Virus de la Hepatitis C*. Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Valladolid. Valladolid, 1998
- 14.-Hosein B, Fang CT, Popovxky MA, Ye J, Zhang M, Wang CY, Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with syntetic peptide antigen from capsid protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3647-3651.
- 15.-Sekiya H, Kato N, Ootsuyama Y, Naskazawa T, Yamauchi K, Shimotohno K. Genetic alterations of the putative envelope protein encoding region of hepatitis C virus in the progression to relapsed phase from acute hepatitis: humoral immune response to hypervariable region 1. *Int J Cancer* 1994; 57: 664-670.
- 16.-Dow BC, Coote I, Munro H et al. Confirmation of HCV antibody in blod donors. *J Med Virol* 1993; 41: 215-220.
- 17.- Lefrère JJ, Guiramand S, Lefrère F et al. Full or partial seroconversion in patients infected by hepatitis C virus. *J infect Dis* 1997; 175: 316-322.
- 18.-Nasoff MS, Zebedee SL, Inchauspé G, Prince AM. Identification of an immunodominant epitope within the capsid protein of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5462-5466.
- 19.-Uyttendale S, Claeys H, Mertens W, Verhaeert H, Vermynen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994; 66:122-129.
- 20.-Camps J, Esteban R. *Hepatitis C: Enferm Infecc Microbiol Clín* 1995; 13 (S1): 31-39.
- 21.-Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23: 205-209.
- 22.-Kubo Y, Takeuchi K, Boonmar S, Katayama T, Choo Q-L, Kuo G et al. A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 10367-10372.

- 23.-Takeuchi K, Boonmar S, Kubo Y, Katayama T, Harada H, Ohbayashi A et al. Hepatitis C viral cDNA clones isolated from a healthy carrier donor implicated in posttransfusion non-A, non-B hepatitis. *Gene* 1990; 91: 287-291.
- 24.-Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: Quasiespecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
- 25.-Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.
- 26.-Domingo MJ, Fernández I, Lumberras C et al. Utilización de la hibridación de secuencias de DNA con sondas específicas de oligonucleótidos para identificar genotipos de la hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 1996; 14: 433-436.
- 27.-Selby MJ, Choo QL, Berge K, Kuo G, Glazer E, Eckart M et al. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 1993; 74: 1103-1113.
- 28.-Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75: 1053-1061.
- 29.-Dusheiko G, Schmilovitz-Weis H, Brown D, McOmish F, Yap P-L, Sherlock S et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994;19:13-18.
- 30.-Brechot C. Hepatitis C virus 1b, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:754-774
- 31.-Cha TA, Beall E, Irvina B, kolberg J, Chien D, kuo G et al. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7144-7148.
- 32.-Oshima M, Tsuchiya M, Yagasaki M, Orita T, Hasegawa M, Tomonoh K et al. cDNA clones of Japanese hepatitis C virus genomes derived from a single patient show sequence heterogeneity. *J Gen Virol* 1991; 72: 2805-2809.
- 33.-Fong TL, Shindo M, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J. Clin Invest* 1991; 88:1058-1060.



- 34.-McGuinness PH, Bishop GA, McCaughan GW, Trowbridge R, Gowans EJ. False detection of negative strand hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1994;343:551-552.
- 35.-Leon P, Lopez JA, de Ory F, Elola C, Echevarría JM. Detección de anticuerpos IgG de baja avididad en el diagnóstico de la infección primaria aguda por virus de la hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15: 14-18.
- 36.-Martell M, Esteban JI, Quer J et al. Hepatitis C virus (HVC) circulates as population of different but closely related genomes: quasispecies nature of >HVC genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
- 37.-Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HVC) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HVC infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3468-3472.
- 38.-Córdoba J, Camps J, Esteban JL. The clinical picture of acute and chronic hepatitis C. In: Reisinger HW, ed. *Hepatitis C virus*. Basel, Karger 1994;69-88.
- 39.-Mattsson L, Weiland O, Glaumann H. Chronic non-A, non-B develop after transfusion, illicit self-injections or sporadically. Outcome during long-term follow-up. A comparison. *Liver* 1989; 9:120-127.
- 40.-Fattovich G, Tagger A, Brolo L, Giustina G, Pontisso P, Realdi G et al. Hepatitis C virus infection in chronic hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1991; 163:400-402.
- 41.-Fong TL, de Bisceglie AM, Waggoner JG, Banks SM, Hoofnagle JH. The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1991;14:64-67.
- 42.-Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlostsky Jm, Dhumeaux D, and the study group for the prevalence and the epidemiology of hepatitis C virus. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus. epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a french survey of 6664 patients. *Hepatology* 1997; 26:485-490.
- 43.-Sep LB. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1992; 327: 1906-1911.
- 44.-Resnick RH, Koff R. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Prevalence and significance. *Arch Intern Med* 1993; 153:1672-1677

- 45.-Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV,. Determinants of viral clearance during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-1406.
- 46.-Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H et al. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 2001; 345: 1452-1457.
- 47.-Leon P, Echevarría JM y el Grupo Español de Estudio de Donantes de Sangre en Riesgo de Transmisión del VHC (GEDSRT-VHC). Planteamiento y significado de las pruebas de confirmación de presencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en donantes de sangre. *Sangre* 1999; 44: 309-314.
- 48.-Cuthbert JA, Hepatitis C: Progress and problems. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:505-532.
- 49.-Johnson RH, Gretch DR, Yamobe H. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N. Engl J Med* 1993;328:465-470
- 50.-Leon P, Lopez JA, Elola C, Echevarría JM. Características de los actuales métodos de detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C y definición de criterios para su evaluación. *Hepatol Clin* 1994; 2: 235-244.
- 51.-Couroucé AM, Barin F, Botté Ch et al. A comparative Evaluation of the sensitivity of seven anti-hepatitis C virus screening test. *Vox Sang* 1995; 69: 213-216.
- 52.-Leon P, Lopez JA, Elola C, Lee SR, Calmann M, Echevarría JM. Use of overlapping synthetic peptides to characterise samples from blood donors with indeterminate results to hepatitis C virus core antigen. *Vox Sang* 1998; 75: 32-36.
- 53.-Uyttendale S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang*, 1994; 66: 122-129.
- 54.-de Ory F, Antonaya J, Fernandez MV, Echevarria. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J.Clin Microbiol* 1993; 31: 1669-1671.
- 55.-Alonso Alonso P, Oerduña A, San Miguel A, Dominguez E, Gutierrez P, Zaezosa P et al. Genotipos del virus de la hepatitis C: relación con los factores de riesgo, con la gravedad de la enfermedad hepática y con la respuesta serológica. *Med Clin (Barc.)*1998; 110:681-686.
- 56.-Iwarson S, Norkrans G, Wejstal R. Hepatitis C: Natural history of a unique infection. *Clin Infect Dis* 1995;20:1361-1370

- 57.-Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY et al. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modelled after retroviral replication. *Prog Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7797.
- 58.-McDonough SH, Giachetti C, Yang Y, Kolk DP, Billyard E, Mimms L. High throughput assay for the simultaneous or separate detection of human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis type C virus (HCV). *Infusion Ther Transfusion Med* 1998, 25: 164-169.
- 59.-Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermoestable ligase. *Prog Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 189-193.
- 60.-Eiestein BT. The polymerase chains reaction: a new method using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 178-183.
- 61.-Moriya T, Sasasaki F, Tanaka J et al. Comparison of HCV core antigen activity by ELISA and amount of HCV RNA by branched DNA assay. *Int Hepatol Commun* 1994; 2: 175-177.
- 62.-Aoyagi K, Ohue C, Iida K et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1802-1808.
- 63.-Perteson J, Green G, Iida K et al. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody-negative "window" phase of hepatitis C infection. *Vox Sang* 2000; 78: 80-85.
- 64.-Echavarría JM, León P, Lee S, Calmann M, López JA, Elola C. Detección of hepatitis C virus core antigen (HCCAg) by enzyme immunoassay: a new tool in diagnostic virology. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Association of Blood Banks. San Francisco, 1999.
- 65.-Bouvier M, Patel K, Beaucourt S et al. HCV core antigen: a new marker of HCV infection. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Blood Banks. San Antonio, Texas. 2001.
- 66.-Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM et al. Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period; clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3110-3114.
- 67.-Dahari H, Hezode C, Bouvier M et al. HCV core antigen kinetics during treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha and/or ribavirin. 8<sup>th</sup> International Symposium on HCV. Paris, 2001.

68.-Picchio GR. "Total HCV antigen (track-C): un Nuevo marcador de viremia durante al curso de la infección por el virus de la hepatitis C". X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sevilla, 2002

69.-Leary TP, Shah DO, Desai SM et al. A chemiluminescent immunoassay for detection of hepatitis C virus (HCV) core protein in human serum and plasma. 8<sup>th</sup> International Symposium on HCV. Paris, 2001.

70.-Bahl C, Picchio G, Niven P et al. HCV core antigen ELISA assay detects HCV core antigen in specimens infected with major HCV genotypes. VII International Symposium of Blood Transfusion. Paris 2001.

71.-Kurtz JB, Boxall E, Qusir N et al. The diagnostic significan of an assay for "total" hepatitis C core antigen. J Virol Methods 2001; 96: 127-132.

72.-Zanetti A, Lunel F, Marcellin P. Total HCV core antigen assay : a new marcal of HCV viremia and its application in diagnosis. II Congress of the International Association for the Study of the Liver. Madrid, 2002.

73.-Nakashima K, Kashiwagi S, Hayashi J et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. Am J Epidemiol 1992; 136: 1132-1137.

74.-Gutierrez P, Orduña A, Bratos MA et al. Prevalence of anti-hepatitis C virus antibodies in positive FTA-ABS non-drug abusing female prostitutes in Spain. Sex Trans Dis 1992; 19: 39-40.

75.-Zanetti AR, Tanzi E, Paccagnini S et al. Mother-to-infant transmisión of hepatitis C virus. Lancet 1995; 345: 289-291.

76.-Lin HH, Kao JH, Hsu HY et al. Absence of infection in breast-fed infants born to hepatitis C virus-infected mothers. J Pediatr 1995; 126: 589-591.

77.-Alter MJ, Hadler SC, Judson FN et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. J Am Med Assoc 1990; 264: 2231-2235.

78.-Bjoro K, Froland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T. Hepatitis C infection in patients with primary hypogammabulinemia after treatment with contaminated immune globulin. New Engl Med 1994; 331: 1607-1611.

79.-Echeverría JM, León P, Domingo CJ et al. Laboratory diagnosis and molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis C virus infection among recipients of a human intravenous immunoglobulin in Spain. *Transfusion* 1996; 36: 725-730.

80.-Le Pogam S, Le Chapis D, Christen D, Dubois F, Barin F, Goudeau A. Hepatitis C in a hemodialysis unit; molecular evidence for nosocomial transmission. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3040-3043.

81.-Esteban JI, Gomez J, Martell et al. Transmisión of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996; 334: 555-560.

82.-Frank CH, Mohamed MK, Strickland GT et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000; 335: 887-891.

83.-Ramírez R, Castañeda R, Barranco D et al. II Encuesta de serovigilancia de la Comunidad de Madrid. Documentos técnicos en Salud Pública, Nº 29. Conserjería de Sanidad y Servicios Sociales, CAM. Madrid 1995.

84.-Nalpas B, Desenclos JC, Delarques-Astegneau E, Drucker J. Management of hepatitis C by European hepatologists. *J Hepatol* 1999; 31(S1): 141-145.

85.-Serra C, Torres M, Campins M. Riesgo de infección por el virus de la hepatitis C en el personal sanitario: Evidencia actual y posibilidad de prevención post-exposición. *Med Clín* 1997; 108: 629-635.

86.-Echevarría JM, León P. Infección por VHC en el personal sanitario y profilaxis mediante inmunoglobulina humana. *Med Clín* 1998; 111: 438-439.

87.- León P, López JA, Amela C et al. Prevalencia de tipos del virus de la hepatitis C en donantes de sangre española: Resultados de un estudio multicéntrico de ámbito estatal. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 1999; 17: 448-454.

88.-Bravo R, Soriano V, García-Samaniego J et al. Hepatitis C virus genotypes in different risk populations in Spain. *J Infect Dis* 1996; 183: 509-510.

89.-Alonso P, Orduña A, San Miguel A et al. Variantes del virus de la hepatitis C en diferentes grupos de riesgo. Estudio comparativo de un método de genotipificación y otro de serotipificación. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 1998; 16: 111-117.

90.-Echevarria JM, León P, Pozo F, Avellón A. Follow up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine year period. *Enfm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2005.

91.-Battaglia AM et al. Combination therapy with interferon and ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C infection. *Ann Pharmacotherapy* 2000; 34(4): 487-94.

92.-Is pegylated interferon plus ribavirin set to become the standard therapy for patients with hepatitis C? *Drugs Ther Perspect* 2001; 17(22): 5-8.

93.-Marcellin P et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic hcv rna in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alfa therapy. *Ann Intern Med* 1997; 127(10): 875-81.

94.-Liang TJ et al. Pathogenesis natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132(4): 296-305.

95.-Benomar-Haurez A et al. Traitement actuel de l'hépatite C : Place de la ribavirine. *Dossier* 2000; XXI(4) : 8-45.

96.-Poynard T et al. Randomised trial of interferon alfa2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alfa2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352(9138):146-32.

97.-McHutchison JG et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339(21): 1485-92.

98.-Brä N. Pegylated Interferons and Advances in Therapy for Chronic Hepatitis C. [citado de 15-11-02]. Disponible en URL: <http://www.medscape.com>.

99.-Conférence de consensus. Traitement de l'hépatite C. [citado de 27-06-02]. Disponible en URL : <http://www.anaes.fr>

100.-Manns MP et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358(9286): 958-65.

101.-Fried MW et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Eng J Med* 2002; 347(13): 975-82.

102.-National Institutes of Health (NIH). Consensus development Conference Statement. Management of Hepatitis C: 2002 - June 10-12-2002. *Hepatology* 2002; 36(5,S1): S1-S20.

- 103.-Ribavirin/interferon alfa. (Drug Evaluations). In: Gelman CR et al, editors. Drugdex\* Information System. 2002. Vol. 114. Englewood: Micromedex Inc.
- 104.-Reddy KR. Public-Health Impact, Natural History, Diagnosis, and Clinical Management of Hepatitis C: Emerging Clinical Options with Interferon-Based Therapies CME. [ citado de 13-05-02 ]. Disponible en URL: <http://www.medscape.com>
- 105.-Bruno Ret al. HCV shronic hepatitis in patients with HIV: clinical managment issues. AM J Gastoenterol 2002; 97(7): 1598-606.
- 106.-Bernstein D. Diagnosis, and Clinical management of Hepatitis C. Medical Education Collaborative.[ citado de 20-09-02 ]. Disponible en URL: <http://www.medscape.com>
- 107.- Lauer G, Walker BD. Hepatitis C virus. N engl J Med 2001; 345: 41-52.
- 108.-Pascal Veillon, Christopher Payan, Gastón Picchio, Michèle Maniez-Montreuil, Philippe Guntz, and Françoise Lunel. Comparative Evaluation of Total Hepatitis C Virus core Antigen, Branched-DNA, and Amplicor Monitor Assays in Determining Viremia for Patients with Chronic Hepatitis C during Interferon Plus Ribavirin Combination Therapy. Journal of Clinical Microbiology, July 2003, p.3212-3220.
- 109.-Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, de Ligi C, Crovari P. Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of "window-phase" blood donations. Vox Sang 2001; 80:19-23
- 110.-Richter S.S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. J. Clin Microbiology. 2002. 40:12: 4407-4412.
- 111.-Takahashi K.,E. Tanaka, A. Matsumoto, A. Urushihara, and T. Sodeyma. Usefulness of simple assays for serum concentration of hepatitis C virus RNA and HCV genotype in predicting the response of patients with chronic hepatitis C to interferon alpha 2a therapy. J. Med. Virol. 1995. 46:162-168
- 112.-Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez-Montreuil M, Levayer Th, Zapitelli J.P, Lefrere J.J. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. Transfusion. 2003. 43:958-962.

113.-Tanaka E, Ohue Ch, Aoyagi K, Yamaguchi K, Yagi S, Kiyosawa K, Alter H. Evaluation of a new Enzyme Immunoassay C Virus (HCV) Core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology* 2000. 32:2, 388-393.

114.-Katsumi Aoyagi, Chiraru Ohue, Kumiko Iida, Tatsuji Kimura, Eiji Tanaka, Kendo Kiyosawa and Shintaro Yagi. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for Hepatitis C virus core antigen 1999. *J. Clinical Microbiology*.37:6:1802-1808

115.-Alessandro R. Zanetti, Luisa Romanò, Maurizia Brunetto, Máximo Colombo, Giorgio Bellati, and Charles Tackney. Total HCV Core Antigen Assay: A new Marker of Hepatitis C Viremia for Monitoring the Progress of Therapy. *Journal of Medical Virology*. 2003.70:27-30.

116.-Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, de Luigi C, Crovari P. Novel Approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3110-4.

117.-Gaudy C, Thevenas C, Tichet J, Mariotte N, Goudeau A, Dubois F. Usefulness of Hepatitis C Virus Core Antigen Assay for Screening of a Population Undergoing Routine Medical Checkup. *Journal of Clinical Microbiology*. Apr 2005; 43(4):1722-26.

118.-I. Gracia-Bermejo, P. Díez-Ferrero, C. García-Esteban, B. Ramos, M. Flores y M. Sánchez-Concheiro. Detección de viremia y replicación del virus de la hepatitis C por enzimmunoensayo. ¿Es posible?. XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Mayo 2004

119.-Cividini A, Cerino A, Muzzi A, Furione M, Rebucci Ch, Segagni L, Gatti M, Barnaba V, Mondelli M. Kinetics and significance of serum hepatitis C virus Core antigen in patients with Acute hepatitis C. *J. clin. Microbiology*. 2003. 41:5:2144-2146.

120.-Tobler LH, Stramer SL, Lee SR, Baggett D, Wright D, Hirschhorn D, Walsh I, Busch MP. Performance of ORTHO® HCV core antigen and trak-C trade mark assays for detection of viraemia in pre-seroconversion plasma and whole blood donors. *Vox Sang*. 2005 Nov;89(4):201-7.

121.-Nubling CM, Unger G, Chudy M, Raia S, Lower J. Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion*. 2002 Aug;42(8):1037-45.

122.-Kurtz J.B, Boxall E., Qusir N, Shirley J, Coleman D, Chandler C. The diagnostic significance of an assay for total hepatitis C core antigen. *Journal of Virology*. 1999. 96:127-132



123.-Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Pichio G, Dhumeaux D, Neumann A.U, McHutchison J.G and Pawlotsky JM. Clinical utility of total HCV Core Antigen quantification: A new indirect marker of HCV replication. *Hepatology*. 2002. 36:1:211-218.

124.- León P, López JA, Amela C et al. Prevalencia de tipos del virus de la hepatitis C en donantes de sangre españoles: resultados de un estudio multicentrico de ambito estatal. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 1999.17: 448-454.

125.-Agha S, Tanaka Y, Saady N, Kurbanov, Abo-Zeid M, El-Malky M, Ohta N, Yoshizawa H, Mizokami M. Reliability of hepatitis C core antigen assay for detection of viremia in HCV genotypes 1, 2, 3, and 4 infected blood donors: a collaborative study between Japan, Egypt, and Uzbekistan. *J Med Virol*. 2004 Jun; 73(2):216-22.

126.-Moreira RC, Lemos MF, Longui CA, Granato C.Hepatitis C and Hemodiálisis: A Review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2005; 9(3):269-275.

127.-García-Valdecasas J, Bernal MC, García F, Cerezo S. Virus de la Hepatitis C: estado actual. Avances y problemas en el diagnóstico. Trasmisión en Hemodiálisis. *Nefrología*. 1996. XVI: 2: 128-137.

128.-Fabrizi F, Lunghi G, Aucella F, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, Vigilante D, Limido A, Martin P. Novel Assay Using Total Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen quantification for Diagnosis of HCV Infection in Dialysis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. Jan 2005; 43(1): 414-20

129.-Jonson JR, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartewell P, Couser WG, Corey L, Wener MH, Alpers CE, Willson R. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 1993. 328;7:465-470.

130.-García-Valdecasas J, Bernal C, Garcia F, Cerezo S, Umana W.O, Albertini B, Kimmel P. Epidemiology of Hepatitis C virus infection in patients with renal disease. *J. Am.Soc.Nephrol*. 1994. 5:186-1992.

131.-Vazquez Martul E, Tettamazzi F, Mosquera J. Patología Renal y glomerular y VHC. *Nefrología* 2005. 25. 4; 345-349.

132.-Sampietro M, Badalamenti S, Grazizni G,. Nosocomial hepatitis C in dialysis unit. *Nephron*. 1996. 74:251-260.

133.-Chauveau Ph. Epidemiology of hepatitis C virus infection in chronic haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 1996; 11:4: 39-41

134.-Zeldis JB, Depner TA, Kuramoto IK, Gish RG y Holland PV. Prevalence of hepatitis C virus antibodies among haemodialysis patients. Ann Intern Med 1990.112:958-960.

135.-Jadoul M. Transmission routes of HCV infection in dialysis. Nephrol Dial Transplant 1996. 11:4: 36-39.

136.-Sandhu J, Preiksaitis JK, Campbell PM, et al. Hepatitis C prevalence and risk factors in the northern Alberta dialysis population. Am J Epidemiol 1999;150:58-66.

137.-Valtuille R, Fernandez JL, Berrido J, et al. Evidence of hepatitis C virus pasaje across dialysis membrana. Nephron 1998;80:194-6.

138.-Abacioglu YH, Bacaksiz F, Bahar IH, Simmonds P. Molecular Evidence of Nosocomial Transmisi3n of Hepatitis C virus in Haemodialysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2002) 19: 182-186.

139.-Guías de Actuaci3n clínicade la sen. Nefrología. 2004. Vol. XXIV. Número extraordinario (II)

140.-Valcavi P, Medici CN, Casula F, Arcangeletti MC, De Conto F, Pinardi F, Calderaro A, Chezzi C, Dettori G. Evaluation of a Total Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen Assay for the Detection of Antigenaemia in Anti-HCV Positive Individuals. Journal of Medical Virology. 2004.73:397-403.

141.-Chau KH, Dawson GJ, Mushahwar IK, Gutierrez RA, Jonson RG, Lesniewski RR, Mattsson L, Weiland O. IgM- Antibody response to hepatitis C virus antigens in acute and chronic post-transfusion non A, non B hepatitis. Journal of Virological Methods. 1991; 35:343-52.

142.-Yuki N, Hayashi N, Ohkawa K, Hagiwara H, Oshita M, Katayama K, et al. The significance of immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. Hepatology. 1995;22:402-6.

143.-[Papatheodoridis GV](#), [Delladetsima JK](#), [Katsoulidou A](#), [Sypsa V](#), [Albrecht M](#), [Michel G](#), [Hatzakis A](#), [Tassopoulos NC](#). Significance of IgM anti-HCV core level in chronic hepatitis C. J Hepatol. 1997. 27(1):36-41.

144.-García-Valdecasas J, Bernal C, Cerezo S, García F, Montir N, Leyva A, Umana WO, Bosch JP. Hepatitis C Virus RNA in patients with Anti-HCV on Hemodialysis. Relationship to transaminase levels. *Asaio Journal*. 1994. Vol 40. No. 3: 1058-2916.

145.-Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi, Colucci P, Pagano A, Ponticelli C, Locatelli F. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *Am J Kidney Dis*. 2001 Nov; 38(%):1009-15.

146.-Quiroga JA, Campillo ML, Castillo I, Bartolomé J, Porres JC, Carreño V. IgM Antibody, to Hepatitis C virus in Acute and Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1991. Vol. 14. No. 1: 175-180.

147.-Brillanti S, Masci C, Ricci P, Miglioli M, Barbara L. Significance of IgM Antibody to Hepatitis C virus in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 1992. Vol. 15: 998-1001.

148.-Bouzgarrou N, Fodh I, Othman SB, Achour A, Grattard F, Trabelis A, Pozzetto B. Evaluation of a total core antigen assay for the diagnosis of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Med Virol* 2005. 77(4):502-8.

149.- Khaja MN, Madhavi c, Thippavazzula R, Nafeesa F, Habib AM, Habibullah CM, Guntaka RV. High prevalence of hepatitis C virus infection and genotype distribution among population, blood donors and risk groups. *Infect Genet Evol*. 2005 Jun 27.

150.-Castell J, Gutierrez G. Outbreak of 18 cases of hepatitis C in haemodialysis unit. *Gac. Sanit*. 2005 May-Jun; 19(3): 214-20

151.-Barrera JM, Bruguera M, Guadalupe-Ercilla M, Gil C, Celix R, Gil MP, Persistnet hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology*. 1995. 21:639-644.

152.-Fernández JL, del Pino N, Lef I, Valtuille R, Berridi J, Rendo P, Viola L. Serum Hepatitis C Virus RNA in Anti-HCV Negative Hemodiálisis Patients. *Dial Transplant* 1996. Vol 25: 14-18.

153.-Lee DS, Lesniewski RR, Sung YC, Min WK, Park SG, LeeKH, Kim HS. Significance of anti-E2 in diagnosis of HCV infection in patients on maintenance hemodialysis: Anti-E2 is frequently detected among anti-HCV antibody-negative patients. *J Am Soc Nephrol*. 1996. Vol 7: 2409-2413.

154.-García F, Mateos ML, García-Valdecasas J, Teruel JL, Bernal C,. Fernández-Lucas M. Relevance of investigating the Presence of Hepatitis C Virus RNA in HCV Antibody-Negative Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol* 2000. 20:166-167.

155.-Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez-Montreuil M, Levayer T, Zappitelli JP, Lefrere JJ. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion*. 2003 Jul;43(7):958-62.

156.-Reddy AK, Murthy KV, Lakshmi V. Prevalence of HCV infection in patients on haemodialysis: survey by antibody and core antigen detection. *Indian J Med Microbiol*. 2005 Apr;23(2): 106-10.

157.-Fabrizi F, de Vecchi AF, Como G, Lunghi G, Martín P. De novo HCV infection among diálisis patients: a prospective study by HCV core antigen ELISA assay. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Apr 1;21(7):861-9.

158.-Bruno Retal. HCV Chronic hepatitis in patients with HIV: clinical managent issues. *Am J Gastroenterol* 2002. 97(7): 1598-606.

159.-Backus, Lisa I, Boothroyd, Derek, Deyton, Lawrence R. HIV, hepatitis C and HIV/hepatitis C virus co-infection in vulnerable populations. *AIDS*. October 2005; 19(3):13-19.

160.-Garfin RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infections in short-term injection drugs users: the prevalence of hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropics viruses. *Am J Public Health*. 1996. 86:655-661.

161.-Hagan, Holly; Thiede, Hanne; Des Jarlais, Don C. HIV/Hepatitis C virus co-infection in drug users: Risk behaviour and prevention. *AIDS*. October 2005;19(3):199-207.

162.-Rubio Caballero M, Rubio Rivas C, Nogués Biau A, Manonelles Fernández A. Epidemiología de la hepatitis crónica por virus de la hepatitis C en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Estudio de 767 pacientes infectados por el VIH. *Med Clin (Barc)* 2005;125:56-58

163.-Gonzalez J, Guerra L y grupo de trabajo para la elaboración de recomendaciones sobre hepatitis virales en pacientes coinfectados por VIH. Coinfección por el VIH y virus de las hepatitis A, B, C en pacientes adultos. Revisión y recomendaciones de GESIDA/PNS en terapia antirretroviral y enfermedades asociadas al VIH (2000-2002). Documentos de consenso de GESIDA. Madrid: Doyma;2002: 173-225.

164.-Zanetti AR, Tanzi E, Paccagnini S, et al. Mother –to-infant transmisión of hepatitis C virus. Lombardy Study Group on vertical VHC transmission. *Lancet*. 342:289-291.1995.

165.-Gonzalez- Garcia JJ; Mahillo B, Hernandez S,Pacheco R, Diz S, García P, Esteban H, Arribas JR, Quereda C, Rubio R, Díez J, Moreno S, Vazquez –Rodriguez JJ y Grupo de Trabajo GESIDA 29/02-FIPSE 12185/01 (GT GESIDA 29/02). Estudio multicéntrico sobre prevalencia de las coinfecciones por virus de hepatitis, indicación de tratamiento de hepatitis crónica C y necesidad de trasplante hepático en pacientes infectados por el VIH en España. Estudio GESIDA 29/02FIPSE 12185/01. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(6):340-8.

166.-Calleja Panero JL, Martinez Porras JL, Albiños Martinez A. Tratamiento de la Hepatitis crónica por Virus C. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 25:3; 69-77.2001

167.-V.Olaso, J.Cordoba, J.M. Molina, B.Lopez, M.S. Siles, E. Monte, F.Calvo, I.Bau, B. Beltran. B. Martinez, M. Gobernado. Análisis mediante curvas ROC de factores predictivos al tratamiento con interferon mas ribavirina en pacientes con hepatitis cronica C en recaida tras un tratamiento previo con interferon. *Rev.Esp.Quimioterap*, Diciembre 2002; vol.15 (nº4): 366-373.

168.-Chemello, L., L. Calvaletto, F. Noventa, P. Bonetti, C. Casarin, E. Bernardinello, P. Pontisso, C. Donada, P. Casarin, F. Belussi, M. Frezza, and A. Alberti. Predictors of sustained response, relapser and no response in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alpha. *J. Viral Hepatitis* 1995. 2:91-96.

169.-Hagiwara, H., N. Hayashi, E. Mita, T. Takehara, A KAsahara, H. Fusamoto, and T. Kamada. 1993. Quantitative análisis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alpha therapy. *Gastroenterology* 104:877-883.

170.-Olaso V, Córdoba J, Molina JM, López B, Siles MS, Jaén J, Martínez F, Calvo F, Garijo R, Gobernado M. Retratamiento con interferón más ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C, genotipo 1, no respondedores o con recaída tras un tratamiento previo con interferón. Seguimiento a largo plazo. *Rev Esp Quimioterap*. Septiembre 2002; 15(3): 247-56

171.-Toyoda, H., S. Nakano, T. Kumada, I. Takeda, K. Sugiyama, T. Osada, S. Kiriya, E. Orito, and M. Mizokami. Comparison of serum hepatitis C virus RNA concentration by branched-DNA probe assay with competitive reverse transcription polymerase chain reaction as a predictor of response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C patients. *J. Med. Virol*. 1996. 48:354-359.

172.-Venero P, Moreno M, Rodríguez T, Pereiras C, Pérez R, Leiva PS. Utilidad de la detección del antígeno del core total del VHC como marcazdor viral en pacientes con hepatitis crónica C a tratamiento viral. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(1):1-230

173.-Hino, K., S. Sainokami, K. Shimoda, S. Iliono, Y. Wang, H. Okamoto, and Y. Miyakawa. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 1994. 42:299-305.

174.-Lau, J. Y., G. L. Davis, J. Kniffen, K. P. Quian, M.S. Urdea, C. Chan, M. Mizokami, P. D. Neuwald, And J. C. Wilber. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis. *Lancet* 1993. 341:1501-1504.

175.-Martinot-Peignoux, M., P. Marcellin, M. Pouteau, C. Castelnau, N. Boyer, M. Poliquin, C. Degott, I. Descombes, V. Le breton, V. Milotova, J. P. Benhamou, and Erlinger. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995. 22:1050-1056.

176.-A. Castro, J.A. Lorenzo, A. Aguilera, S. López-Calvo, B. Regueiro y J.D. Pedreira. Utilidad del antígeno C y su correlación con el RNA-VHC en la monitorización de la terapia antivírica en pacientes con hepatitis crónica C. XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Mayo 2004.

177.-Seme K, Poljak M, Babia DZ, Mociłnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *Journal of Clinical Virology* 2005;32:92-101.

178.-Yoshika K, Kakumu S, Wakita T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chainreaction and response to interferon alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 16: 293-299.

179.-Enriquez J, Gallego A, Torras X y col. Retreatment for 24 vs 48 weeks with interferon-2b plus ribavirin of chronic hepatitis C patients who relapse or did not respond to interferon alone. *J Viral Hepat.* 2000;7:403-408.

180.-Davis G.L, Esteban-Mur R, Rustgi V y cols. Interferon Alpha-2b alone or in combination with ribavirina for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *N. Engl J Med* 1998;339:1493-1499.

181.-Soffredini R, Runi MG, Parravicini ML, Ronchi G, Del Ninno E, Russo A et al. Serum levels of hepatitis C virus core antigen as a marker of infection and response to therapic. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1738-43.