

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUIMICAS E INGENIERIA

Maestría y Doctorado
en Ciencias e Ingeniería

**“PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)
Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS EN UNA POBLACION DE PACIENTES
DE SERVICIOS ESPECIALIZADOS DE VIH-SIDA DEL HOSPITAL GENERAL
(ISESALUD) DE TIJUANA,B.C.”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA

M.C.Mirna del Carmen Brito Perea

Tijuana,B.C.

Octubre de 2009

C O N T E N I D O

I.- ANTECEDENTES.....	1
II.- GENERALIDADES	
II.1.-Características generales del VHC.....	6
II.2.-Regiones del genoma y proteínas del VHC.....	7
II.3.-Replicación del VHC.....	10
II.4.-Diversidad Genética del VHC.....	13
II.5.-Formas de transmisión.....	14
II.6.-Cuadro Clínico.....	18
II.7.-Diagnóstico	
II.7.1.-Diagnóstico Serológico.....	20
II.7.2.-Estudios Moleculares.....	24

III.- JUSTIFICACIÓN	28
IV.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
V.-OBJETIVOS.....	32
VI.-METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	
VI.1.-Muestreo.....	34
VI.2.-Clasificación.....	34
VI.3.-Recopilación de datos.....	35
VI.4.-Metodología de Laboratorio.....	35
VII.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
VIII.-CONCLUSIONES.....	72
IX.-BIBLIOGRAFIA.....	74

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1.Representación esquemática del genoma del VHC.....	8
Gráfico 2.Modelo Hipotético del ciclo replicativo del VHC.....	12
Gráfico 3.Representación esquemática de la poliproteína del VHC.....	12
Gráfico 4.Homología y nomenclatura de las variantes del VHC.....	14
Gráfico 5.Representación de los antígenos del VHC utilizados en cada versión del Ensayo inmunoenzimático (EIA).....	22
Gráfico 6.Algoritmo de Estudio Viroológico (VHC).....	28
Gráfico 7.Lectura de Absorbancia Prueba Serológica ORTHO HCV 3.0 ELISA Test System SAve Potenciado.....	46
Gráfico 8.Curva Patrón para cuantificación de carga viral Qpcr.....	51
Gráfico 9.Producto de amplificación del RNA del VHC, genotipos 1b.....	56
Gráfico10.Porcentaje de Coinfección VIH-VHC de acuerdo al sexo.....	60
Gráfico 11.Porcentaje de seropositivos a VIH-VHC de acuerdo a la ocupación	61
Gráfico 12.Prevalencia de coinfección VIH-VHC de acuerdo al sexo y la ocupación...62	
Gráfico 13.Asociación de factores de riesgo de transmisión en pacientes con VIH-VHC.....	63
Gráfico 14.Prevalencia de Factores de riesgo de evolución a hepatopatía en coinfección VIH-VHC.....	64
Gráfico 15.Asociación entre los valores de Absorbancia por serología y la	

carga viral en UI para el VHC.....	71
------------------------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo de transmisión de VHC identificados en México.....	18
Tabla 2. Número de secuencia de aminoácidos de los tres antígenos proteicos del VHC utilizados en la Prueba de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado.....	36
Tabla 3. Reactivos utilizados en la prueba de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado.....	38
Tabla 4. Variable de rangos de edad con respecto al Género en la población estudiada.....	56
Tabla 5. Frecuencia de casos de acuerdo a la ocupación de la población en estudio.....	57
Tabla 6. Asociación entre el Tiempo de Diagnóstico y el Tiempo de Tratamiento para VIH en la población estudiada.....	57
Tabla 7. Porcentaje de factores de riesgo de transmisión de VIH-VHC y factores de riesgo de evolución a hepatopatía en la población estudiada.....	59
Tabla 8. Análisis de datos para comparar dos poblaciones en estudio con la positividad a VHC.....	59
Tabla 9. Variables de Edad en Coinfectados VIH-VHC de acuerdo al sexo.....	61
Tabla 10. Comparación de prevalencias de TD y TT en población con VIH y VIH-VHC.....	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores de riesgo de coinfección VIH-VHC.....	65
Cuadro 2. Análisis Bivariado de factores de riesgo asociados a Coinfección VIH-VHC.....	67
Cuadro 3. Análisis Bivariado de factores de riesgo, asociados a Coinfección VIH-VHC, de acuerdo al sexo.....	67
Cuadro 4. Asociación de variables ordinales con infección por VHC.....	68
Cuadro 5. Factores de riesgo de coinfección VIH-VHC; Análisis Multivariado.....	68
Cuadro 6. Comparación de resultados positivos a VHC, por serología, carga viral y genotipo.....	70
Cuadro 7. Comparación de los valores positivos a VHC, absorbancia por	

serología y la carga viral en UI, prueba T para una Muestra.....	70
Cuadro 8. Modelo de regresión lineal de las pruebas para detección para Infección por VHC.....	71

ANEXOS

Anexo 1. Cuestionario y base de Datos.....	85
Anexo 2. Carta de consentimiento informado para participación de adultos en proyectos de investigación.....	86
Anexo 3. Criterios de Inclusión y exclusión proyecto VHC.....	87

I.-ANTECEDENTES

A fines del siglo XIX, los trabajos de Louis Pasteur y otros investigadores convencieron al mundo científico de que las enfermedades infecciosas eran causadas por bacterias, sin embargo la descripción de padecimientos en los que no se pudo demostrar la presencia de bacterias, dio la pauta para nuevos estudios que permitieron evidenciar que algunos agentes infecciosos eran tan diminutos que podían atravesar filtros que retenían la mayoría de las bacterias conocidas, sin ser una toxina y con capacidad de transmitirse de un animal a otro, manteniéndose activo incluso a diluciones muy bajas.

Loefler y Frosch concluyeron que la actividad de estos filtrados, era debida a la presencia de un agente causal capaz de reproducirse y que no podía crecer en medios de cultivo a menos que estuvieran presentes células vegetales vivas, lo cual hizo pensar en la existencia de un diminuto grupo de microorganismos denominados virus (Brock TM,2001).

Los virus causan una variedad importante de padecimientos, entre los que se encuentran el sida, la poliomielitis, el sarampión, la influenza, el dengue y las hepatitis que en la actualidad representan un grave problema de Salud Pública en el mundo.

Las referencias de hepatitis infecciosa se registran desde tiempos muy antiguos, Hipócrates realizó una descripción sobre la hepatitis infecciosa y la característica de "contagiosa" fue contemplada por el Papa Zacarías y San Bonifacio.

El examen detallado del hígado en animales sacrificados, fue practicado por médicos mesopotámicos para pronosticar enfermedades, estas prácticas de adivinación se extendieron dentro del XV centenario A.C. y escritores griegos, romanos y en la literatura china hicieron referencia a la aparición de ictericia.

Durante los conflictos bélicos como las guerras napoleónicas, Ruso-Japonesa, primera y segunda guerra mundial se reportaron con cierta frecuencia

brotos de hepatitis viral y en 1912, Conckayne publicó que la hepatitis viral alcanza el hígado a través de la sangre, posteriormente Mac Donald postuló que la enfermedad por atrofia aguda en el hígado era causada por la acción de algún virus en un daño previo al hígado.

En 1923 Blumer describió el patrón de la enfermedad por hepatitis viral, reportando 63 brotes de epidemia icterica en Estados Unidos entre 1912 a 1922 (Hollinger FB,2000).

La existencia de una transmisión parenteral de hepatitis fue documentada por Lurman en 1885 y han sido registrados casos de ictericia en lugares donde se han intensificado los procedimientos de inmunización, como Brasil en el año de 1930, donde se aplicó la vacuna contra la fiebre amarilla y en 1942 utilizando la misma vacuna en tropas del ejército americano.

En 1945 Mc Callum realizó un estudio en pacientes con enfermedades de transmisión sexual, utilizando jeringas esterilizadas y lavadas, en el que describió lo siguiente: "*Se encontró que la incidencia de hepatitis tiende a ser baja en enfermedades clínicas donde las jeringas fueron esterilizadas entre pacientes y se considera que la incidencia es alta cuando las jeringas solo fueron lavadas*" (Hollinger FB,2000).

En la escuela de Willow Brook para enfermos de incapacidad mental, fueron diferenciados dos tipos de hepatitis: la hepatitis infecciosa y la hepatitis sérica. La hepatitis infecciosa se transmite por vía oral y puede ser por contagio mediato o inmediato y es atribuida al virus de la Hepatitis A, el cual fue descubierto en 1973 por inmunomicroscopía electrónica en las heces de los pacientes con hepatitis infecciosa, el virión icosaédrico de 7 nm fue tentativamente clasificado como parvovirus.

El virus de la hepatitis A es detectado en la sangre y en las heces durante la semana de aparición del signo principal: orina oscura y desaparece después de

que los niveles de transaminasas séricas alcanzan su máximo. Tiene un periodo de aproximadamente 4 semanas (2-6 semanas).

La denominada hepatitis sérica se transmite por vía parenteral y se atribuyó inicialmente al virus de la hepatitis B, que pertenece a la familia de los hepadnavirus, es un pequeño virus de 42 nm de diámetro, de forma esférica. Los síntomas de la hepatitis B aguda se presentan después de 1 a 4 meses del contacto con el virus, aunque algunas personas pueden no presentar ningún síntoma y pasar a un estado de cronicidad.

Estudios posteriores demostraron que algunas hepatitis postransfusionales no se relacionaban a ninguno de los agentes conocidos (A y B) y fue así como se le nombró hepatitis No A, No B a esta infección hepática (Moward CT,2002).

La hepatitis No A, No B, fue considerada como una de las principales causas de morbilidad de hepatitis postransfusional (40 a 50%) con una evolución a hepatitis crónica y desarrollo de cirrosis hepática (15-20%), por lo que en las últimas décadas se dedicaron una gran cantidad de estudios para identificar al agente causal de esta enfermedad y fue en 1989 cuando se describió parte del genoma del ácido desoxirribonucleico (RNA) del virus y fue descrito como virus de la Hepatitis C (VHC) (Chokephaibulkit k,2000; Moward CT,2002).

Investigadores de la Corporación Chiron y colaboradores, junto con investigadores del Centro para el control de las enfermedades en Atlanta (CDC), clonaron una parte del genoma del VHC, lo que condujo al desarrollo de un antígeno recombinante (c100-3), que fue empleado en un ensayo para identificar anticuerpos contra el VHC (Clever LH,2001; Krugman S,2002; Fenner F,2004).

El rastreo de anticuerpos para el VHC en donadores de sangre fue introducido en Estados Unidos en Mayo de 1990, en un intento por reducir la incidencia de hepatitis asociadas a esta vía de transmisión (Clever LH,2001; Plageman PGW,2001).

Antes de la introducción de pruebas serológicas para detección de anticuerpos contra el VHC en donadores de sangre y los modernos métodos de inactivación para productos plasmáticos almacenados, casi el 100 % de los pacientes con hemofilia contraían la infección por VHC debido a la probable contaminación de todos los concentrados plasmáticos, sometidos ahora a tratamiento con calor, o inactivación química (disolvente-detergente), o bien a ambos, con lo cual se ha reducido el riesgo de transmisión del VHC (Van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW,2001).

Entre otros factores de riesgo figuran los tatuajes y las punciones accidentales en los profesionales del area sanitaria. Se produce transmisión del VHC a partir de pacientes con viremia en un 3-10 % de los casos de punción accidental. No disponemos de medidas de intervención con inmunización pasiva anti-VHC y no existen datos sobre la idoneidad del tratamiento precoz con interferón en tales casos (Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T,2002).

Debido a que la infección por VHC supera la respuesta inmune normal y la reinfección acontece en presencia de anticuerpos, queda por ver si es factible la inmunización activa o pasiva. Los pacientes sometidos a hemodiálisis pueden haber adquirido el VHC en el pasado, no sólo por la vía de la transfusión sanguínea sino también por el propio procedimiento de diálisis. Por consiguiente, resultan apropiadas las medidas para prevenir la transmisión del VHC en las unidades de diálisis (Lai ME, Mazzoleni AP, Argiolu F,2004).

Los casos de hepatitis C sin evidencia de exposición por vía parenteral se denominan "esporádicos". La transmisión parenteral encubierta mediante agujas y jeringas mal esterilizadas en los años cincuenta y sesenta pueden haber tenido un importante papel en la transmisión del VHC en ciudades que hoy se reportan como altamente endémicas (McOmish F, Yap PL, Dow BC,2004).

La diseminación intrafamiliar no está demostrada, aunque la transmisión madre-hijo tiene lugar en el 10 % de las madres positivas a RNA del VHC

fundamentalmente cuando los títulos del virus materno son altos (Ohto H, Terazawa S, Sasaki N,2004).

Se considera que el riesgo de transmisión sexual del VHC es bajo, casi todos los estudios muestran una frecuencia entre el 0 y el 3% de contagio de la hepatitis C a través de relaciones sexuales sin protección con una pareja VHC positiva estable y monógama (Bresters D, Mauser-Buschoten EP, Reesink HW,2003).

En Japón, se realizó un estudio con 154 casos índice (los primeros entre varios casos de naturaleza similar, epidemiológicamente relacionados y considerados como fuente de infección) confirmados para VHC, y se demostró que el 16 % de las parejas de estos casos, eran positivos al VHC con el mismo genotipo, sin embargo hay que considerar que puede haber factores de confusión especialmente en zonas altamente endémicas, por ejemplo en este estudio, no se detectó el VHC en parejas de casos índice con menos de 10 años de convivencia y la infección en las parejas se asoció a una mayor duración del matrimonio, lo cual no es concluyente para afirmar la transmisión sexual, ya que tales parejas pudieron haber estado expuestas a otros factores de riesgo, por lo que no se descartaron otras formas de transmisión (Gordon SC, Patel AH, Kulesza GW,2002).

La infección por el virus de la hepatitis C ha alcanzado proporciones epidémicas. En todo el mundo, más de un millón de nuevos casos se comunican anualmente, se cree que tiene una prevalencia mayor inclusive que la hepatitis B (Tong MJ, Reikes AR,2005).

II.-GENERALIDADES

II.1.-Características generales del VHC.-El VHC ha sido clasificado dentro del género *Hepacivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Posee un parecido bastante cercano a otros miembros de esta familia en cuanto a secuencia y organización del genoma, modo de replicación, estructura y procesamiento de la poliproteína. La familia *Flaviviridae* contiene además a los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*. (Kato N,1990; Franeki RI,1991; Boyd RF,2003).

EL VHC es un virus pequeño, recubierto por una envoltura, se inactiva con solventes oleosos, calentamiento, tratamiento con formol y exposición a luz ultravioleta, posee una cadena de RNA lineal simple positiva de unas 9,6 Kb ,el genoma (Gráfico 1) contiene un marco abierto de lectura único de aproximadamente 3000 aminoácidos, flanqueado por regiones no traducidas altamente conservadas, denominadas 5' y 3'UTR. De las dos, la región 5' es la mejor conservada, la que menos varía, con analogías superiores al 98%, y cuya principal función es la unión del RNA viral al ribosoma de las células del huésped a través de la estructura conocida como IRES (*internal ribosome entry sites*).

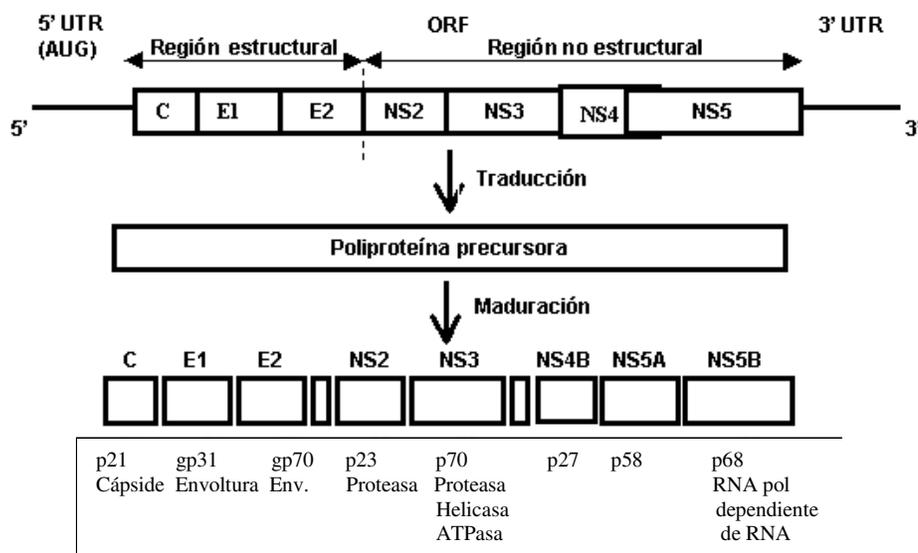


Gráfico 1.-Representación esquemática del genoma del VHC.(Kato M,2001).

El marco de lectura presenta dos regiones: una estructural y otra no estructural. La primera es capaz de codificar las proteínas de la cápside gp21 de la región del Core (C) y las gp31 y gp70 de las regiones E1 y E2 de la envoltura (E). La segunda región, no estructural, codifica para una serie de enzimas con características particulares y actividades diversas que se describen a continuación:

II.2.-Regiones del genoma y proteínas del VHC:

II.2.1.-La Región no traducida 5'UTR está formada por los primeros 332-342 nucleótidos del extremo 5'. Esta secuencia genómica no codifica proteína alguna, sin embargo es esencial para la traducción, porque adopta una estructura terciaria necesaria para el anclaje del ribosoma, lo que explicaría el por qué su secuencia está tan bien conservada entre todos los aislados secuenciados (Homología superior al 97 %). Esta característica la convierte en idónea para las técnicas de diagnóstico molecular basadas en la amplificación génica por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y para el diseño de nuevos fármacos antivirales.

II.2.2.-Región del Core: El producto del Gen C, es una pequeña proteína no glucosilada de 191 aminoácidos denominada p21 y constituye la subunidad básica de la proteína de la nucleocápside que forma el core del virión, se localiza en el extremo amino de la poliproteína, es rica en Prolina y tiene un alto contenido de aminoácidos básicos como la Arginina y la Lisina (23.5%). La proteína core se encuentra predominantemente en el citoplasma.

II.2.3.-Región de la envoltura: Los genes E1 y E2 codifican las dos glucoproteínas de envoltura del VHC, la gp31 y la gp70. La glucoproteína denominada gp31 consta de 192 aa, con un peso molecular (PM) de 32-35 KDa. En su extremo amino se identifica un péptido señal seguido de un sitio de corte. Proteasas del hospedero cortan entre los aminoácidos 191/192 y 383/384. El extremo carboxilo es hidrofóbico y posee dos secuencias homólogas a segmentos transmembranales dentro de los cuales están incluidos cinco motivos de glucosilación.

La segunda glucoproteína gp70, consta de 350-460aa y contiene 11 sitios de glucosilación, con un PM que varía de 58 a 72 KDa, esto es debido a que la proteína presenta dos tipos de procesamiento, en uno, se mantiene intacta, aa 384 al 810 y en el otro, se produce un corte entre los aa 746 y 747 que dá lugar a una E2 troncada y a una proteína denominada p7.

La proteína p7 es una proteína intrínseca de membrana de 63 aa., y las evidencias actuales indican que tiene características semejantes a un conjunto de proteínas llamadas vioporinas, que pueden formar canales iónicos en liposomas, lo que sugiere una posible relación con la liberación de las partículas virales (Soriano V,2007).

En el extremo N-terminal de E2, se encuentran las regiones más variables de todo el genoma viral, denominadas regiones hipervariables I y II (RHV I y II) (Hijikata MN, Kato Y, Ootsuyama M, Nakagawa and Shimotohno K,1991). La primera, de 30 aa, ha sido detectada en todos los aislamientos virales y se ubica justo en el inicio de la proteína (aa 384) y tiene epítomos de linfocitos B. La segunda RHV, ha sido descrita sólo en los aislamientos de genotipo 1b y abarca 7 aa (aa 454-460) (Hijikata MN, Kato Y, Ootsuyama M, Nakagawa and Shimotohno K,1991). La variabilidad presente en esta región puede deberse a la ocurrencia de mutaciones al azar y a la selección de los mutantes que son capaces de escapar a la neutralización por los anticuerpos del hospedero.

Cuando ambas glucoproteínas se expresan juntas en vectores virales, las proteínas E1 y E2 se glucosilan y forman un heterodímero. El complejo E1-E2 purificado es reconocido por la mayoría de los sueros de pacientes infectados con el VHC a diferencia de las proteínas expresadas por separado. Esto indica que la glucosilación o la formación del heterodímero puede ser importantes para la conformación adecuada de los epítomos antigénicos.

II.2.4.-Región NS2.-Esta región codifica la síntesis de la proteína no estructural p23, polipéptido transmembranal que forma parte junto con el dominio de la primera parte de la NS3, de una metaloproteínasa NS2-NS3 dependiente de Zinc,

con actividad de autoproteasa, algunos experimentos la muestran con una participación en el ensamblaje del virión y otros la refieren formando parte del complejo de replicación junto con NS5A y NS5B.

II.2.5.-Región NS3.-La región NS3, corresponde a la tercera proteína no estructural denominada p70 que posee dos actividades enzimáticas, una ATPasa-helicasa, presumiblemente involucrada en el desenrollamiento del complejo RNA genómico de replicación. La otra actividad es de proteasa y realiza cortes del resto de la región no estructural, específicamente en NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

II.2.6.-Región NS4.-La región no estructural NS4 da lugar a la proteína NS4A que actúa como cofactor de NS3, formando un complejo con actividad proteolítica. La proteína NS4A contiene la secuencia antigénica C-100-3, utilizada como antígeno en los diagnósticos serológicos. No obstante haber sido reportada como la región traducida más conservada, diversos estudios demostraron que solo el 50.4 % de los nucleótidos de esta región son comunes en diferentes aislamientos. Se sugiere que se une por su extremo N-terminal a la NS3 y por otra parte también puede unirse directamente a la NS5B y mejorar su actividad polimerasa (Barten-Bartenschlager R, Lohmann V,2000).

II.2.7.-La Región NS5.- Codifica dos proteínas asociadas a la membrana, la primera está fosforilada (NS5A) y la segunda es una forma hiperfosforilada de la primera (NS5B).

En la proteína NS5A existe una región de especial interés por su relación con el tratamiento con interferón, denominada Región Determinante de la Sensibilidad al Interferón (ISDR), que está localizada entre los residuos 2209 y 2248 de la poliproteína e inhibe a la Proteincinasa (PKR), inducida por el interferón e implicada en las señales de apoptosis* y de restricción de la traducción proteica a nivel celular, razón por la que se postula que algunos casos de hepatitis C desarrollen resistencias al interferón alfa. (Barten-Bartenschlager R, Lohmann V,2000).

*Proceso bioquímico programado genéticamente que desencadena la muerte celular de ciertos tejidos de manera controlada.

La proteína NS5B presenta similitud de secuencia con otras polimerasas de RNA virales, por eso, se predice que codifica una polimerasa dependiente de RNA que interviene en la replicación del material genético del VHC.

II.2.8.-Región no traducida en el extremo 3' (3'UTR).- La zona codificante termina en un único codón de parada, al que sigue una región 3' no traducida (3'UTR) que contiene: una zona de 40 nucleótidos, seguida de una hilera de uracilos (poly-U), con citocinas intercaladas y una región muy conservada (98-100% de homología) de 98 nucleótidos. Aunque se desconocen las funciones exactas de la región 3'UTR, se considera que puede ser una atractiva diana para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y de fármacos antivirales (Kato,2001).

II.3.-Replicación del VHC

II.3.1.-Reconocimiento y entrada

Hasta ahora, se desconocen los detalles del ciclo de vida del VHC, porque no se ha logrado su cultivo en el laboratorio. Científicos estadounidenses realizaron dos experimentos separados; en uno, confirmaron que una molécula llamada CD81, que se encuentra en la superficie de las células humanas, juega un papel crucial en el ingreso del VHC. También descubrieron que las moléculas CD81 que no están adheridas a la célula compiten con las que sí lo están y por lo tanto, bloquean la entrada del virus a la célula. Las células que no tenían CD81 resultaron ser inmunes a la infección (Meyer y cols.,2004; Zhang y cols.,2004).

Investigadores del Instituto Biológico de Lille en colaboración con investigadores del Instituto Nacional de Salud e Investigación Médica (INSERM) en Francia y un laboratorio Estadounidense de la Universidad de Stanford han descrito una proteína capaz de bloquear el virus de la hepatitis C en una etapa precoz de su ciclo infeccioso. Estudiando las proteínas asociadas al receptor CD81 identificaron la proteína EWI-2wint. Dicha molécula impide que el virus

reconozca el receptor CD81, del que se sirve para entrar en las células del hígado. La presencia de esta molécula en otro tipo de células explicaría por qué no son infectadas por el virus de la hepatitis C (Gao L, Aizaki H,2004).

Por otra parte algunos estudios indican que el VHC aprovecha el metabolismo de los lípidos para su entrada al tejido hepático. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ingresan a la célula por medio de su receptor (rLDL), el cual también puede ser un intermediario para el ingreso del VHC . La expresión de receptores (rLDL) sobre la superficie celular de los hepatocitos es inversamente proporcional a la concentración de LDL séricas. De esta manera, se puede explicar que, aquellos individuos que tienen aumentadas las LDL presentan menor ingreso del virus a los hepatocitos, ya que, disminuye por competencia el número de receptores del virus. Por el contrario, en pacientes hipertriglicéridémicos con niveles de LDL muy bajos, no existe este mecanismo de competencia por los receptores, consecuentemente el VHC entra fácilmente al hepatocito (Davignon y cols.,1998; Carmena R, Ordovas JM,1999).

Por parte del virus todo parece indicar que es la glucoproteína E2 la responsable del reconocimiento celular, aunque requiere la interacción con E1 para formar un complejo E1-E2 unidos covalentemente para el correcto anclaje del virus al receptor CD81 (Bartenschlager, R. Lohmann V,2000; Zhang y cols.,2004).

II.3.2.-Traducción y Procesamiento de la Poliproteína

Una vez dentro del citoplasma celular, el RNA del virus es traducido directamente mediante la secuencia denominada Sitio Interno de Reconocimiento con el Ribosoma (IRES) en el retículo endoplásmico rugoso (RER), después se produce el procesamiento de la poliproteína, dando lugar a las proteínas estructurales y no estructurales. La polimerasa dependiente de RNA, utiliza el RNA de cadena positiva (RNA⁺) para la síntesis de RNA de cadena negativa (RNA⁻) que a su vez sirve como molde para fabricar más cadenas de RNA⁺. Finalmente las cadenas de RNA⁺ interactúan con las proteínas de la envoltura y se lleva a cabo la encapsidación en el aparato de golgi para su posterior liberación .(Ver Gráfico 2).

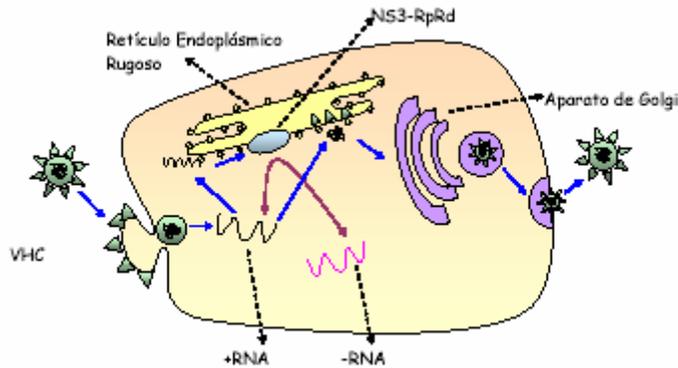


Gráfico 2.-Modelo Hipotético del ciclo replicativo del VHC (Bartenschlager y cols,2000)

El procesamiento de la poliproteína viral se lleva a cabo también en el Retículo endoplásmico rugoso (RER), el primer corte lo realiza una proteasa del hospedador dando lugar a la única proteína de la cápside, la proteína core (C) y a las proteínas de la envoltura E1 y E2, y a una proteína de función desconocida llamada p7 (Gráfico 3)

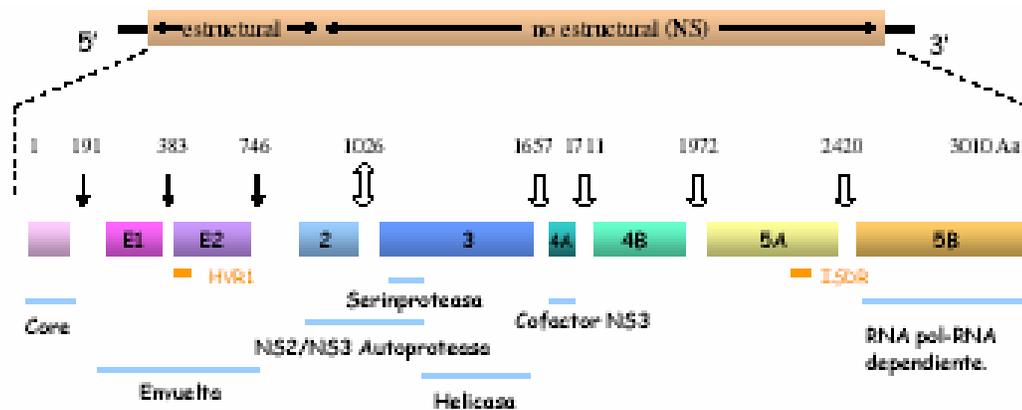


Gráfico 3.-Representación esquemática de la poliproteína del VHC (Bartenschlager y cols,2000). Los cortes realizados con la proteasa del hospedador se representan con ↓ los realizados por la autoproteasa NS2-NS3 con ⇄ y los realizados con la proteasa NS3 con ↴

II.3.3.-Ensamblaje viral y liberación

Se piensa que el ensamblaje del VHC debe iniciar con la interacción de la proteína Core con el RNA. Esta unión parece que, de alguna forma, es un

mecanismo que funcionaría como un interruptor: apagando el proceso de traducción/replicación y encendiendo el de ensamblaje. La nucleocápside adquiere la envoltura mediante gemación al salir del retículo endoplásmico y finalmente, el virión es liberado por el Aparato de Golgi hacia el citoplasma de la célula para salir por exocitosis (Blight KJ, Kolykhalov A, and Rice MC,2000).

II.4.-Diversidad Genética del VHC.-De entre los virus de interés en patología humana, el virus de la hepatitis C es uno de los virus con un mayor grado de diversidad genética que se han estudiado hasta el momento. La heterogeneidad genética que presenta puede ser intragenoma, dando lugar a las cuasiespecies víricas, e intergenómica, que da lugar a los genotipos y subtipos.

La elevada cinética de replicación viral y la baja fidelidad de la enzima responsable de la replicación (la RNA polimerasa dependiente de RNA) son los dos principales factores que explican la elevada variabilidad genética de este virus. El virus tiene una vida media de 2.5 h en sangre y existe una alta producción diaria de partículas virales (10^{12}) en los pacientes con infección crónica; la cinética de replicación viral es, por lo tanto, superior incluso a la del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además, la enzima que se encarga de la replicación del VHC, tiene una tasa de error aproximada de 10^{-4} . y una probabilidad de mutación doble de 10^{-11} , lo que se traduce en la producción diaria de, aproximadamente, 3.300 virus distintos y explica que la población que infecta a un individuo sea una mezcla muy heterogénea de genomas muy relacionados entre si, con una homología superior al 98 % y que se denominan cuasiespecies, las cuales son responsables de la variabilidad intragenoma (Kato M,2001; McOmish F, Yap PL, Dow BC,2004).

Recientemente, un equipo de investigadores estimó que el virus parenteral del que se originaron todas las variantes que hoy existen apareció hace, al menos, 2000 años. Si aplicamos los datos de cinética de replicación, de tasa de error de la enzima y de probabilidades de mutación, podremos entender, como es que en todos estos años, se seleccionaron variantes tan diversas con un grado de

diferencias en el ácido nucleico suficiente como para hablar no solo de variantes dentro de un mismo genoma, sino de variaciones intergenoma.

La variabilidad intergenoma dió lugar a los conceptos de genotipo, subtipo y aislado. Se denominaron genotipos a aquellos genomas con una homología entre el 66-69%; se designan con un número arábigo y hasta el momento, se han descrito 6 genotipos mayores y hasta 11 genotipos distintos. Dentro de un mismo genotipo, se definió a los subtipos cuando el grado de homología es de 77 a 80% y se designan con una letra, que seguirá al número que lo nombra. Hasta la fecha se han descrito más de 100 subtipos distintos. Dentro de un mismo subtipo, se designó como aislado a aquellos genomas en los que el grado de homología no es superior al 91-95% (Ver Gráfico 4).

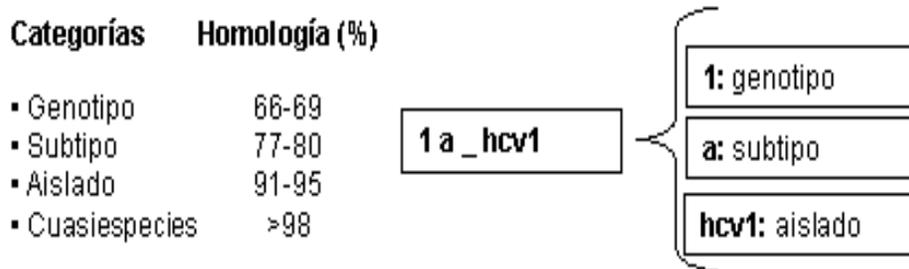


Gráfico 4. Homología y nomenclatura de las variantes del VHC (Kato M,2001; McOmish F, Yap PL, Dow BC,2004).

Aunque existe discrepancia con respecto a la influencia del genotipo en la historia natural de la enfermedad, es el factor que más influye en la respuesta al tratamiento antiviral. Así, los pacientes infectados con genotipos 2 y 3 responden más rápidamente y tienen tasas de respuesta sostenida dos o tres veces superiores a las de los infectados por el genotipo 1 (Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T,2002).

II.5.-Formas de transmisión

II.5.1.-Receptores de sangre y derivados

Antes de 1986 la incidencia de hepatitis C post-transfusional se situaba ente el 5-13%, Sin embargo, al iniciarse en 1990, el estudio de marcadores serológicos

de VHC en donadores de sangre, la incidencia de hepatitis post-transfusional disminuyó hasta hacerse menor de un 1%. Parece que dicha incidencia de la infección por VHC post-transfusional está directamente relacionada con el número y cantidad de productos sanguíneos recibidos (Esteban, JI, López-Talavera JC, Genesca J,2001; Memon, MI,2002).

II.5.2.- Usuarios de drogas vía parenteral

Las personas con abuso de drogas vía parenteral no sólo tienen la mayor prevalencia de infección por VHC, sino que constituyen un potencial reservorio del virus en la comunidad. La prevalencia varía entre el 31 y el 98%, según la localización geográfica mundial. La prevalencia de la infección aumenta de forma proporcional a la duración del abuso de drogas (Des-Jarlais DC, Friedman SR, Novick DM, Sotheran JL, Thomas P, Yankovitz, SR, 2003).

II.5.3.-Tatuajes y perforaciones

En cuanto a la perforación de los lóbulos de las orejas y otras partes del cuerpo, la acupuntura y el tatuaje, han sido indicados como posibles factores de riesgo de hepatitis, si el equipo utilizado está contaminado (McOmish F, Yap PL, Dow BC,2004).

II.5.4.- Riesgo en personal sanitario

El riesgo de adquirir la infección por VHC tras un pinchazo accidental es bajo, en torno a un 2%. Los grupos de alto riesgo incluyen entre otros, a cirujanos, ginecólogos, personal de hemodiálisis, laboratorio y de urgencias. Se recomienda mantener las medidas de precaución estándar o universales como medida de prevención de la infección por VHC. Si ocurre un pinchazo accidental, el uso de inmunoglobulinas o profilaxis antiviral no está recomendada, pero es importante que tanto al individuo fuente como al expuesto se les realicen pruebas para detección de anticuerpos contra el VHC. Si el individuo fuente es anti-VHC positivo se recomienda realizar pruebas para detección de RNA del VHC a la persona expuesta en el momento de la exposición y de nuevo a las 2 a 8 semanas

posteriores al pinchazo. Si existe seroconversión y/o se demuestra la positividad del RNA del VHC en el individuo expuesto, se recomienda remitir al médico especialista para su valoración (McOmish F, Yap PL, Dow BC,2004).

II.5.5.- Transmisión sexual

La transmisión sexual de la hepatitis C es objeto de controversia y probablemente supone menos del 5% de los casos. Los factores de riesgo son: la promiscuidad sexual, las relaciones con prostitutas, el intercambio sexual rectal y las relaciones sexuales traumáticas. Estudios en parejas casadas indicaron un riesgo mayor de transmisión al cónyuge a medida que se prolonga la duración del matrimonio. Se ignora si este riesgo es secundario a transmisión sexual y falta determinar el papel potencial de compartir los enseres del hogar, las hojas de afeitar y los cepillos de dientes (Bresters D, Mauser-Buschoten EP, Reesink HW,2003).

II.5.6.-Transmisión vertical

La transmisión perinatal del VHC de niños nacidos de madres positivas a anticuerpos contra el VHC ocurre en aproximadamente un 2% de los casos. Cuando una mujer embarazada es positiva a RNA del VHC, el riesgo se incrementa hasta un 4-7%. La coinfección materna por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un factor de riesgo para la transmisión vertical, elevando hasta el 20% el riesgo de transmisión del VHC. Investigadores italianos describieron recientemente una disminución del riesgo de transmisión perinatal de hepatitis C en el parto por cesárea comparado con el vaginal. Los niños nacidos de madres infectadas por hepatitis C pueden tener inicialmente anticuerpos positivos contra hepatitis por transferencia pasiva a través de la placenta. Este anticuerpo puede estar presente durante todo el primer año de vida, para luego desaparecer. Por lo tanto, para determinar si existe infección por hepatitis C en el recién nacido, es necesario demostrar la positividad del RNA del VHC en el niño. La lactancia natural por madres con hepatitis C parece segura y

no se han descrito casos de transmisión del virus a los recién nacidos (Ohto H, Terazawa S, Sasaki N,2004).

II.5.7.- Otros grupos de riesgo

Los adictos a drogas vía oral, al ser comparados con los adictos por vía parenteral tienen menor incidencia de infección por VHC. Dado que con frecuencia se comparte el material en consumidores de cocaína vía nasal, se ha observado que hay mayor incidencia del VHC, por lo que ésta, es considerada como una posible vía de transmisión del VHC (Simo R, Hernández C, Genesca J, Jardí R, Mesa J,2002).

Otro grupo de alto riesgo de infección por hepatitis C incluye a personas que recibieron concentrados de factores de coagulación antes de 1987, personas sometidas a hemodiálisis y pacientes receptores de trasplante de órgano sólido o de médula ósea antes de 1992. La contaminación de las membranas de ultrafiltración puede explicar la elevada tasa de infección por hepatitis C observada en algunas unidades de diálisis (Aguilar JC, Portero F, Sanz C, Martín JE, Daza R,2005).

Aunque en México se desconoce la frecuencia real de la vía de transmisión del VHC, se estima que la principal causa es la transfusional seguida por la drogadicción endovenosa y el medio familiar y finalmente por procedimientos médicos y quirúrgicos (Ver Tabla I).

Transfusión sanguínea	70 %
Drogadicción endovenosa Contactos sexuales Medio familiar Otros grupos no identificados	25 %
Trabajadores de la salud Trasplante de órganos	5 %

Punciones contaminadas	
------------------------	--

Tabla 1.-Factores de riesgo de transmisión de VHC identificados en México (Terrés-Speziale AM,2003).

II.6.-Cuadro Clínico

Es difícil precisar la historia natural de la hepatitis C debido a la falta de datos prospectivos, la imposibilidad de determinar el momento de inicio de la enfermedad y la influencia de numerosos cofactores que conducen a su progresión.

La hepatitis aguda por virus C se caracteriza por presentar un cuadro clínico leve e inespecífico y el diagnóstico generalmente pasa inadvertido. Sin embargo se dan casos agudos inmediatos al contagio por VHC asociados a situaciones en las que el inóculo es grande, como en una hepatitis postransfusional, o en casos de inmunosupresión (Palafox-Zaldivar A,2001; Memon MI, Memon MA,2002).

Este cuadro clínico agudo por VHC, consiste en malestar generalizado, ictericia y a menudo fiebre, con una elevación marcada de las enzimas hepáticas, lo cual se relaciona con una mayor probabilidad de eliminación posterior del virus, ya que se considera que este cuadro es el resultado de una respuesta inmune vigorosa, que permite que la infección sea resuelta en aproximadamente un 15 a 25% de los individuos infectados (Memon MI, Memon MA,2002).

Entre un 75-85% de los pacientes infectados desarrolla una hepatitis crónica. Estos pacientes tienen la enfermedad y además la pueden contagiar a los demás, y de éstos, entre el 15 y 20 % pueden desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular (Palafox-Zaldivar A,2001).

Tong y colaboradores encontraron un intervalo medio de 20 años desde el momento de la infección hasta el desarrollo de la cirrosis y un intervalo medio de 28 años desde el momento del diagnóstico y el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Puig et al,2000).

Las manifestaciones clínicas de la infección crónica por VHC son muy inespecíficas y consisten en cansancio crónico, dolor muscular y articular menor y cambios en el rendimiento intelectual y emocional. Sin embargo, la mayoría de los casos de hepatitis C se diagnostican en pacientes asintomáticos que no recuerdan haber padecido una hepatitis aguda, es común que el diagnóstico de hepatitis C se haga cuando las personas van a donar sangre o cuando se realizan algún análisis de rutina (Esteban JI, López-Talavera JC, Genesca J,2001).

Dentro de los factores que parecen influir en la velocidad de progresión de la hepatitis C a cirrosis, se incluyen; el consumo de alcohol, la edad en el momento de la exposición, el sexo y la coinfección con hepatitis B o con VIH (Planko et al,2000).

En la actualidad, la hepatitis C y la hepatopatía relacionada con ella, son la primera causa de muerte no asociada a Sida en pacientes con VIH (Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, Clotet B, Sánchez-Tapia JM, Rodes J, Saiz JC, Martínez MA,2000).

El VHC cambia frecuentemente, evadiendo la respuesta inmune humoral y celular, por lo que provoca una estimulación constante de los Linfocitos T y B. Es un virus considerado como hepatotrópico y linfotrópico, sin embargo, también puede asociarse a manifestaciones y síndromes extrahepáticos (Vega RI, León RA, Zolezzi RP,2001).

II.7.-Diagnóstico

La evaluación diagnóstica de este padecimiento es muy compleja, dado que las señales más características de la hepatitis no siempre son visibles, por lo que se deben incluir pruebas en sangre, tanto para evaluar funcionamiento hepático, como pruebas serológicas para determinar antígenos y anticuerpos contra el virus y las pruebas confirmatorias que incluyen ensayos de diagnóstico molecular (Lisker-Melman M, Cote Ch,2004).

Las pruebas para evaluar funcionamiento hepático incluyen la detección de niveles de las enzimas Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO), Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP), Bilirrubinas y Fosfatasa Alcalina, así como los niveles reducidos de albúmina sérica (Esteban JI, López-Talavera JC, Genesca J,2001).

II.7.1.-Diagnóstico Serológico

El diagnóstico Serológico de la Infección por el VHC, es de dos tipos:

Detección de Anticuerpos.- Son pruebas que detectan anticuerpos frente a diferentes antígenos constitutivos del virus o frente a proteínas producidas en su proceso de replicación. Su positividad indica que el paciente estuvo o está infectado por el virus.

La variedad de proteínas producidas durante el proceso de replicación del virus, produce una respuesta serológica muy variada frente a él, la detección de anticuerpos frente al core (antígeno c22-3) y c-100-3, son los primeros en aparecer en los cuadros de primoinfección. Un resultado positivo indica exposición al VHC. (Terrés-Speziale AM,2003).

Detección de Antígenos.- Son pruebas que detectan componentes del virus y su positividad es una expresión cierta de la presencia del VHC.

Las pruebas serológicas representan una buena opción en el diagnóstico de la hepatitis C, (ANTI-VHC ELISA 2 y 3), pero son pruebas preliminares que aún presentan problemas de especificidad y sensibilidad, por lo que deberá indicarse una confirmación de las mismas con otras pruebas que nos ofrezcan mayor confiabilidad, como la de detección de ANTI-VHC por pruebas recombinantes de inmunoabsorción (RIBA II y III) y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar el RNA del virus, aumenta mucho la sensibilidad diagnóstica y permite la detección temprana de la infección, hasta una semana después del contagio. La PCR detecta casos no reactivos, y además confirma los

casos positivos reales, descarta los falsos positivos en las pruebas preliminares y también los casos reactivos débiles e Indeterminados (Terrés-Speziale AM,2003).

A.-Detección de Anticuerpos

A.1.-Inmunoensayo enzimático (EIA)

Los primeros ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para anti-VHC detectaban anticuerpos contra una única proteína antigénica recombinante (c-100-3), correspondiente a una pequeña porción carboxiterminal de la proteína codificada por el gen NS3 y a la mayoría del producto codificado por NS4.

Estas pruebas de primera generación (EIA-1) permitieron acumular una enorme cantidad de información sobre la epidemiología de la infección y su empleo para la detección de anticuerpos redujo la incidencia de hepatitis postransfusional de tipo C en alrededor de un 80%. Las pruebas de EIA-1, sin embargo, carecían de la suficiente sensibilidad y además resultaban muy inespecíficas en grupos de baja prevalencia, con una frecuencia de falsos positivos entre 30 y 70 % en donadores de sangre voluntarios.

Los inmunoensayos de segunda generación (EIA-2) representaron un notable cambio en la sensibilidad al incluir además del c-100-3, proteínas recombinantes correspondientes a zonas más inmunógenas como el core (c22-3) y el producto completo de la región NS3 (c33c). En algunos EIA-2 comerciales los antígenos c33c y c-100-3 están combinados en una única proteína recombinante (c200), lo que aumenta la cantidad de antígeno presente en la fase sólida de la prueba.

Los inmunoensayos de tercera generación (EIA-3). incorporan parte de la proteína codificada por la región NS5, mientras que los antígenos correspondientes a la proteína del core y de NS4 están presentes en forma de proteínas recombinantes o como péptidos sintéticos. Los EIA-3 son más sensibles que los anteriores, el incremento en sensibilidad se debe a la optimización de los

antígenos presentes en los EIA-2 y no a la incorporación de la proteína de NS5 (Ver Gráfico 5).

El cribaje de donantes de sangre mediante EIA de segunda y tercera generación prácticamente ha eliminado la hepatitis postransfusional por VHC, aunque presentan algunas limitaciones:

a) El intervalo entre infección y seroconversión (periodo de ventana) oscila entre 9 y 10 semanas para EIA-2 y entre 6 y 8 semanas para EIA-3, lo que ha dado lugar a casos aislados de hepatitis C postransfusional a partir de donantes infecciosos en periodo de ventana.

b) Resultados falsos negativos en pacientes inmunodeficientes o bajo terapia inmunosupresora con infección por VHC.

c) Resultados falsos positivos o indeterminados en grupos de bajo riesgo como los donadores de sangre (Castro BF,2001).

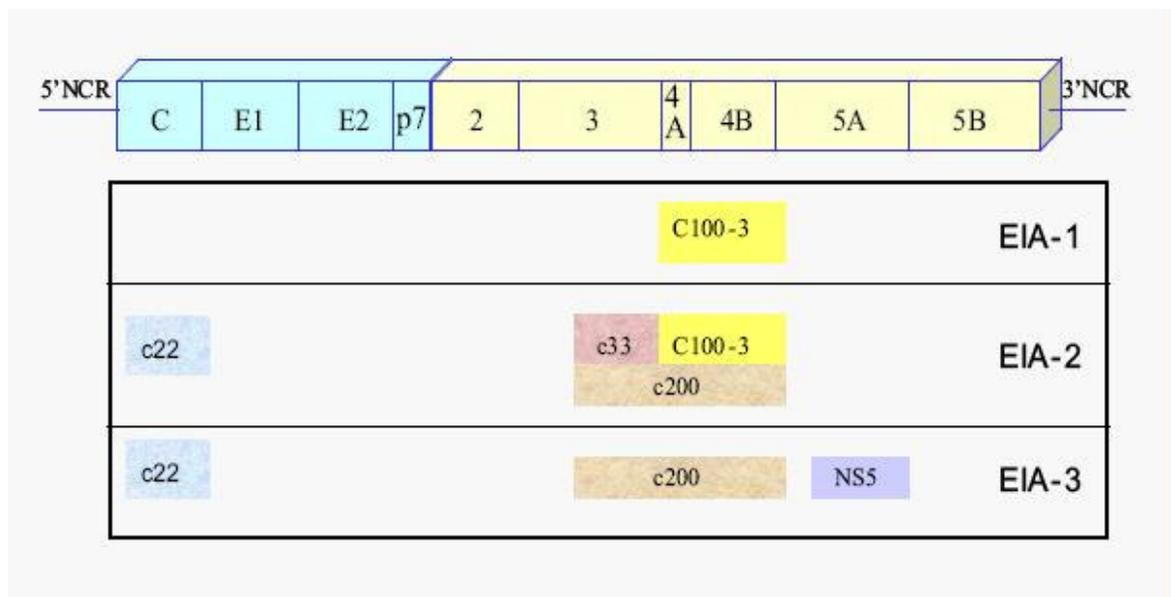


Gráfico 5.-Representación de los antígenos del VHC utilizados en cada versión del ensayo inmunoenzimático (EIA).

A.2.- Pruebas recombinantes de inmunoabsorción (RIBA III)

La asociación de un factor de riesgo percutáneo para infección por VHC con niveles elevados de TGP en un individuo anti-VHC positivo por EIA-2 o EIA-3 es indicativa de infección activa por VHC. En estos casos está indicado una prueba para RNA viral en suero antes de comunicar el resultado y establecer potenciales consejos terapéuticos.

Para los donadores de sangre de bajo riesgo o individuos sin factor de riesgo percutáneo y transaminasas normales, se han desarrollado pruebas suplementarias para confirmar la especificidad del resultado de EIA. Las pruebas suplementarias son pruebas recombinantes de inmunoabsorción (RIBA III) en las que, sobre un soporte de nitrocelulosa se han fijado por separado antígenos recombinantes o mezclas de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos. El Inmunoblot (RIBA III VHC SIA. Chiron Corp. Emeryville, CA), consiste en una tira de nitrocelulosa a la que se han fijado en forma de bandas separadas las proteínas recombinantes NS5, c200 y c22, además de dos niveles de control de Inmunoglobulina G humana (IgG). Tras la incubación, la fijación de anticuerpos a cualquiera de los antígenos prefijados en la tira se demuestra por un simple ensayo inmunoenzimático colorimétrico. Una muestra es positiva cuando reacciona contra al menos dos antígenos distintos del VHC, indeterminada cuando hay reactividad frente a un solo antígeno y negativa cuando no reacciona frente a ninguno (Castro BF,2001).

Un resultado positivo en RIBA III se correlaciona estrechamente con la presencia de viremia e infecciosidad y lesión histológica hepática tanto en donadores de sangre como en grupos de alto riesgo.

La proporción de resultados indeterminados en RIBA III es inferior al 5 % en pacientes inmunocompetentes con hepatitis crónica C, pero hasta del 35 % en donadores de sangre voluntarios. Los resultados de RIBA III se resumen como sigue:

a) Prácticamente todas las reactividades aisladas frente a NS5 en RIBA III corresponden a falsos positivos.

b) Dependiendo de la prevalencia de infección por VHC en la población general de un área determinada, una proporción variable de indeterminados frente a core o NS3, reflejan la presencia de anticuerpos específicos contra dichos antígenos, lo que puede confirmarse mediante pruebas moleculares.

c) A pesar de confirmarse la especificidad de los anticuerpos detectados, la mayoría de los donadores de sangre con patrón indeterminado en RIBA III parecen haberse recuperado de la infección por VHC, ya que el RNA viral únicamente se detecta, a título muy bajo (10^2 - 10^3) en alrededor del 20 % de los casos y solo en la minoría de los que presentan viremia persistente puede evidenciarse lesión hepática histológica de hepatitis crónica.

d) Las pruebas suplementarias tienen muy poco valor en pacientes inmunodeficientes de alto riesgo (hemodializados, drogadictos, positivos al VIH, etc.) ya que en estos, los resultados RIBA III indeterminados o negativos se acompañan de viremia detectable y hepatitis crónica por VHC (Castro BF,2001).

B.-Detección de Antígenos

Recientemente se desarrolló un inmunoensayo enzimático fluorescente que detecta y cuantifica antígeno del core del VHC en el suero de los pacientes con infección activa. Dicha prueba, que utiliza dos anticuerpos monoclonales de alta afinidad contra péptidos del core, es muy específico y capaz de detectar el equivalente a 10^4 - 10^5 viriones por ml, demostrando una excelente correlación con los niveles de viremia detectados mediante técnicas moleculares. Esta técnica podría reemplazar o complementar a los métodos moleculares para estimar la carga viral y monitorear el tratamiento antiviral (Castro BF,2001).

II.7.2.-Estudios Moleculares

Estos estudios están dirigidos a:

1. Detectar el genoma viral (presencia de ácidos nucleicos específicos (RNA del VHC).
2. Cuantificación de ácidos nucleicos.
3. Genotipificación viral.

1.-Detección del genoma viral

En la actualidad la técnica más aceptada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) debido a su alta sensibilidad, este método está diseñado para amplificar exclusivamente DNA. En la infección por VHC es necesario transformar previamente el RNA del virus en DNA (cDNA) para amplificarlo posteriormente. La prueba puede realizarse en suero o sangre total mezclada con Etilen diamin tetra acetato de potasio (EDTA), conservadas a 4 °c hasta 48 horas y si se desea una conservación más prolongada deberán mantenerse a -20 °c ya que los ácidos nucleicos pueden degradarse con las nucleasas presentes en la muestra.(Kato M,2001).

2.-Cuantificación Viral

Después de detectada la presencia del ácido nucleico viral, es importante la cuantificación de la viremia ya que se correlaciona con el avance de la infección, asimismo es un marcador de la eficacia de la terapia antiviral permitiendo cambios oportunos en el manejo de la misma con un mayor beneficio clínico (Negro F, Glostra E, Krawczynski K, Quadri R, Rubbia L, Mentha G,2000).

Otra implicación importante en cuanto a la determinación de la carga viral está indicada en la transmisión perinatal de la hepatitis C, la cual se produce aproximadamente en el 3% al 5% de los lactantes nacidos de madres infectadas (Shehab S,2001).

3.-Determinación del genotipo del VHC

La Genotipia del VHC ha adquirido en los últimos años una mayor relevancia clínica y epidemiológica no solamente por el impacto que puede tener sobre la historia natural de la enfermedad y como predictor de respuesta al tratamiento con interferón, sino también como una ayuda para identificar la fuente de infección.

El conocimiento del genotipo del VHC es fundamental para implementar el tratamiento adecuado ya que aporta datos sobre la posible respuesta al mismo y también se relaciona con la infección persistente del VHC y su progresión hacia formas más graves como son cirrosis y carcinoma hepático. Se sabe que el genotipo 1b es el peor respondedor al tratamiento porque se acompaña de cargas virales muy elevadas, por lo que se requieren esquemas terapéuticos más prolongados para lograr una respuesta viral sostenida (RVS) en el paciente y evitar la progresión a enfermedad hepática más severa mientras que el genotipo 3a tiene un mejor pronóstico, por su rápida respuesta a la terapia antiviral.

También el genotipado es útil en estudios epidemiológicos cuando se intenta establecer la prevalencia de los diferentes genotipos en una determinada población (Zein NN,2000).

Existen diferentes procedimientos para su determinación:

- Secuenciación: es una técnica de gran efectividad puesto que determina la secuencia de nucleótidos del virus infectante. Se analizan las diferencias en las regiones Core y NS5.
- PCR utilizando iniciadores específicos para cada genotipo. Es un método desarrollado por Okamoto y colaboradores para determinar los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b y, posteriormente, el 3a. El uso de iniciadores específicos para cada tipo es un método sencillo para identificar los genotipos ya que se puede resolver en un gel de agarosa, identificando cada tipo por la longitud de los productos obtenidos o bien por PCR en tiempo Real (qPCR). Las regiones estudiadas pueden ser: NS5, 5'UTR, Core/E1 y Core.
- Digestión de los productos amplificados mediante enzimas de restricción: RFLPs (polimorfismo longitudinal de los fragmentos de restricción). Es una técnica compleja cuyo principal inconveniente es detectar con irregularidad el genotipo 1b, el subtipo 2c y otros subtipos de los grupos 3,4,5 y 6. La zona amplificada y estudiada es la 5' UTR.

- La hibridación sobre membranas de nylon (LIPAS) del RNA del VHC, aislado y amplificado con sondas de oligonucleótidos específicas para cada genotipo viral, es rápido, define los principales genotipos y permite identificar en la misma prueba, infección por más de un genotipo. La zona amplificada y analizada es la 5' UTR.

II.7.3.-Algoritmo de Estudio Viroológico (Serología-Biología Molecular)

El tamizaje debe realizarse con una prueba de EIA-3. En caso de que la prueba de ELISA sea negativa (no reactivo), si el caso clínico lo justifica o presenta transaminasas elevadas (TGO y TGP) en el enzimograma, si se trata de población de alto riesgo, o existe sospecha de infección aguda, se solicitará una PCR cualitativa para detección del RNA del VHC. Si la PCR es negativa, el paciente se considera no infectado.

En caso de que la prueba de ELISA sea positiva (reactivo), deberán realizarse estudios confirmatorios como RIBA III que es una técnica más específica. El estudio confirmatorio será informado como positivo, negativo o indeterminado, indicándose en el informe, la técnica que se utilizó. Si el confirmatorio es indeterminado o positivo independientemente del enzimograma y la biopsia, se solicitará PCR. Si la PCR es negativa, se solicitará una nueva PCR al mes y a los seis meses (Robbins DJ, Pasupuleti V, Cuan J, Chiang CS,2000).

En caso de población inmunocomprometida si el EIA-3 dió negativo, aún con confirmatorio negativo por RIBA III, si existe sospecha de infección por VHC, se sugiere realizar PCR, si el resultado es negativo se deberá repetir al mes y a los seis meses.(Ver Gráfico 6)

Si la PCR es positiva, se recomienda solicitar carga viral y genotipo a los pacientes que van a recibir tratamiento (Robbins DJ, Pasupuleti V, Cuan J, Chiang CS,2000).

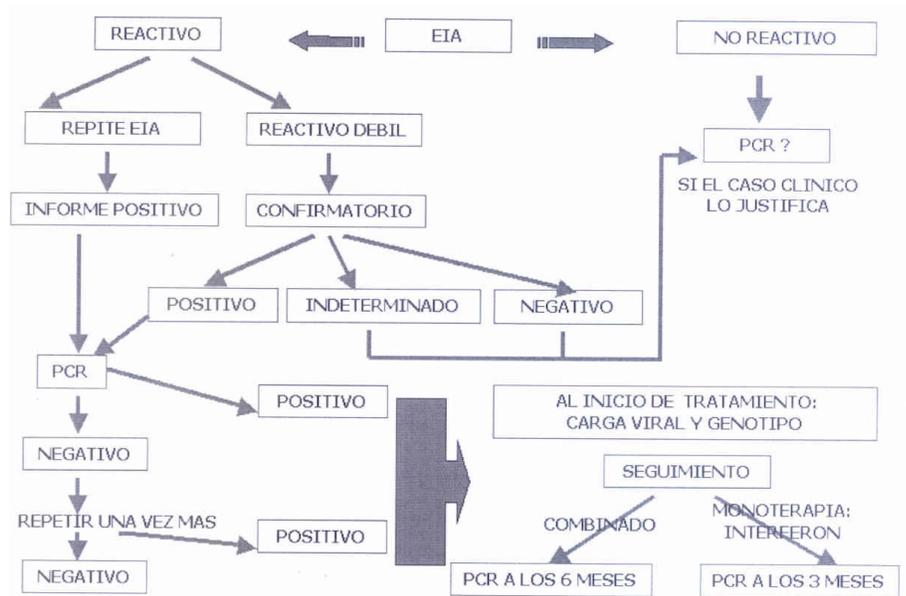


Gráfico 6.- Algoritmo de Estudio Viroológico en la infección por VHC (Chiang CS,2000).

III.-JUSTIFICACIÓN

La infección por el Virus de la Hepatitis C afecta aproximadamente entre el 10 a 30 % de la población mundial y constituye una de las principales causas de enfermedad hepática crónica. Se estima que más del 70 % de los individuos que se infectan progresan a daño hepático crónico, 20 % desarrollan cirrosis y un porcentaje similar, carcinoma hepatocelular (20 %), con una remisión de un 15 % (Van der Poel CL, Cuyper HTM, Reesink HW et al,2001).

La Hepatitis C es considerada como un grave problema de Salud Pública a nivel Mundial. A principios del tercer milenio, se reportan 200 millones de personas infectadas por el virus de la Hepatitis C en todo el mundo, lo que representa que cerca del 3.3 % de la población mundial se encuentra en riesgo de desarrollar las

complicaciones crónicas de esta enfermedad, lo cual refleja la importancia de este padecimiento por encima inclusive de otros de etiología viral tan graves como el SIDA y la Hepatitis B (Armstrong GL, Simard EP, Wasley A,2004).

En Europa Occidental se estima una prevalencia de 0.1 a 0.2 %, con valores de 3 a 6 % en algunas regiones tropicales de la zona del Mediterráneo. En Estados Unidos se reporta una frecuencia de 1.4 %, lo cual representa un valor de 3.5 millones de personas afectadas y 700,000 en Francia (1.2%). En América del Sur la prevalencia es inferior a 1.9 %. La prevalencia más alta del mundo se localiza en África del Norte, específicamente Egipto y es de 25 % (Word Health Organization,2002).

En México, está establecido que la hepatitis C es la principal causa de hepatitis postransfusional y responsable de al menos un 20 % de hepatitis aguda esporádica (Faye-White E, Garfein RS, Brouwer KC, Lozada R, Ramos R, Fiirestone-Cruz M, Pérez SG, Magis-Rodríguez C, Conde-Glez CJ, Strathdee AS,2007).

De acuerdo con la encuesta nacional de salud realizada por el Instituto Nacional de Salud Pública de México, publicada en el 2005, en base a un estudio realizado en población abierta en todo el país, se reportó una prevalencia de seropositivos a anticuerpos contra el VHC, de 1.4 % (IC:95% 1.1-1.6%) y detección positiva de RNA del virus, en 0.49 % (Valdespino JL, Olaiz G., Conde C, et al,2005).

Otros estudios realizados en México, señalan que la prevalencia de seropositivos a VHC oscila entre 2.1 % en personal médico y 13.6 % en pacientes con hepatopatía crónica. En el caso de donadores de sangre, se reporta un rango de seropositividad de 0.2-2 % (Palafox-Zaldivar A,2001).

Existen datos estadísticos que reportan en el Estado de Monterrey una prevalencia de 0.08 % en donadores y un rango de 0.27 a 0.82 % en un estudio

realizado en localidades del Estado de Jalisco en una población de 3702 donadores de sangre por un periodo de 2 años (Terrés-Speziale AM,2003).

En otros estados de la República Mexicana, se reportan los siguientes datos de donadores seropositivos; en Zacatecas 0.2%, en Aguascalientes 0.7 %, 1.2 % en el Distrito Federal , 1.3 % en Yucatán y 2 % en el Centro Médico la Raza (Terrés-Speziale AM,2003).

La epidemiología del VHC está basada en la tasa de cambios de sus secuencias nucleotídicas, a partir de modelos matemáticos, el primer ancestro común del VHC se remontaría a más de 2000 años, la divergencia de genotipos a 500 años, y las diferencias entre 1a y 1b a 300 años (Kato,2001).

En este momento existe una gran diversidad geográfica que se explicaría por los movimientos poblacionales, el uso de drogas por vía parenteral y la contaminación por transfusiones sanguíneas. Los genotipos más repartidos son el 1, 2 y 3, responsables de la mayoría de los casos de hepatitis C en Europa occidental, Estados Unidos de América (EUA) y Japón. El genotipo 4 es más frecuente en Africa del Norte, Central y Oriente Próximo. El genotipo 5 predomina en África del Sur, y del 6 al 11 en el sudeste asiático. Se debe hacer hincapié en la importancia de la variabilidad de los genotipos según los grupos de riesgo, por ejemplo son más frecuentes los genotipos 1a y 3a en los usuarios de drogas por vía parenteral (Zeinn NN,2000).

En una revisión de tres estudios epidemiológicos realizados en México para determinar genotipos del VHC, se encontró una coincidencia en la prevalencia de los mismos, ya que se reporta que el genotipo I es el más frecuente en población mexicana (n=413) con un porcentaje del 72 %, del cual corresponde al genotipo Ib el 40 % y un 17 % para el genotipo Ia, con respecto al genotipo II, un 18 % y 9.8% para el genotipo III.

Recientemente se ha producido un importante avance en el conocimiento de la coinfección VIH-VHC, que comprende los aspectos epidemiológicos,

viroológicos, interacciones entre ambas patologías y hepatotoxicidad por antirretrovirales en estos enfermos. Datos recientes procedentes de la cohorte EuroSIDA, señalan que la prevalencia global de la coinfección VIH-VHC en Europa es del 34%, y es más alta en los países del este y sur de Europa (47.7 y el 44.9%, respectivamente).

La historia natural de ambas infecciones cambia completamente cuando coexisten el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) y el de la hepatitis C (VHC). Entre los hallazgos de mayor relevancia en los estudios realizados para explicar tal influencia podemos mencionar:

- La activación inmune persistente ocasionada por el VHC puede facilitar la transcripción del VIH en los linfocitos T, por lo tanto la apoptosis de los linfocitos de sangre periférica, en la población coinfectada con VIH-VHC, es mayor que en los pacientes mono-infectados (Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Camie J, Heeren T, Koziel MJ,2000).

- Efecto negativo de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), e incremento de la toxicidad hepática de la misma (Sulkowski MS, Mast EE, Seeff LB, Thomas DL,2000).

- La hepatitis por VHC evoluciona a la cronicidad con mayor probabilidad en pacientes con VIH (Marco M,2000)

- Menor respuesta de células CD8+ específicas anti-VHC (Mir J, Fleming C, Steger K,2000).

- Se acelera la progresión a fibrosis y cirrosis hepática en los pacientes coinfectados con VIH-VHC (Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez – Barcons M, Sirera G, Tural C, Clotet B, Sánchez-Tapia JM, Rodes J Saiz JC, Martínez MA,2000).

Frente a la elevada asociación de la coinfección VIH-VHC, el compartir vías de transmisión y la cada vez mayor tasa de incidencia de estas infecciones virales, resulta pertinente la investigación acerca de este tema, para orientar el diagnóstico y tratamiento en población considerada de alto riesgo.

IV.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Estado de Baja California no se han realizado estudios para determinar cuales son los genotipos predominantes del VHC en población de pacientes positivos a VIH-SIDA que son atendidos en el Hospital General de Tijuana (ISESALUD), por lo que se desconoce el comportamiento epidemiológico de la coinfección VIH-VHC en esta población considerada de alto riesgo, no se llevan a cabo pruebas de tamizaje que permitan evaluar factores de riesgo asociados a la prevalencia de esta infección, así como posibles formas de transmisión y el riesgo de evolución a hepatopatía crónica, lo que condiciona a empeorar la calidad de vida de estos pacientes.

V.-OBJETIVOS

V.1.-Objetivo General

Determinar la prevalencia de Genotipos del Virus de la Hepatitis C (VHC) y su asociación con variables epidemiológicas y factores de riesgo de transmisión y evolución a hepatopatía en una población de pacientes positivos a VIH-SIDA atendidos en Servicios Especializados del Hospital General (ISESALUD) de Tijuana, B.C.

-

V.2.-Objetivos Específicos

- Conocer la prevalencia de Coinfección de VHC en la población estudiada.

- Relacionar variables epidemiológicas como la edad, el sexo y la ocupación de los pacientes con la prevalencia de positividad al VHC.
- Determinar asociación de factores de transmisión como; tatuajes, uso de drogas intravenosas y transfusiones con infección activa por el VHC.
- Conocer el riesgo de evolución a hepatopatía que tienen los pacientes con coinfección VIH-VHC.
- Determinar la correlación que existe entre las pruebas serológicas (ELISA) y las pruebas moleculares (RT-PCR), su sensibilidad y valor predictivo para el diagnóstico de infección activa por VHC.
- Proponer las pruebas moleculares (qPCR para cuantificación y genotipificación del VHC) para confirmación de casos de infección activa por VHC y para monitoreo de terapia antiviral.

VI.-METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio descriptivo observacional de tipo transversal, el grupo de estudio incluyó pacientes confirmados para VIH-SIDA de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión; pacientes confirmados para VIH-SIDA atendidos en los Servicios Especializados del Instituto de Servicios de Salud (ISESALUD) en Tijuana, B.C., ser mayor de edad, aceptar las condiciones del estudio a través de la firma de carta de consentimiento tener disposición para responder al interrogatorio incluido en el estudio, ser ambulatorio y estar en buen estado de salud general (Anexo 3) El formato de consentimiento (Anexo 2) fue aprobado por el Comité de Ética del propio grupo especializado en la atención de estos pacientes. Se realizó un muestreo aleatorio simple, que representó el 33.5 % de la población total de pacientes (n=400).. El muestreo incluyó 134 muestras. Se comparó con un grupo control (n=49) en el que se incluyeron adultos jóvenes aparentemente sanos, con la característica común de no ser seropositivos a VIH-SIDA. Se calcularon Prevalencias de seropositividad a VHC y prevalencias de exposición a factores de riesgo, proporciones, medidas de tendencia central y dispersión. Se midió la

magnitud de la asociación de los factores considerados de riesgo a través de la razón de momios para la prevalencia (RMP; IC 95%). Para el análisis bivariado, se evaluó la significancia estadística mediante la Chi cuadrado de Pearson y razón de verosimilitud e intervalos de confianza a 95%. y para la comparación de las variables cuantitativas se utilizó la medida direccional simétrica d de Somers (IC 99%). El Análisis multivariado se llevó a cabo por regresión logística no condicional. El manejo de datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 15.

Límites del Estudio:

LUGAR: Servicios Especializados del Hospital General.
(ISESALUD) de Tijuana, B.C.

TIEMPO: Noviembre del 2007 a Febrero del 2008

ESPACIO: 134 pacientes positivos a VIH-SIDA

VI.1.-Muestreo

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio que incluyó 134 muestras, las cuales se obtuvieron por punción venosa con jeringa y sistema vacutainer en tubo con separador para plasma, el cual se separó y se dividió en dos porciones de aproximadamente 1.5 ml. y se etiquetaron para su conservación.

VI.2.-Clasificación

Las muestras se clasificaron de acuerdo al tipo de Prueba a efectuar en el estudio:

2.1.-Plasma congelado a -70°C . para realizar la prueba de inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección de anticuerpos frente al VHC (ELISA-Ortho VHC 3.0).

2.2.-Plasma congelado a -70°C para realizar extracción de RNA del virus de la Hepatitis C para su genotipificación.

VI.3.-Recopilación de datos

La recopilación de datos se llevó a cabo de acuerdo al formato correspondiente, (Anexo 1) en el que se incluyeron datos generales del usuario como son: edad, sexo, ocupación, tiempo de diagnóstico de VIH-SIDA, tiempo de tratamiento, factores de riesgo de transmisión, factores de riesgo de hepatopatía y enfermedades asociadas.

Entre los factores de riesgo asociados a transmisión, se consideraron; los tatuajes, el uso de drogas intravenosas, las transfusiones sanguíneas y en el rubro de otros, se incluyó la transmisión esporádica y la vía sexual.

Los factores de riesgo de evolución a hepatopatía incluyeron; el consumo de alcohol, el tratamiento con antirretrovirales y las hepatitis.

VI.4.-METODOLOGÍA DE LABORATORIO

VI.4.1.-Diagnóstico Serológico

La técnica inicial para detección de población seropositiva al VHC es la de ELISA de tercera generación. Se utilizó el reactivo de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado que es un inmunoensayo enzimático cualitativo para la detección de anticuerpos frente al VHC (anti-VHC) en el suero o plasma humanos, que utiliza como fase sólida pocillos revestidos con antígenos recombinantes codificados para el virus de la hepatitis C. La tecnología ELISA utiliza el principio de que los antígenos o los anticuerpos que se fijan a la fase sólida pueden detectarse mediante un anticuerpo o antígeno complementario marcado con una enzima capaz de actuar sobre un sustrato cromogénico. Al aplicar dicho sustrato enzimático, la presencia de antígeno o anticuerpo puede detectarse por el desarrollo de un producto colorido.

El reactivo de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado utiliza tres antígenos codificados recombinantes del virus de la hepatitis C. Los

tres antígenos recombinantes, desarrollados por Chiron Corporation, son el c22-3, el c200 y el NS5, que son proteínas que se derivan de las regiones core, NS3, NS4 y NS5 del genoma del VHC y que hacen más eficaz a la prueba para identificar pacientes con hepatitis C aguda, o crónica. Además, el uso de estas proteínas adicionales permite una detección más temprana de la seroconversión que sigue a la infección por VHC. Aunque la respuesta de los anticuerpos a los antígenos codificados en la región NS5 no son tan prevalentes en respuesta a una infección por VHC, como los antígenos codificados en la región core y NS3, la adición de NS5 a las proteínas c22-3 y c200 en ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado permite la detección de anticuerpos frente a un mayor número de epítomos codificados del VHC. El organismo huésped de las tres proteínas recombinantes del VHC es *Saccharomyces. cerevisiae* (levadura).

En la tabla 2, se describe el número de secuencia de los aminoácidos que conforman a cada uno de los antígenos.

Antígenos	Número de Secuencia en la poliproteína
C22-3	2-120
C200	1192-1931
NS5	2054-2995

Tabla 2.-Número de secuencia de aminoácidos de los tres antígenos proteicos del VHC utilizados en la Prueba de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado.

Principio del Procedimiento

El procedimiento del ensayo es una prueba en tres etapas que se lleva a cabo en un pocillo recubierto con una combinación de antígenos recombinantes del virus de la hepatitis C; c22-3, c200 y NS5.

En la primera etapa, se incuba una muestra de plasma o suero en el pocillo de ensayo durante un tiempo específico. Si la muestra contiene un anticuerpo reactivo a alguno de los tres antígenos, se formarán complejos antígeno-

anticuerpo en la superficie del pocillo. Si no hay anti-VHC, no se formaran los complejos. Las proteínas séricas o plasmáticas no fijadas se eliminarán en la siguiente fase de lavado.

En la segunda etapa, se añade al pocillo un anticuerpo monoclonal murino conjugado a peroxidasa de rábano. El conjugado se fija específicamente a la porción IgG humana de los complejos antígeno-anticuerpo. Si no existen complejos antígeno-anticuerpo, el conjugado no fijado se eliminará en el siguiente lavado.

En la tercera etapa, se añade al pocillo del ensayo un sistema de detección de enzimas consistente en o-parafenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno. Si hay conjugado fijado, el OPD se oxidará dando un producto de color amarillo. En esa reacción, la peroxidasa inicialmente es oxidada bivalentemente por el peróxido de hidrógeno para formar un compuesto intermedio que oxida al OPD. A continuación se añade ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N, para detener la reacción. La forma oxidada resultante de OPD es de color naranja y presenta un máximo de absorbancia a 490 nm – 492 nm.

La intensidad del color dependerá de la cantidad de conjugado fijado y está, por lo tanto, en función de la concentración de anti-VHC presente en la muestra. La intensidad del color se mide con un lector de microplacas (fotómetro) diseñado para medir la absorbancia de luz de un pocillo.

En la tabla 3 se hace una descripción de los reactivos utilizados en la prueba de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado.

Abreviaturas del etiquetado	Kit de 192 pruebas Código de producto 930820	Kit de 480 pruebas Código de producto 930800	Descripción del componente
VHC	2	5	Microplaca recubiertas con antígeno codificado del virus de la hepatitis C (VHC) (c22-3, c200 y NS5 recombinantes) (96 pocillos cada una)- c22-3, c200 y NS5 derivados de levadura.
CON	1 frasco	1 frasco	Conjugado: Anticuerpo a IgG

	(55 ml)	(125 ml)	humana (monoclonal murino)-anti-IgG humana de cadena pesada (monoclonal murina) conjugado a peroxidasa de rábano picante con estabilizantes de proteínas bovinas. Conservantes: ProClin™ 300 al 0.1%
SD	1 frasco (70 ml)	1 frasco (190 ml)	Diluyente de la muestra-solución salina en tampón fosfato con estabilizantes de proteínas bovinas. Conservantes: 2-cloroacetamida al 0.1%
OPD	1 vial (30 pastillas)	1 vial (30 pastillas)	Pastillas OPD-Contiene o-fenilenediamina * 2HCl
SB	1 frasco (190 ml)	1 frasco (190 ml)	Solución sustrato-citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno al 0.02% Conservadores: 2-cloroacetamida al 0.1%
PC	1 vial (1,2 ml)	1 vial (1,2 ml)	Control positivo (humano) Origen: Suero o plasma humano tratado fotoquímicamente conteniendo anti-VHC y no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), ni anticuerpos frente a los virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) Conservantes: azida sódica al 0.2 % y EDTA al 0.9%
NCal	1 vial (1,8 ml)	1 vial (1,8 ml)	Calibrador negativo (humano) Origen: Suero o plasma humano no reactivo para HbsAg, no anticuerpos frente a VIH-1, VIH-2 y VHC. Conservantes: azida sódica al 0.2 % y EDTA al 0.9%
	21	21	Adhesivos para microplacas, desechables

Tabla 3.-Reactivos utilizados en la prueba de ORTHO VHC 3.0 ELISA Test System SAVE Potenciado.

PREPARACION DE REACTIVOS

1. **Preparación de la Solución de lavado (1x):** Mezclar 50 ml de la solución de lavado concentrado 20x con 950 ml de agua destilada o desionizada. La solución de lavado (1x) es estable durante 30 días a temperatura ambiente. Para guardarlo durante más tiempo (hasta 60 días), debe conservarse entre 2 a 8°C. Indicar en el recipiente la fecha de preparación de la solución de lavado (1x) y la fecha de caducidad y desecharlo si se ve que está claramente contaminado.

NOTA: Para preparar este reactivo, puede utilizarse cualquier lote de concentrado de la solución de lavado 20x siempre que se encuentre dentro de los límites de caducidad de la etiqueta.

2. **Preparación de la solución de sustrato.** Deben utilizarse recipientes limpios de plástico o cristal. Antes de finalizar la segunda incubación, transferir suficiente cantidad de sustrato a un recipiente, protegiendo el contenido de la luz. Disolver completamente el número apropiado de pastillas OPD en el buffer sustrato antes de su uso. La solución de sustrato es estable durante 60 minutos después de añadir las pastillas OPD cuando se mantiene a temperatura ambiente en la oscuridad, y en el momento de utilizarla, deberá ser incolora o de color amarillo muy pálido. Debe indicarse la hora en que las pastillas OPD se añaden a la solución sustrato y el plazo de caducidad en el recipiente. Si en el momento de la preparación presenta un color marcadamente amarillo, se debe desechar y preparar más solución sustrato según se requiera.

Materiales:

1. Micropipeta multicanal ajustable que pueda dosificar 50 µl y 200 µl con una precisión de al menos $\pm 5\%$ o un dispensador de reactivos equivalentes.

2. Micropipeta de canal único fija o ajustable que pueda dosificar de 20 μl a 30 μl con una precisión de al menos $\pm 5\%$ y 200 μl a 300 μl con una precisión de al menos $\pm 5\%$ o un pipeteador-diluidor equivalente.
3. Puntas de pipeta de 5 μl a 300 μl desechables o equivalentes.
4. Pipetas de serología de los tamaños apropiados y probetas graduadas.
5. Reservorio para micropipeta multicanal o un recipiente para reactivo equivalente.
6. Lavador de microplacas multicanal capaz de dispensar y aspirar al menos 300 μl por pocillo.
7. Lector de microplacas de doble longitud de onda con capacidad de lectura a 490 nm con filtro de referencia de 630 nm. En caso de utilizar un instrumento que no tenga filtro de referencia, las áreas en la parte inferior de los pocillos que estén opacas, tengan arañazos o sean irregulares pueden dar lugar a lecturas elevadas. El intervalo lineal del lector de microplacas debe ser como mínimo de 0 a 2.5 unidades de absorbancia.
8. Incubador (Seco ó húmedo) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Agua destilada o desionizada.
10. Hipoclorito sódico (NaClO) al 5.25%.
11. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4N – Para determinar la idoneidad de un ácido de origen distinto, preparar la solución sustrato en la forma descrita en preparación de reactivos. Dispensar 200 μl de solución sustrato a tres pocillos y después añadir 50 μl de H_2SO_4 4N para ensayar en cada pocillo. Leer los pocillos a una longitud de onda de 490 nm con un filtro de referencia de 630 nm a las “0” horas y a los “60 minutos”. Todos los valores de absorbancia en cada intervalo de tiempo deben ser iguales o menores que 0.050.
12. Tiras de pocillos no recubiertos.
13. Buffer de lavado concentrado 20x.
14. Agitador de microplaca de velocidad variable, optativo.

Procedimiento de la prueba – Incubación ESTANDAR

1. Aproximadamente 30 minutos antes de iniciar el procedimiento, deben sacarse los componentes del kit para que alcancen la temperatura ambiente (15 a 30 °C), invertir los reactivos varias veces evitando que formen espuma. Comprobar la temperatura del incubador; mantenerlo a 37 °C ± 1 °C.
2. Determinar el número total de pocillos que se necesitan para el ensayo. Además de las muestras, en cada microplaca se incluye un reactivo en blanco, tres calibradores negativos y dos controles positivos. Los pocillos no utilizados deben conservarse entre 2 °C y 8°C con desecante, en la bolsa de aluminio en que se suministran, fuertemente sellada y pueden utilizarse antes de 42 días a partir de su apertura.

Pueden hacerse pruebas que no ocupen una microplaca completa siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

- Las tiras de pocillos de microplacas diferentes se pueden mezclar para formar una microplaca completa o parcial siempre que sean del mismo lote, estén dentro de la fecha de caducidad indicada en la bolsa y procedan de microplacas que con anterioridad han demostrado una respuesta adecuada a controles o calibradores del reactivo.
- Al formar una microplaca que contenga tiras procedentes de una microplaca, recién abierta y no analizada con anterioridad, las tiras deben recibir el complemento completo de controles o calibradores del reactivo.

ATENCIÓN: manipular las tiras de pocillos con cuidado. No tocar la superficie exterior inferior de los pocillos.

3. Las tiras de pocillos deben estar niveladas en el soporte.
4. Preparar un registro (mapa de la microplaca) que identifique la colocación de los controles, calibradores y muestras en los pocillos. Disponer todos los controles siguiendo una configuración en fila (horizontal) o en columna

(vertical) en la forma que se indica a continuación. La configuración depende del programa informático utilizado.

Pocillo	1A	Reactivo en blanco
		Calibrador negativo
		Calibrador negativo
		Calibrador negativo
		Control positivo
		Control positivo

5. Comprobar que el equipo dispensador manual está ajustado. Después de dispensar las muestras, los calibradores y los controles, inspeccionar visualmente los pocillos, un cambio de color de verde a azul indica que se ha añadido al pocillo la muestra, calibrador o control. Si no se produce cambio de color, el resultado de la muestra, calibrador o control debe considerarse nulo o debe realizarse una nueva prueba.

Dispensar las muestras, calibradores o controles a los pocillos de la siguiente manera:

A. Dispensación directa de la muestra:

1. Añadir 200 μ l de diluyente de la muestra a todos los pocillos, incluidos el 1A.
2. Añadir 20 μ l de los controles, calibradores o muestras de los pocillos apropiados.
3. Si los controles, calibradores y muestras se han dispensado manualmente, asegurarse de que el contenido de los pocillos se mezcle perfectamente. Se puede utilizar un agitador de microplacas o el mezclado manual; mediante una pipeta o cualquier otro procedimiento equivalente. En el caso de utilizar un agitador, este deberá utilizarse a velocidad lenta a moderada para evitar salpicar el contenido de los pocillos del ensayo.
4. Limpiar cuidadosamente la humedad de la parte inferior de las tiras de pocillos con un paño de lino suave y absorbente antes de la lectura.
- 5.- Leer la microplaca a una longitud de onda de 610 nm. No se

necesita filtro de referencia. Poner el lector en blanco en el pocillo 1A.

Cada control, calibrador o muestra debe dar un valor igual o mayor que 0.315. Si un pocillo tiene un valor inferior a 0.315, el resultado del control, calibrador o muestra debe anularse y realizarse una nueva prueba. Cubrir el soporte de la tira de pocillos con adhesivo para microplacas. e incubar a 37 °C durante 30 minutos ± 1 minuto.

6. En caso necesario, nivelar las tiras en el soporte y con un lavador de microplacas, aspirar y lavar todos los pocillos cinco veces con buffer de lavado 1x y finalmente invertir la microplaca y dar un golpe firme sobre una toalla de papel seca para eliminar el exceso de buffer.
7. Añadir 200 µl de conjugado a todos los pocillos, incluido el 1A. Leer la microplaca a una longitud de onda de 490 nm. No poner el lector en blanco en el pocillo 1A.
8. Cada control, calibrador o muestra debe dar un valor igual o mayor que 0.700. Cubrir el soporte de la tira de pocillo con un adhesivo para microplacas nuevo e incubar a 37 °C ± 1°C durante 30 minutos ± 1 minuto.
9. Después de la segunda incubación, lavar los pocillos y añadir 200 µl de solución de sustrato a todos los pocillos, incluido el 1A. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos ± 1 minuto.
10. Añadir 50 µl de H₂SO₄ 4N a todos los pocillos, incluido el 1A. Para garantizar un mezclado apropiado, el ácido debe añadirse con fuerza en un chorro regular. En caso necesario, golpear suavemente la microplaca o utilizar un agitador para mezclar el contenido. Se debe tener cuidado de no salpicar el contenido de los pocillos de la prueba.

11. Leer la microplaca a una longitud de onda de 490 nm. (Ver Gráfico 8). **NOTA:** Las microplacas deben leerse antes de 60 minutos desde la adición del H₂SO₄ 4N. Las microplacas deben guardarse en la oscuridad hasta el momento de la lectura.

Procedimiento de control de calidad.

1. Criterios de aceptación del reactivo en blanco

Se considera que una microplaca es válida con respecto al reactivo en blanco si el valor de absorbancia del pocillo correspondiente al reactivo en blanco (pocillo 1A.) es menor de 0.050.

2. Criterios de aceptación del calibrador negativo

- a. Los valores individuales del calibrador negativo deben ser iguales o menores que 0.120. Si uno de los tres valores del calibrador está fuera de estos límites, deberá volver a calcularse la media de los calibradores negativos (NCalx) en base a los dos valores de calibrador aceptables. La microplaca no será válida y deberá repetirse la prueba si dos o más de los tres valores de calibrador están fuera de los límites.
- b. Determinar la media de los valores calibradores negativos (Ncalx).

Ejemplo:

Calibrador negativo	Absorbancia
1	0.005
2	0.015
3	0.010

$$Ncalx = \frac{\text{Absorbancia total}}{3}$$

$$Ncalx = 0.030 / 3$$

$$Ncalx = 0.010$$

3. Criterios de aceptación del control positivo

El control positivo se utiliza para verificar que los componentes del kit del ensayo tienen capacidad para detectar una muestra reactiva siempre que el procedimiento de la prueba se haya seguido estrictamente. Se considera que una microplaca es válida respecto del control positivo, si ambos controles positivos son iguales o mayores que el valor de corte y están dentro del intervalo lineal del lector de microplacas.

Calculo del valor de corte

$$\text{Valor de corte} = Ncalx + 0.330 \text{ (diferencia máxima entre los dos controles positivos)}$$

Ejemplo:

$$\text{Valor de corte} = 0.010 + 0.330$$

$$\text{Valor de corte} = 0.340$$

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

1. Se considerará que las muestras con valores de absorbancia menores que el valor de corte son no reactivas (Ver Gráfico 7).
2. Las muestras cuyo valor de absorbancia sea igual o mayor que el valor de corte se consideran inicialmente reactivas y deben volver a ensayarse por duplicado antes de proceder a su interpretación definitiva.

	1	2	3	4	5
A	Blanco 0,064	S-117 (1,327)	S-126 0,075	S-124 0,067	S-097 0,074
B	CN 0,068	S-112 0,078	S-133 0,074	S-134 (1,121)	S-098 0,066
C	CN 0,064	S-122 0,092	S-127 0,080	S-104 (0.845)	S-101 0,066
D	CN 0,096	S-113 0,104	S-129 0,095	S-102 0,106	S-099 0,085
E	CP 0,196	S-128 0,113	S-131 0,095	S-105 0,140	S-096 0,081
F	CP 0,184	S-125 0,060	S-132 0,065	S-103 0,057	S-118 0,068
G	S-116 0,068	S-123 0,066	S-130 0,066	S-100 0,058	S-119 0,071
H	S-114 (1,316)	S-120 (3,300)	S-115 0,064	S-121 (1,270)	

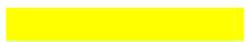
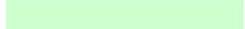
 POSITIVOS
 NEGATIVOS

Gráfico 7.-Lectura de Absorbancia Prueba Serológica ORTHO HCV 3.0 ELISA Test System SAVe Potenciado.

VI.4.2.-DIAGNOSTICO MOLECULAR

El proceso de detección de un agente infeccioso por amplificación del DNA o RNA se desarrolla de manera habitual en tres etapas:

1. PRIMERA ETAPA.-Consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica.
2. SEGUNDA ETAPA.-Se lleva a cabo la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo.
3. TERCERA ETAPA.-Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas.

1.-PRIMERA ETAPA

A.-PREPARACION DE LA MUESTRA.

Las muestras clínicas utilizadas fueron plasmas a partir de los cuales se aísla el RNA del VHC, primero se descongelan sin acelerar el proceso, se agitan por inversión y se procede a la extracción del RNA.

B.-EXTRACCION DE RNA

METODO DE QIAamp Viral RNA Mini Handbook

(Plasma, Suero, fluidos biológicos libres de células y sobrenadantes de cultivo celular)

FUNDAMENTO

Este método combina la propiedad de unión selectiva de los ácidos nucleicos (con un acarreador) a una membrana de sílica gel, lavados y elución del RNA.

Se lleva a cabo un proceso de lisis a la muestra bajo condiciones de desnaturalización para inactivar proteínas y ribonucleasas (RNAsas) y asegurar la óptima extracción del RNA. Se lleva a cabo una unión selectiva del RNA a una membrana de sílica gel, se eliminan los contaminantes realizando lavados con dos diferentes buffers y finalmente se eluye el RNA con un buffer especial libre de RNAsas.

DESCRIPCION:

1. La muestra es lisada bajo condiciones de desnaturalización para inactivar RNAsas y asegurar el aislamiento de RNA viral intacto.
2. Las condiciones del buffer son empleadas para favorecer la óptima unión del RNA a la membrana de sílica-gel al pasar la muestra a través de la columna.
3. El RNA queda unido a la membrana y los contaminantes son eficientemente lavados utilizando dos diferentes buffers.
4. Se recupera el RNA por elución con un buffer especial libre de RNAsas listo para conservarse o utilizarse.

MATERIAL

- Etanol (96-100%)
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml
- Puntas de pipeta libres de RNAsas , estériles y con filtro
- Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 a 2 ml
- Tubos de recolección de 2 ml
- Columnas Mini Spin QIAamp

REACTIVOS

- Buffer AVL
- Buffer AW1 Concentrado
- Buffer AW2 Concentrado
- Buffer AVE
- Acarreador RNA (Poly A)

PROCEDIMIENTO

Preparar el buffer de lisis con el acarreador de RNA y colocar 560 microlitros en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml.



Añadir 140 microlitros de plasma, suero, orina , etc.(libre de células)



Mezclar en vortex por 15 segundos y reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos



Añadir 560 microlitros de etanol y pasar a través de los tubos con filtro (sílica-gel)



Centrifugar a 8000 rpm por un minuto y eliminar el sobrenadante



Llevar a cabo dos lavados. El primero con 500 microlitros de AW1



Centrifugar a 8000 rpm por un minuto, eliminar sobrenadante



Segundo lavado con 500 microlitros de AW2



Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos y eliminar sobrenadante



Eliminar exceso de etanol y
cambiar el tubo receptor



Eluir con 40 microlitros del buffer AVE
Dos veces para obtener 80 microlitros del extracto y centrifugar
a 8000 rpm. durante un minuto.
Conservar a -20 °C

SEGUNDA ETAPA

PCR en Tiempo Real (qPCR).- En la búsqueda de una reacción que permitiera cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos al mismo tiempo que se realiza su amplificación, se desarrolló la qPCR, denominada en principio PCR cinética (Mackay IM, Arden KE, Nitsche A,2002).

En la qPCR, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores para llevar a cabo la qPCR incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la qPCR pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

En este caso utilizamos agentes intercalantes que son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el SYBR Green, fluorocromo muy empleado en qPCR.

Se añadieron controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de RNA (curva patrón) en la tanda de amplificación. Este sistema está adaptado a un programa informático que registra el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de DNA en cada ciclo y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (Ver Gráfico 8)

Para cada muestra se calculó el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo al que se le denomina punto de corte (C_p), con respecto a la señal de base.

El C_p es inversamente proporcional a la concentración inicial de DNA presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_p correspondientes se dibuja una curva patrón.

Interpolando en ella los valores de los C_p de cada muestra problema y de esta manera se determinó la carga viral inicial.

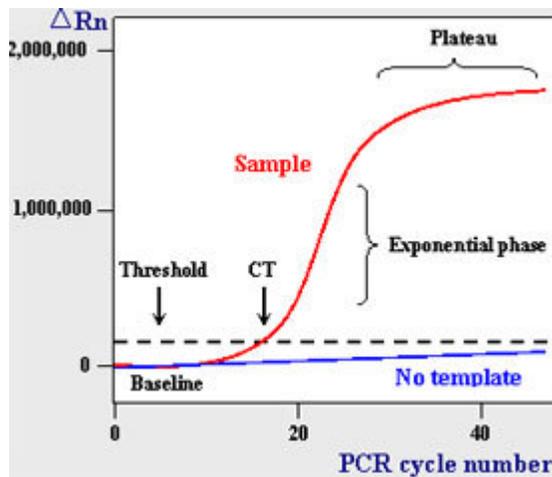


Gráfico 8.-Curva Patrón para cuantificación de carga viral qPCR

Ya que el RNA del VHC es de una sola hebra y es sensible al calor, se realizó una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de DNA (cDNA) de la hebra de RNA, el cual es estable al calor y puede resistir la metodología y se pueden obtener millones de copias de DNA por PCR.

Los pasos a seguir son:

- 1.-Unión del Iniciador a la secuencia de RNA objetivo.
- 2.-La transcriptasa inversa (RT) cataliza la extensión del Iniciador mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
- 3.-Se obtiene la hebra del cDNA complementario al RNA formándose así un híbrido RNA/DNA.
- 4.-El híbrido de RNA/DNA se separa mediante la actividad de ribonucleasas (RNAsa H) que digiere y desplaza al RNA, además de copiar la segunda hebra de cDNA. Se inactiva la transcriptasa reversa a 70 °C durante 15 minutos y posteriormente, con la acción de una DNA-polimerasa y la incorporación de dos nuevos iniciadores, se amplifica al DNA de doble cadena.

B.-METODOLOGIA DE RT-PCR

Se utilizó el reactivo de RT-PCR ImProm-II de Promega (Transcriptasa Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Amplificación (RT-PCR)

1.-Se prepara la Mezcla de Reacción (Master Mix) en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml sobre hielo. Se preparan 15 microlitros por cada muestra de reacción, se mezclan en vortex y se mantienen en hielo para su utilización.

Mezcla de Reacción	1x	15x
Agua destilada libre de nucleasas.	6.3	94.5
Buffer de Reacción 5X	4.0	60.0
Mgcl ₂ (Conc.final 1.5 mM)	1.2	18.0
dNTP* (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) Conc.f.0.5mM/dNTP	1.0	15.0
Inhibidor de Ribonucleasas(opc.)	0.5	7.5
Transcriptasa Reversa	1.0	15.0
Iniciador, Oligo (dT) ₁₅	1.0	15.0
Volumen Final	15.0 microlitros	225.0 microlitros

* dNTP; mezcla de desoxiribonucleótidos; desoxiadenin trifosfato, desoxicitidin trifosfato, desoxiguanosin trifosfato y desoxitimidin trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Control Negativo : No se adiciona la Transcriptasa Reversa.

Control Positivo : Muestra control positiva.

- 2.-Agregar alícuotas de 15 microlitros de la mezcla de reacción a tubos de 0.5 ml colocados en bloque de hielo. (Evitar contaminación)
- 3.-Agregar 5 microlitros del RNA extraído de cada una de las muestras (Previa descongelación).
- 4.-La alineación se logra a una temperatura de 25 °C durante 5 minutos.
- 5.-La Extensión se logra a 42 °C durante 60 minutos.
- 6.-Para proceder a la amplificación del cDNA por PCR, es conveniente inactivar la Transcriptasa Reversa lo cual se logra a 70 °C por 15 minutos.

C.-METODOLOGIA DE PCR

Fundamento de la Prueba.- La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos. El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de DNA que se quiere amplificar, para lo cual se debe someter a una temperatura de 94 °C. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.

A continuación se baja la temperatura para conseguir que cada iniciador se una a su región específica dentro de la cadena de DNA.

El último paso consiste en la acción de la DNA polimerasa. (Taq polimerasa de *Thermus aquaticus*) que permite la elongación de la cadena de DNA complementario.

Cada una de las moléculas de DNA hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 30 ciclos de reacción se pueden obtener millones de copias de una molécula de DNA.

PROCEDIMIENTO

1.-Preparar la Mezcla de Reacción en un tubo para Microcentrífuga de 1.5 ml colocados sobre hielo. Se preparan 25 microlitros por tubo de reacción, se mezclan en Vortex y se conservan en hielo.

Mezcla de Reacción	1x	15x
Agua libre de nucleasas	16.25	243.75
Buffer de reacción	2.5	37.5
Mgcl ₂ 25mM	1.95	29.25
dNTP 10mM	0.5	7.5
Iniciador 1 Sentido (conc.final 1mM)	1.65	24.75
Iniciador 2 Antisentido (conc.final 1mM)	1.65	24.75
Taq Polimerasa (5 u.)	0.25	3.75
Mezcla PCR	24.75	371.25
Vol Muestra (cDNA)	.25	3.75
Volumen Final	25 microlitros	375 microlitros

Secuencia del Iniciador 1: 5'-ATGGCTGCAGCTTCATATGATC-3'

Secuencia del Iniciador 2: 5'-CCACCTTGGTCCCAGATGAC-3'

2.- Se coloca la mezcla de reacción en el termociclador precalentado a 94 °C, se lleva a cabo la desnaturalización inicial (94 °C por 2 minutos) y se procede a la amplificación del cDNA, la cual se programa de la siguiente manera:

25 CICLOS

DESNATURALIZACION	94 °C por 1 minuto
ALINEACION	60 °C por 1 minuto
EXTENSION	72 °C por 2 minutos
EXTENSION FINAL	72 °C por 5 minutos

MANTENIMIENTO

4 °C

3.-Una vez finalizado el ciclo, se verifican los resultados de la carga viral del VHC, tomando como referencia a la curva tipo.

GENOTIPIFICACION DEL VHC

Un microlitro de muestra de la primera PCR (cDNA del VHC) se sometió a una segunda PCR bajo las mismas condiciones de reacción que para la cuantificación del RNA viral por qPCR pero con los iniciadores “sentido” y “antisentido” específicos para cada genotipo (Gráfico 9). Para comprobar que en este paso no se ha producido una contaminación utilizamos un segundo control negativo con agua.

Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

Genotipo 1a: 5'GCAACCTCGAGGTAGACGTC3'

Genotipo 1b: 5'GCAACCTCGTGGAAGGCGAC3'

Genotipo 2: 5'GCCCATCCCTAAAGATCGGCGCACCACTCG3'

Genotipo 3: 5'GCGCGTCGGAGCGAAGGCCG3'

Genotipo 4: 5'GCAACCCCGTGCGCGGCGCCAG3'

Genotipo 5: 5'GCAACCCCGTGCGCGGCGCCAG3'

Genotipo 6: 5'CCAGCCCAGAGGCAGGCGCCAA3'

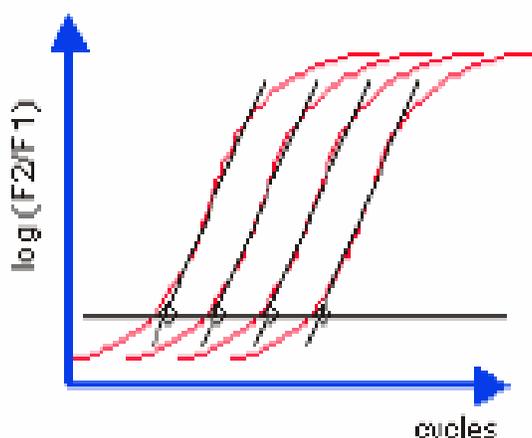


Gráfico 9.-Producto de amplificación del RNA del VHC, genotipos 1b.

VII.-DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados del estudio epidemiológico realizado por encuesta, reflejan un porcentaje de positividad para VIH, del 60 % para el género masculino, y 40 % para el femenino, con una clara tendencia en el mayor número de casos para el rango de edad de 31-40 años (41%) en el caso de los Hombres y de 20-30 años (17%) en el caso de las Mujeres (Tabla 4).

EDAD	N	%	MASCULINO		FEMENINO	
			N	%	N	%
< 20 Años	2	2	0	0	2	2
20-30 Años	31	23	15	11	16	12
31-40 Años	55	41	38	28	17	12
41-50 Años	29	21	17	13	12	9
>50 Años	17	13	10	8	7	5
			80	60 %	54	40 %

Tabla 4.-Variable de rangos de edad con respecto al Género en la población estudiada.

Con respecto a la frecuencia de casos de acuerdo a la ocupación de la población en estudio, se observa que el mayor porcentaje (33%) corresponde a los

Empleados, (Tabla 5) seguido muy de cerca de las amas de casa con actividades exclusivamente dentro del Hogar (28 %), lo cual puede reflejar un posible contagio por vía sexual , la mayoría (80 %) muy jóvenes (< de 25 años).

OCUPACION	N	%
DIFERENTES OFICIOS	23	17
EMPLEADOS	44	33
HOGAR	42	31
COMERCIANTE	13	10
PROFESIONISTA	2	2
OTROS	10	7

Tabla 5.- Frecuencia de casos de acuerdo a la ocupación de la población en estudio

En cuanto a la asociación del Tiempo de Diagnóstico y el Tiempo de Tratamiento se puede observar que la mayoría de los pacientes (64%) tienen un tiempo de diagnóstico entre 1-5 años e igualmente en cuanto al Tiempo de Tratamiento, el rango de 1-5 años fue el que prevaleció con un 52 % (Tabla 6).

TIEMPO DE DIAGNOSTICO	N	%	TIEMPO DE TRATAMIENTO	N	%
< 1 Año	17	12	< 1 Año	31	23
1-5 Años	72	54	1-5 Años	64	48
6-10 Años	29	22	6-10 Años	25	19
11-15 Años	11	8	11-15 Años	6	4
16-20 Años	5	4	16-20 Años	0	0
			Sin Tratamiento	8	6

Tabla 6.-Asociación entre el Tiempo de Diagnóstico y el Tiempo de Tratamiento para VIH en la población estudiada.

En lo referente a los posibles mecanismos de transmisión que pueden tener los pacientes tanto para VIH como para VHC, se consideraron las transfusiones sanguíneas (12 %), de las cuales el 100 % ocurrieron hace menos de 5 años, lo cual refleja el riesgo que aún existe en el tamizaje de la sangre en los bancos de sangre, y que es utilizada con fines transfusionales.

El 6 % manifestó el uso de drogas intravenosas como factor de riesgo y el 20 % tiene tatuajes únicos o diversos en su cuerpo, lo cual puede estar asociado a una posible transmisión de estas infecciones virales por esta vía (Tabla 7)

El mayor porcentaje de pacientes (57 %), manifestó no tener ninguno de los factores de riesgo de transmisión ya mencionados, es decir, no transfusiones, no drogas, no tatuajes, por lo que se consideran otras posibles formas de contagio entre las que pueden considerarse la vía sexual. Se descarta la de riesgo profesional dado que ninguno de los pacientes tiene un oficio, trabajo o profesión relacionado con el área de la salud (Tabla 7).

Entre los factores de riesgo de evolución a hepatopatía se consideraron el consumo del alcohol, el haber padecido algún tipo de hepatitis y el tratamiento con antiretrovirales, que también es un factor condicionante de inflamación hepática. Se determinó el porcentaje de pacientes con al menos, uno de los factores de riesgo (62 %), seguido de los pacientes con dos factores de riesgo (29 %), y los que tenían 3 factores de riesgo ocuparon el 3 %, considerando que el 6 % no presentaba ninguno de los factores de riesgo mencionados, (Tabla 7). Los resultados reflejan la evidente condición de predisposición a hepatopatía en estos pacientes ya que si consideramos a todos los pacientes con al menos un factor de riesgo, estos representan el 94 % de la población en estudio.

FACTORES DE RIESGO DE TRANSMISION	N	%	FACTORES DE RIESGO DE EVOLUCION A HEPATOPATIA	N	%
TRANSFUSION	17	13	NINGUNO	6	4
DROGAS	10	7	1	88	66
TATUAJES	33	23	2	35	26
OTROS	81	57	3	5	4

Tabla 7.-Porcentaje de factores de riesgo de transmisión de VIH-VHC y factores de riesgo de evolución a hepatopatía en la población estudiada.

Prevalencia de Coinfección VIH-VHC. Se determinó una prevalencia general de seropositivos a VHC de 7 % en la población en estudio (n=183), la prevalencia entre los expuestos (n=134 infección VIH-SIDA) fue de 10 % y de 2 % en los no expuestos (n=49), se obtuvo una razón de momios de prevalencia (RMP) de 5 y una Fracción Etiológica del 80%, Índice de Confianza (IC)=95 % , (4.57-5.36), lo cual demuestra que en esta población en estudio, la probabilidad de que un paciente con VIH-SIDA esté infectado con VHC es 5 veces mayor que en las personas negativas a VIH-SIDA (Tabla 8).

Análisis de datos para comparar dos poblaciones en estudio con la positividad a VHC.

Prevalencia de VHC entre los expuestos a VIH. $Pe = a/n1 = 13/134 = 10/100$

Prevalencia de VHC entre los no expuestos A VIH. $Pne = c/no = 2/47 = 2/100$

Razón de Momios de Prevalencia: $Pe/Pne = 10/2 = 5$

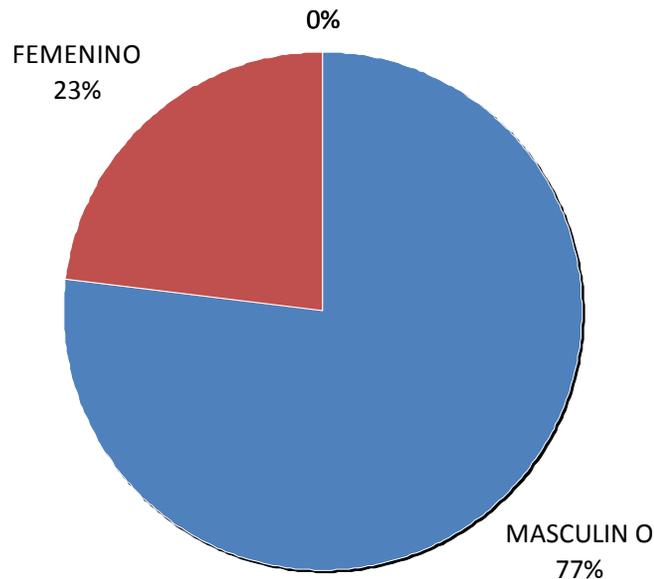
VIH	CASOS VHC	NO CASOS VHC	
EXPUESTOS	13a	121	134n1
NO EXPUESTOS	1	48d	49no
	14m1	169mo	N=183

Tabla 8.- Análisis de datos para comparar dos poblaciones en estudio con la positividad a VHC.

Estos resultados confirman la importancia de la transmisión del VHC en México, especialmente en una zona considerada de alto riesgo como lo es el Estado de Baja California y de manera preponderante en Tijuana, ya que considerando los datos informados en todo el país (Ruiz,A.,2006), esta ciudad fronteriza presenta características muy particulares que favorecen el flujo dinámico poblacional con el area de California en los Estados Unidos, con un incremento importante en el número de personas expuestas a esta infección, favorecida por la problemática socio-cultural en la que son evidentes los altos índices de drogadicción, prostitución y alcoholismo.

Variable de Sexo.-Se estimó una prevalencia del 79 % para el género masculino y el 21 % para el género femenino,(Ver Gráfico 10) la edad mínima fue de 31 y la máxima de 72 años, con una media general de 42 años (IC=95% 36-48), media de 39 años (IC=95% 14-63), para el caso de las mujeres y de 42 (IC=95% 35-50) para los Hombres (Tabla 9)

Gráfico 10.-Porcentaje de Coinfección VIH-VHC de acuerdo al Sexo

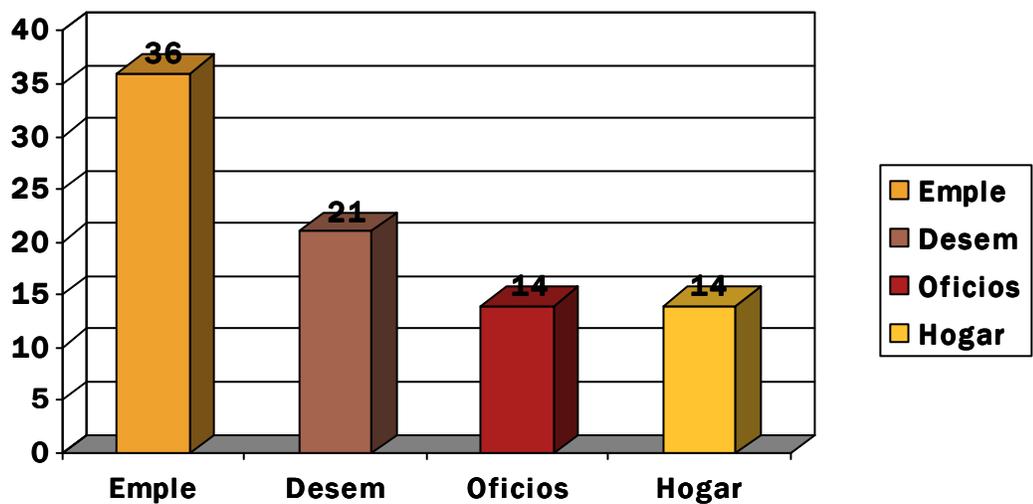


	MASCULINO	FEMENINO
Edad mínima	31	31
Edad máxima	72	50
Media	42	39
IC 95%	35-50	14-63

Tabla 9.-Variables de Edad en Coinfectados VIH-VHC de acuerdo al sexo.

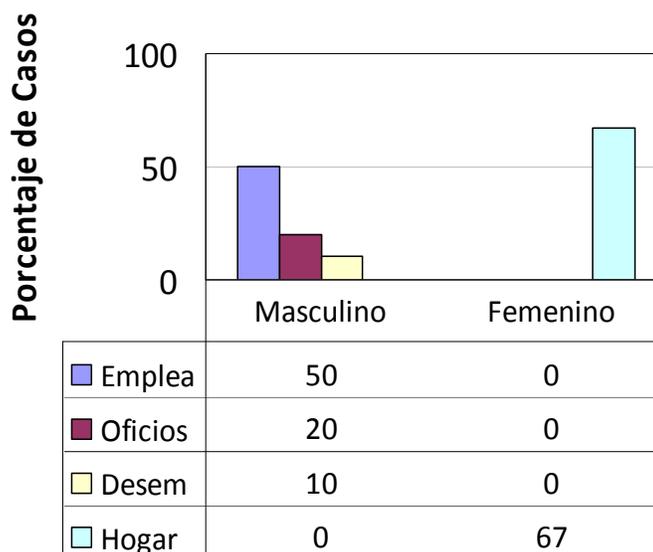
Variable de Ocupación.-En cuanto al tipo de ocupación de los pacientes seropositivos al VHC la mayor prevalencia fue para los empleados (36 %), seguida por los desempleados (21 %), las labores del Hogar y los Oficios con 14 % (Ver Gráfico 11).

Gráfico 11.-Porcentaje de Seropositivos a VIH-VHC de acuerdo a la Ocupación.



En el caso de los hombres la mayor prevalencia fue para los empleados con 50 %, y en el caso de las mujeres las que se dedican exclusivamente a las labores del Hogar con un 67 % (Ver Gráfico 12).

Gráfico 12.-Prevalencia de Coinfección VIH-VHC de acuerdo al sexo y la ocupación.



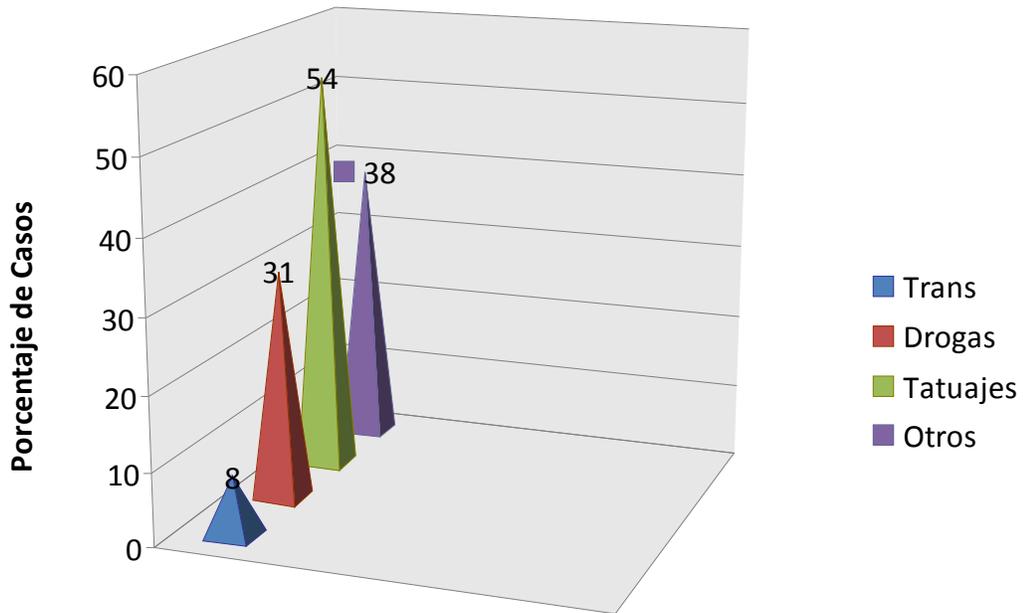
Variables de Tiempo de Diagnóstico (TD) y Tiempo de Tratamiento (TT). La media general del TD fué de 5 años (IC=95% 1.92-7.15) y de 3 años (IC=95% 0.86-5.85) para el TT, la mitad de los positivos se encontró con un TD por debajo de 2 años y de 1 año para el TD (Mediana, percentil 50). Por intervalos, la mayor prevalencia de TT se obtuvo para el periodo de 1-5 años (43 %). Para el TD, se encontró una prevalencia similar del 43 % para el rango de 1-5 años que también resultó ser el más elevado , Comparación con los de VIH (Tabla 10).

TIEMPO DE DIAGNOSTICO	VIH %	VIH-VHC %	TIEMPO DE TRATAMIENTO	VIH %	VIH-VHC %
< 1 Año	12	21	< 1 Año	23	21
1-5 Años	54	43	1-5 Años	48	43
6-10 Años	22	21	6-10 Años	19	21
11-15 Años	8	14	11-15 Años	4	7
16-20 Años	4	0	16-20 Años	0	0

Tabla 10.-Comparación de prevalencias de TD y TT en población con VIH y VIH-VHC.

Variable de Factores de Riesgo de Transmisión. El factor de riesgo asociado a transmisión con mayor prevalencia fue el de antecedente de Tatuajes (54 %), seguido de un 31 % para el uso de drogas intravenosas y 8 % para transfusiones, aunque también es importante considerar que el rubro de Otros, donde se puede considerar a la transmisión sexual o esporádica, presentó una prevalencia del 38 % (Ver Gráfico 13).

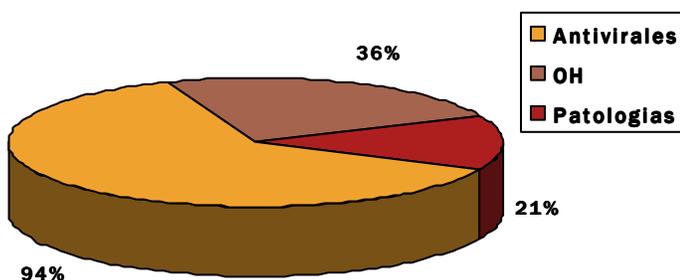
Gráfico 13.-Asociación de factores de riesgo de transmisión en pacientes con VIH-VHC



Variable de Factores de Riesgo de Evolución a Hepatopatía.

Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con antirretrovirales, el alcoholismo y el antecedente de padecimiento de hepatitis A y B, son factores de riesgo que favorecen la rápida evolución a hepatopatía grave (Bierhoff,E.,1997; Salmón,C.D.y cols.,2005; Szabo,G.y cols.,2006). Nuestros resultados reflejan un importante riesgo de evolución a Hepatopatía ya que el 94 % de los pacientes positivos a VIH-VHC, tienen al menos un factor de predisposición, entre los que se incluye el propio tratamiento antiretroviral, además de la ingesta habitual de bebidas alcohólicas y el haber padecido algún tipo de hepatitis (Ver Gráfico 14).

Gráfico 14.-Prevalencia de Factores de riesgo de evolución a hepatopatía en coinfección VIH-VHC



Análisis Bivariado.Variables Nominales.-Se obtuvo la razón de momios de prevalencia (RMP) para ambos sexos y se encontró que la probabilidad de infección para VHC es 3 veces mayor en el género masculino (RMP=1.451, IC=95 % 1.054-1.996) que en el género femenino (RMP=0.468 IC=95 % 0.168-1.299) (Cuadro 1). Con respecto a la ocupación, los desempleados tienen una RMP= 6 veces mayor que las amas de casa, 4 veces más que los comerciantes, 3 veces más que los que se dedican a diferentes oficios y el doble de los empleados.

En el caso de la edad, para el género masculino, el intervalo de 41-50 años resultó ser el doble de los que tenían > de 50 y 1.5 veces mayor que los de 31-40 años. Para el caso de las mujeres el intervalo con mayor prevalencia fue el de 31-40 años. No hubo diferencia significativa entre los tiempos de diagnóstico y tratamiento (Cuadro 1).

SEXO	RMP (IC95 %)
Femenino	1.4510 (1.054-1.996)
Masculino	0.468 (0.168-1.299)
EDAD (Años)	
< 20 Años	0
20-30 Años	0
31-40 Años	1.3923
41-50 Años	1.6501
>50 Años	0.5632
OCUPACION	
DIFERENTES OFICIOS	0.8321
EMPLEADOS	1.3930 (0.453-4.282)
HOGAR	0.3460 (0.074-1.623)
COMERCIANTE	0.7360
PROFESIONISTA	0
DESEMPLEADOS	2.0560 (0.397-10.638)
T.DIAGNOSTICO	
< 1 Año	1.6264
1-5 Años	0.8958
6-10 Años	0.9528
11-15 Años	0.8380
T.TRATAMIENTO	
< 1 Año	1.016
1-5 Años	0.8212
6-10 Años	1.2600
11-15 Años	1.7723
F.R.TRASMISION	
Transfusiones	0.6920
Drogas intravenosas	10.556 (2,690-41.425)
Tatuajes	1.3594
Otros	0.7120
FR.HEPATOPATIA	
0	2.7964
1	5.0268 (1.320-10.112)

Cuadro 1.-Factores de riesgo de coinfección VIH-VHC

Se comprobó asociación estadísticamente significativa de Coinfección VIH-VHC con el uso de drogas por vía intravenosa $p < 0.05$, Chi cuadrado=15.696 RMP=10.55 IC 95% 2.69-41.42 (Cuadro 2), con un riesgo 1.5 veces mayor para

las mujeres RMP=13.250 (IC=95% 0.818-214.616) que para los hombres RMP=8.714 IC=95% 1.775-42.792 (Cuadro 3).

El riesgo de transmisión por drogas por vía intravenosa es 15 veces mayor que por transfusión sanguínea. En el caso de los tatuajes $p < 0.05$, RMP= 3.28 1.06-10.17 (Cuadro 2). El riesgo de transmisión por tatuajes fue el doble para hombres con respecto a las mujeres, 3.675/1.792 (Cuadro 3).

Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios realizados en reclusos en México y en países Europeos (Saiz,P.,2005; González,C.M. y cols.,2006)

Es de llamar la atención el hecho de que los factores estadísticamente significativos encontrados en este estudio muestran que, aunque la prevalencia de coinfección es mayor en los hombres que en las mujeres, el índice de riesgo de transmisión asociada al uso de drogas intravenosas es mayor en mujeres que en hombres.

La mayoría de estas mujeres positivas a VHC con un importante riesgo de transmisión asociado al uso de drogas intravenosas, se dedican exclusivamente al hogar ($p < 0.05$) lo cual habla de una problemática social que se está modificando y en la que se involucran cada vez más las mujeres, con graves repercusiones para el entorno familiar y la salud emocional de cada uno de los miembros de una familia, especialmente en los niños y adolescentes, creándose un círculo en el que predominan el vicio, la delincuencia y por supuesto la promiscuidad, que fomenta la transmisión de infecciones de esta naturaleza.

	Chi cuadrado de Pearson (IC 95 %)	gl	p	Riesgo (IC 95 %)
SEXO	3.042	1	.081	.322 (.086-1.214)
OCUPACION				
Empleados	.337	1	.562	1.393 (.453-4.282)
Hogar	1.959	1	.162	.346 (.074-1.623)
Desempleo	.766	1	.381	2.056 (.397-10.638)
Oficios	.000	1	.990	1.010 (.207-4.915)
F.RIESGO TRANSMISION				
Drogas IV	15.696	1	.000	10.55 (2.69-41.42)
Tatuajes	4.620	1	.032	3.28 (1.06-10.17)
Transfusión	.117	1	.732	.692 (.083-5.76)
Otros	.504	1	.478	.667 (.217-2.052)

Cuadro 2.-Análisis Bivariado de factores de riesgo asociados a Coinfección VIH-VHC.

	Chi cuadrada (IC 95 %)	gl	Sigma	Riesgo IC 95 %
HOGAR				
FEMENINO	8.556	1	.003	12.000 (1.837-8.369)
MASCULINO				0
EMPLEADO				
FEMENINO				0
MASCULINO	2.864	1	.091	1.600(.935-2.737)
DESEMPLEADOS				
FEMENINO				0
MASCULINO	.636	1	.425	1.333(.962-1.848)
OFICIOS				
FEMENINO				0
MASCULINO	6.36	1	.425	1.333(.962-1.848)
DROGAS IV				
FEMENINO	5.115	1	.024	13.250(.818-214.61)
MASCULINO				8.714(1.77-42.79)
TATUAJES				
FEMENINO				1.792(.149-21.487)
MASCULINO	.217	1	.641	3.675(.987-13.677)
TRANSFUSIONES				
FEMENINO				0
MASCULINO	.365	1	.546	.986(.147-6.610)
OTROS				
FEMENINO				0
MASCULINO	1.665	1	1.197	.370(.101-1.357)

Cuadro 3.-Análisis Bivariado de factores de riesgo, asociados a Coinfección VIH-VHC, de acuerdo al sexo.

Variables Ordinales. El estadístico de contraste d de Somers demostró que la asociación de infección por VHC y la edad por intervalos es negativa (-0.98) estadísticamente significativa ($p < 0.05$) es decir a menor edad mayor riesgo de infección (Cuadro 4).

	d de Somers simétrica	T aproximada	p	(IC 99 %)
EDAD	-.098	-1.967	.049	.122-.139
T.DIAGNOS TICO	.032	.424	.672	.617-.642
T.TRATAMIENTO	.006	.081	.935	.925-.938

Cuadro 4.-Asociación de variables ordinales con infección por VHC

En el caso de las variables de Tiempo de Diagnóstico (TD) y Tiempo de Tratamiento (TT), no se demostró su asociación con la infección por VHC, $p > 0.05$ (Cuadro 4) y sin diferencia significativa entre el género femenino y el masculino ($p > 0.05$), con un Riesgo Relativo mayor para el Tiempo de Diagnóstico < 1 año, RMP= 1.62, IC 95% y el intervalo de de 11-15 años para el tiempo de Tratamiento, RMP= 1.77, IC 95%, (Cuadro1).

Análisis multivariado.-Los factores que permanecieron en el modelo multivariado final ajustado por los años de exposición del individuo (edad) y que se relacionan con la positividad a VHC fue la transmisión por drogas ya que se comprobó que existe una Relación lineal significativa , ($p < 0.05$) ver cuadro 5.

Variables	RMP	IC95 %	p
Drogas IV	8.033	1.910-33.784	.004
Tatuajes	2.147	.620-7.439	.228

Cuadro 5.-Factores de riesgo de coinfección VIH-VHC; Analisis Multivariado

Confirmación de Muestras Seropositivas para Coinfección VIH-VHC.

De las muestras positivas por Serología se confirmaron por RT-PCR el 73 %, El 6 % de las muestras confirmadas, correspondieron a resultados “indeterminados” en la prueba serológica lo que demuestra una sensibilidad del 90 % para la prueba serológica y un valor predictivo positivo (VPP) del 71 %, tomando como estándar de oro la confirmación con la Prueba Molecular RT-PCR (Cuadro 6).

Después de detectada la presencia del ácido nucleico viral, se llevó a cabo la cuantificación de la viremia ya que se correlaciona con el avance de la infección y permite decisiones terapéuticas con un mayor beneficio clínico. En nuestros resultados, la carga viral promedio fue de 1.697,814 UI, lo cual demuestra una evidente replicación del virus en estos pacientes, tal como lo reportado por otros autores (Castro,B.F.,2001; Zein,N.N.,2003).

Con respecto a la genotipificación, la forma 1b se reporta como el genotipo predominante en México (Terrés-Speziale,A.M.,2003; Zein,N.N.,2003; McOmish,F. y cols.,2004), el cual se reporta con una rápida evolución a hepatopatía grave y mayor resistencia al tratamiento con antiretrovirales. Nuestros resultados concuerdan con dichos reportes, ya que en el 100 % de las muestras positivas a VHC se identificó el genotipo 1b, lo cual demuestra el evidente riesgo de evolución a hepatopatía grave en estos pacientes.

Se confirmó una asociación estadísticamente significativa entre los valores de absorbancia obtenidos por la prueba serológica y la carga viral ($p < 0.05$) por la Prueba T y se demostró que esta asociación es negativa (Cuadro 7), a mayor respuesta inmune (Valores elevados de absorbancia en la prueba serológica, menor carga viral) ($p < 0.05$) estadístico d de Sommers (Gráfico 15), y se confirmó esta asociación con un modelo de regresión lineal ($p < 0.05$) considerando como variable predictora a la prueba serológica (Cuadro 8).

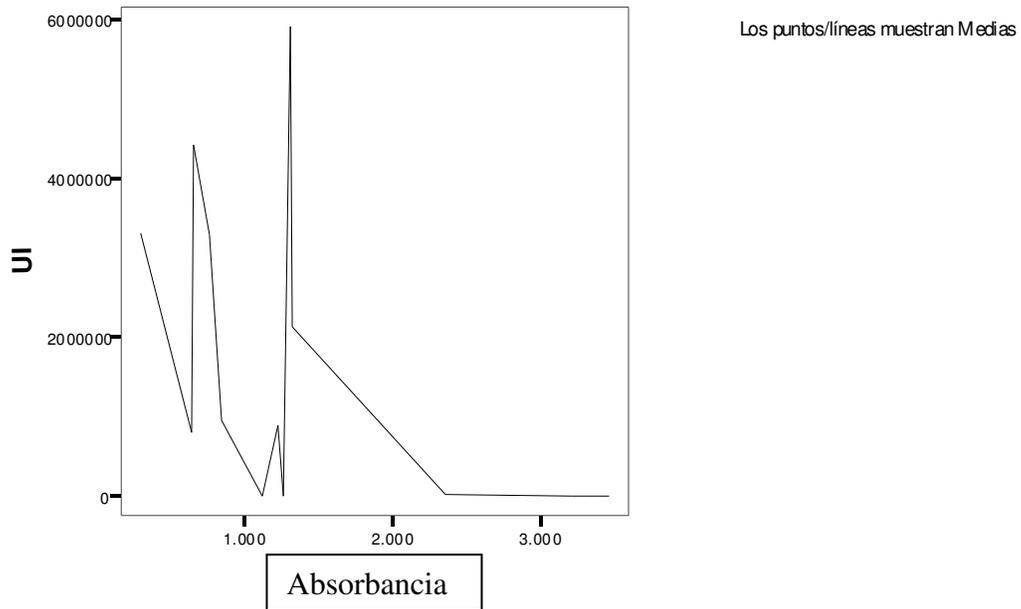
No. de Muestra	Serología As	Carga viral UI	Genotipo
16	0.654	4,430,000	lb
17	3.224	Negativo	-
19	0.650	808,757	lb
37	3.475	Negativo	-
55	0.766	3,300,000	lb
65	Indeterminado 0.298	3, 317,400	lb
75	1.234	895,335	lb
88	2.356	15,509	lb
90	3.398	Negativo	-
104	0.845	949,950	lb
114	1.316	5,930,000	lb
117	1.327	2,150,000	lb
120	3.300	Negativo	-
121	1.270	44.10	lb
134	1.121	241.90	lb

Cuadro 6.-Comparación de resultados positivos a VHC, por serología, carga viral y genotipo

			Valor	Error típ. asint.(a)	T aproximada(b)	Sig. aproximada
Ordinal por ordinal	d de Somers	Simétrica	-.559	.149	-3.975	.000
		Serología dependiente	-.576	.163	-3.975	.000
		Carga viral dependiente	-.543	.137	-3.975	.000

Cuadro 7.-Comparación de los valores positivos a VHC, absorbancia por serología y la carga viral en UI, prueba T para una Muestra.

Gráfico 15.-Asociación entre los valores de Absorbancia por serología y la carga viral en UI.



	p<0.05					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Serología	5.725	14	.000	1.682267	1.05205	2.31249
Carga viral	2.920	14	.011	1453126.800	385939.14	2520314.46

Cuadro 8.-Modelo de regresión lineal de las pruebas para detección para diagnóstico de VHC.

VIII.-CONCLUSIONES

- ❖ La prevalencia general de infección a VHC en población positiva a VIH-SIDA, es mayor que en la población negativa a VIH-SIDA, con una probabilidad de infección por VHC, 5 veces mayor en los pacientes positivos que en los pacientes negativos a VIH-SIDA.
- ❖ La prevalencia de coinfección VIH-VHC es mayor en hombres que en mujeres.
- ❖ El tipo de ocupación mas frecuente en pacientes coinfectados con VIH-VHC fue la de empleados en el caso de los hombres y la de ama de casa en las mujeres.
- ❖ Se comprobó que en los pacientes con VIH-SIDA, a menor edad, se incrementa el riesgo de infección por VHC.
- ❖ El riesgo de infección por VHC en la población estudiada es 15 veces mayor por el uso de drogas por vía intravenosa que por transfusión sanguínea.
- ❖ Se demostró una asociación estadísticamente significativa entre el uso de drogas por vía intravenosa y el antecedente de tatuajes como factores de riesgo de transmisión para la infección por VHC.
- ❖ En mujeres existe mayor riesgo de infección por VHC a través del uso de drogas por vía intravenosa, que en los hombres y en el caso de antecedente de tatuajes el riesgo de infección es mayor en hombres que en mujeres.
- ❖ El 94 % de los pacientes positivos a coinfección VIH-VHC, tiene al menos un factor de predisposición de evolución a hepatopatía, lo cual incrementa el riesgo de complicaciones y empeora el pronóstico y la calidad de vida de estos pacientes, que en su mayoría son adultos jóvenes en plena vida productiva que si bien han logrado controlar la infección de VIH-SIDA, tienen un alto riesgo de que la hepatitis crónica que ya presentan, evolucione a cuadros graves de cirrosis y/o hepatocarcinoma.
- ❖ En pacientes positivos a coinfección VIH-VHC, se demostró infección activa con una carga viral promedio de 1.697,814 UI.

- ❖ Los títulos de anticuerpos demostrados en las pruebas serológicas no deben utilizarse como indicadores de carga viral, ya que en pacientes positivos a VHC, se encontró que a títulos elevados de anticuerpos se presenta carga viral disminuida, y en el caso de una menor respuesta inmune la carga viral se incrementa, por lo que es recomendable que tanto los resultados positivos como los “indeterminados” de las pruebas serológicas se confirmen con las pruebas moleculares y también los resultados negativos cuando se trate de pacientes con evidencia clínica o epidemiológica y que tengan algún tipo de inmunosupresión.
- ❖ Se confirmó una mayor sensibilidad y especificidad de la prueba de RT-PCR con respecto a la prueba serológica.
- ❖ La prevalencia de Coinfección VIH-VHC comprobada en esta población, demuestra la importancia desde el punto de vista de Salud Pública que tienen estas infecciones y el gran potencial parenteral para la propagación de estos virus, especialmente entre los consumidores de drogas intravenosas, en la ciudad de Tijuana, Baja California, México.
- ❖ Este estudio demuestra que se debe ampliar el monitoreo de infección por VHC, especialmente en población considerada de alto riesgo, como son los pacientes infectados con VIH-SIDA, el hecho de que el 100 % de los positivos a VHC correspondan al Genotipo 1b y todos presenten al menos un factor de riesgo para el desarrollo de hepatopatía, demuestra que estos pacientes son candidatos a recibir terapia antiviral y monitoreo de carga viral con la metodología propuesta.
- ❖ Se proponen las técnicas de biología molecular para la confirmación, manejo y seguimiento de este padecimiento durante la terapia antiviral, así como intervenciones que permitan minimizar el riesgo de transmisión de este tipo de infecciones que tienen graves repercusiones en la salud humana.

IX.-BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar JC, Portero F, Sanz C, Martin JE, Daza R. Estudio de genotipos del virus C en pacientes hemodializados. Servicio de Microbiología y Nefrología Clínica. VIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2002 Mayo 22; Palma de Mallorca, España. *Biología molecular en la clínica*. McGraw-Hill Interamericana, 2005:153-166.
2. Akahane Y, Kojima M, Sugai Y. Hepatitis C virus infection in spouses of patients with type C chronic liver disease. *Annals of Internal Medicine* 1994;120:748-752.
3. Armstrong GL, Simard EP, Wasley A, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999-2002. *Hepatology* 2004;40:176A.
4. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. *Clinical Gastroenterology* 2000;14:241-254.
5. Bica I, McGovern B, Dhar R, Stone D, McGowan K, Scheib R, et al. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Disease* 2001;32:492-7.
6. Bierhoff E, Fischer HP, Willsch E, et al. Liver histopathology in patients with concurrent chronic hepatitis C and HIV infection. *Virchows Archive* 1997;430:271-7.
7. Blight KJ, Kolykhalov A, and Rice MC. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974.
8. Boyd RF, Hoerl BJ. *Microbiología Médica*. Segunda edición. Boston, EUA: El Ateneo, 2003;28:302.
9. Bresters D, Mauser-Buschoten EP, Reesink HW. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 2003;342:210-211.
10. Brock TM, Madigan MT, Smith DW. *Microbiología*. 4ª. Edición México, D.F: Prentice-Hall Hispanoamericana, 2001;10:348-449.

11. Brown R, Gaglio P. Scope of worldwide hepatitis C problem. *Liver transplantation* 2003;9:10-13.
12. Bruguera M. Hepatitis C esporádica: importancia relativa de la transmisión vertical, sexual y parenteral inaparente del virus de la hepatitis C. *Med Clin (Barc)* 2005;111:658-659.
13. Carmena R, Ordovas, JM. Apolipoproteína e hiperlipidemias, clínica y tratamiento. Barcelona, España: Doyma, 1999:45-63.
14. Castro BF. Utilidad de la monitorización del RNA del virus de la Hepatitis C durante el tratamiento antiviral como factor predictor de respuesta. (Tesis Doctoral) Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona, 2001.
15. Chan CY, Huang YS, Huwang SJ, Lo, KJ, Lee SD, Wang YJ, Wu JC. Superinfection with Hepatitis C Virus in patients with symptomatic chronic Hepatitis B. *Journal of Infectious Disease* 2001;23:421-424.
16. Chokephaibulkit K, Painter M. Overview of Hepatitis C, *Laboratory Medicine* 2000;23(12):708-803.
17. Choopanya K, Des Jarlais DC, Vanichseni S, Mock PA, Kitayaporn D, Sangkhum U, et al. HIV risk reduction in a cohort of injecting drug users in Bangkok, Thailand. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2003;33:88-95.
18. Clever LH. Hepatitis C virus. *The Western Journal of Medicine* 2001;155:164-168.
19. Davignon J, Gregg RE, Sing CE. Apolipoproteína E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1998;8:1-21.
20. Des-Jarlais DC, Friedman SR, Novick DM, Sotheran JL, Thomas P, Yancovitz SR, et al. HIV-1 infection among intravenous drug users in Manhattan, New York City, from 1987 through 1997. *Journal of the American Medical Association* 2003;261:1008-1012.
21. Di Martino V, Esteban JI, Tainturier M-H, Benhamou Y, Bochet M, Opolon P, Poynard T. Impact of HIV Coinfection on the Long-Term Follow-Up of HCV-Related Cirrhosis. *Hepatology* 2000;32:203.

22. Esteban JI, López-Talavera JC, Genesca J. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Annals of Internal Medicine* 2001;115:443-449.
23. Farfán YA, Garzón MA, Rey Tovar MH, Molano JC. Prevalencia de hepatitis C por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en donantes del banco de sangre. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 2007;22:4-8.
24. Faye-White E, Garfein RS, Brouwer KC, Lozada R, Ramos R, Firestone-Cruz M, Pérez SG, Magis-Rodríguez C, Conde-Glez CJ, Strathdee AS. Prevalencia de los virus de la hepatitis C y de la inmunodeficiencia humana entre usuarios de drogas intravenosas, en dos ciudades mexicanas fronterizas con los Estados Unidos de América. *Salud Publica de México* 2007;49:165-172.
25. Fenner F, White DO. *Virología Médica*. 2ª. Edición. México, D.F., Prensa Médica Mexicana, 2004;1:1-24.
26. Fournillier-Jacob A, Cahour A, Escriou N, Girard M y Wychowski. Processing of the E1 Glycoprotein of Hepatitis C Virus expressed in Mammalian Cells. *Journal of General Virology* 2002;77: 1055-1064.
27. Franeki RI, Fauquet CM, Knudson DL y Brown F. Classification and Nomenclature of Viruses. *Archives of Virology* 1991;S2: 223-233.
28. Frost SD, Brouwer KC, Firestone Cruz MA, Ramos R, Ramos ME, Lozada RM, et al. Respondent-Driven Sampling of Injection Drug Users in Two U.S.-Mexico Border Cities: Recruitment Dynamics and Impact on Estimates of HIV and Syphilis Prevalence. *Journal of Urban Health* 2006;83 Suppl 7:83-97.
29. Gao L, Aizaki H. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *Journal of Virology* 2004;78:3480-3488.
30. González Cerrajero M, Pazos García A, de los Santos Gil I, Sanz Sanz J. Prevalencia de hepatitis C en población infectada por el VIH

en el Área 2 de Madrid. Anales de Medicina Interna (Madrid) 2006; 23: 111-114.

31. Gordon SC, Patel AH, Kulesza GW. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C virus. The American Journal of Gastroenterology 2002;87:1840-1851.
32. Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Camie J, Heeren T, Koziel MJ. Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection: A Meta Análisis. Clinical Infectious Diseases 2001;33:562-9.
33. Grakoui A, Wyehowski C, Lin C. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. The Journal of Virology 1993;67:1385-1395.
34. Grande-Pérez A. Molecular phylogenetics and evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences 2005;102: 4448-52
35. Hijikata MN, Kato Y, Ootsuyama M, Nakagawa and Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A. 1991;88:5547-5551.
36. Hollinger FB, Melnick JL. Viral Hepatitis. Virology 2000;59:1374-1377.
37. Horn T, Staley P, Evans D y Grossman H. Que es la Hepatitis C. (Monografía en Internet) 2005 (Consultado 2008 Octubre 10) Disponible en: http://www.iaismeds.com/articles/VHC_6774.shtml.
38. Houghton M, Weiner A, Han J, et al. Molecular Biology of the Hepatitis C Virus, Implications for Diagnostics, Development and Control of Viral disease. Hepatology 1991;140: 381-388.
39. Itzhaki RF, Irving WL, Wozniak MA. Apolipoprotein e and hepatitis C virus. Hepatology 2003;50354:1060.
40. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudeman SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importing-beta and the viral helicase, NS3. Journal of General Virology 2001;82:735-45.

41. Kappor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(32):19100-6.
42. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Okhoshi S, Sugimura T, Shimotohono K. Molecular Cloning of Human Hepatitis C Virus Genome from Japanese Patients with non-A, non-B Hepatitis. *Proceedings of the National Academy Sciences* 1990;87: 9524-9528.
43. Kato N. *Molecular Virology of Hepatitis C Virus*. *Acta Médica* 2001; 55:133-159.
44. Krugman S. Viral hepatitis: recent developments and prospects for prevention. *Journal of Pediatrics* 2002;87:1067-1975.
45. Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 2004;343:388-390.
46. Lisker-Melman M, Cote Ch. Marcadores serológicos de hepatitis viral. *Revista Mexicana de Gastroenterología* 2004;58(2):154-162.
47. Macias J, Castellano V, Merchante N, Palacios RB, Mira JA, Sáez C, et al. Effect of retroviral drugs on liver fibrosis in HIV-infected patients with chronic hepatitis C: harmful impact of nevirapine. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* 2004;18:767-73.
48. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-3.
49. Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World Gastroenterology* 2002;8:577-579.
50. Majid AM, Gretch DR. Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. *Microbes and Infection* 2002;4:1227-1236.
51. Marco M. Epidemiology, modes of transmission, and risk factors for hepatitis C virus (HCV) infection. *The Hepatitis Report, a critical*

- review of the research and treatment of hepatitis C (HCV) and hepatitis and HIV coinfection. 2000;1:7-25.
52. Martín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, Berenguer J, Mallolas J, Quereda C, et al. Incidence and predictors of severe liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic hepatitis C: a european collaborative study. *Clinical Infectious Diseases* 2004;38:128-33.
53. Matsuura Y, Harada S, Suzuki R. Expression of Processed Envelope Protein of Hepatitis C virus in Mammalian and Insect Cells. *Journal of Virology* 2000;66: 1425-1431.
54. McOmish F, Yap PL, Dow BC. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;32:884-892.
55. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *The Journal of Viral Hepatitis* 2002;9:84-100.
56. Meyer K, Beyene A, Bowlin T. Coexpression of Hepatitis C Virus E1 and E2 chimeric envelope glycoproteins displays separable ligand sensitivity and increase pseudotype infectious titer. *Molecular Microbiology and Immunology*, Saint Louis University, St. Louis Missouri, EUA: 2004.
57. Miller CL, Wood E, Spittal PM, Li K, Frankish JC, Braitstein P, et al. The Future Face of Coinfection: Prevalence and Incidence of HIV and Hepatitis C Virus Coinfection Among Young Injection Drug Users. 2004;36:743-749.
58. Mir J, Fleming C, Steger K, et al. Predictors of detectable hepatitis C virus-RNA (HCV-RNA) levels in HIV+/HCV+ patients (abstract 278). 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2000; San Francisco, EUA.
59. Moward CT, Jacyna MR. Parenterally acquired Non-A, Non-B Hepatitis ten year of advances In diagnosis and therapy. *Postgraduate Medical Journal* 2002;66:1000-1004.

60. National Institutes of health. Consensus development conference statement management of hepatitis C: 2002-June 10-12. *Hepatology* 2002;36(Suppl 1):3S.
61. Negro F, Glostra E, Krawczynski K, Quadri R, Rubbia L, Mentha G. Detection of intrahepatic hepatitis C virus replication by strand-specific semi-quantitative RT-PCR: Preliminary application to the liver transplantation model. *Journal of Hepatology* 2000;29(1):1-11.
62. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *New England Journal of Medicine* 2004;330:744-750.
63. Ortiz MN. Biología del virus de la hepatitis C. En: Carreño V, Castillo I (eds.). *Hepatitis víricas: Biología, clínica y tratamiento*. 1ª ed. Barcelona: Springer Verlag Ibérica; 2001:243-63.
64. Palafox-Zaldivar, A. Hepatitis por virus C. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 2001;56(9):520-531.
65. Plageman PGW. Hepatitis C Virus. *Virology* 2001:166-177.
66. Planko S, Patella S, Sievert W, Alcohol consumption induces hepatocyte apoptosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000;15(7):798-806.
67. Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Giménez-Barcons M, Sirera G, Martínez MA. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 2000;23(1):89-94.
68. Rambusch EG, Manns MP. Extrahepatic manifestations of hepatitis C Infection. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 1998;36(7):579-586. En: Riestra MS, Rodríguez GM, Sánchez SF, Menendez TF. Intrafamilial spread of hepatitis C virus. *Infection* 2001;19(6):431-3.
69. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus infection and VHC-related chronic disease. Centers for Disease Control and prevention 1998;47:1-39.

70. Robbins DJ, Pasupuleti V, Cuan J, Chiang CS. Reverse Transcriptase PCR quantification of hepatitis C Virus. *Clinical Laboratory Science* 2000;13(1):23-30.
71. Rockstroh J, Konopnicki D, Soriano V, Kirk O, Antunes F, Knysz B, et al. Hepatitis B and Hepatitis C in the EuroSIDA cohort: prevalence and effect on Mortality, AIDS progression and response to HAART. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 2004; San Francisco (CA), EUA.
72. Ruiz A. Coinfección por el VIH y el virus de la hepatitis C. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2006;24(5):335-342.
73. Saiz P. Factores predictivos de infección por el VIH, VHC y coinfección en la población reclusa de una prisión española. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2005;23(2):53 a 57
74. Salmón-Ceron D, Lewden C, Morlat P, Bevilacqua S, Jouglà E, Bonnet F, et al. Liver disease as a major cause of death among HIV infected patients: role of hepatitis C and B viruses and alcohol. *Journal of Hepatology* 2005;42:799-805.
75. Santolini E, Miglaccio G y Mónica NL. Biosíntesis and Biochemical Properties of the Hepatitis C virus core Protein. *Journal of Virology* 2004;68:3631-341.
76. Schouten J. Hepatitis and HIV coinfection. *The Hepatitis Report. A critical review of the research and treatment of hepatitis C virus (HCV) and hepatitis and HIV coinfection.*
77. Shehab S. Management of hepatitis C patients by primary care physicians in the USA: Results of a national survey. *Journal of Viral Hepatitis* 2001;8(5):337-383.
78. Shepard C, Finelli L, Alter M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Disease* 2005;5: 558-67.

79. Simo R, Hernández C, Genesca J, Jardí R, Mesa J. High prevalence of hepatitis C virus infection in diabetic patients. *Diabetes Care* 2002;19(9):998-1000.
80. Soriano V et al. Care of patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus: updated recommendstions from the HCV-HIV. *International Panel AIDS* 2007;21:1073-1089.
81. Stubbe L, SorianoV, Antunes F, et al. Hepatitis C in the EuroSIDA cohort of European HIV-infected patients: prevalence and prognostic value. In: Program and abstracts of the XII International AIDS Conference; 1998 June 28-July 3; Geneva, Suiza.
82. Sulkowski MS, Mast EE, Seeff LB, Thomas DL. Hepatitis C virus as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Disease*. 2000;30:S77-4.
83. Sulkowski MS, Thomas DL. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection in injection drug users: implications for treatment. *Clinical Infectious Disease* 2005;40 (5):S263-S269.
84. Szabo G, Aloman C, Polyak SJ, Weinman SA, Wands J, Zakhari S. Hepatitis C infection and alcohol use: A dangerous mix for the liver and antiviral immunity. *Clinical and Experimental Research* 2006;30:709-719.
85. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH. Recombinant dengue type virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* 1996;216:317-25.
86. Terrés-Speziale AM. Hepatitis C, historia natural y estado actual de su manejo. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 2003;50(4):179-189.
87. Thorpe LE, Ouellet LJ, Hershov R, Bailey SL, Williams IT, Williamson J, et al. Risk of hepatitis C virus infection among young adult injection drug users who share injection equipment. *American Journal of Epidemiology* 2002;155:645-653.
88. Tong MJ, Reikes AR. Clinical outcomes after transfusion associated hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 2005;332:1463-1466.

89. Valdespino JL, Olaiz G, Conde C, et al. Reto de hepatitis C. Resumen de cifras para tomadores de decisiones. Instituto Nacional de Salud Pública; Centro de Información para decisiones en Salud. México;2005.
90. Van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW. Risk factors in HCV infected blood donors transfusion. *Journal of Transfusion* 2001;31:777-779.
91. Vega RI, León RA, Zolezzi RP. Virus de la hepatitis C en un grupo de pacientes hematológicos y oncohematológicos *Revista Médica de Chile* 2000;129:2-4.
92. Vera de León L, Juárez Navarro JA, Díaz Gómez M, Méndez Navarro J, Chirino Sprung RA, Dehesa Violante M, et al. Epidemiologic and situational panorama of hepatitis C in Mexico. *Revista de Gastroenterología de México* 2005;70:25-32.
93. Wit FW, Weverling GJ, Weel J, Jurriaans S, Lange JM. Incidence of and risk factors for severe hepatotoxicity associated with antiretroviral combination therapy. *Journal Infectious Disease* 2002;186:23-31.
94. World Health Organization. Global distribution of hepatitis A, B and C 2001. *Weekly Epidemiological Report* 2002;77(6):45-7.
95. Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher AEB, James MW, Ryder SD, HCV study group. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. 2002; *Journal of Hepatology* 2002;36:456-463.
96. Yabar C. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del RNA del virus del dengue, propuesta de un modelo de replicación del RNA. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2005;7:12-24.
97. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T. Detection of Hepatitis C Virus by Polymerase Chain Reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of Hepatitis C virus. *Hepatology* 2002;16:293-299.

98. You S, Falgout, Markoff L, Padmanabhan R. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5' and terminal regions that influence RNA structure. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(19):15581-91.
99. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C genotypes. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:223-235.
100. Zeinn NN. The epidemiology and natural history of hepatitis C Virus infection. *Clinical Journal of Medicine* 2003;70(4):2-6.
101. Zhang J, Randall G, Higginbottom A. CD81 is required for Hepatitis C virus glycoprotein mediated viral infection. *Center for study of Hepatitis. Journal of Virology* 2004;78:1448-1455.

Anexo 1.-Cuestionario y base de Datos proyecto VHC.

PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS EN UNA POBLACION DE PACIENTES DE SERVICIOS ESPECIALIZADOS DE VIH-SIDA DEL HOSPITAL GENERAL(ISESALUD) DE TIJUANA,B.C.

Nombre: _____ No. de control _____

Edad _____ Sexo _____ Ocupación _____

Tipo de población en estudio: _____

Antecedentes:

Tiempo de Diagnóstico de HIV-SIDA _____

Tratamiento para HIV _____ SI NO

Hace cuanto tiempo _____

Recibió tratamiento para VHC SI NO

Recibe tratamiento actualmente para VHC SI NO

Hace cuanto tiempo _____

Que tipo de tratamiento _____

Ha recibido transfusiones _____ Cuando _____

Consumo de alcohol _____

Uso de drogas intravenosas _____

Tatuajes _____

Hepatitis A _____

Hepatitis B _____

Otros _____

Pruebas adicionales:

TGO SI NO Resultados _____

TGP SI NO _____

Bilirrubinas SI NO _____

Fosfatasa alcalina SI NO _____

Biopsia SI NO _____

Otros SI NO _____

Anexo 2. Carta de consentimiento informado para participacion de adultos en proyectos de investigación.

Tijuana, B.C., _____ de _____ del _____

Por medio de la presente acepto participar en el Proyecto denominado:
"PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS EN UNA POBLACION DE PACIENTES DE SERVICIOS ESPECIALIZADOS DE VIH-SIDA DEL HOSPITAL GENERAL (ISESALUD) DE TIJUANA, B.C."

Registrado en la Universidad Autónoma de Baja California con la clave 300035384607-1 bajo la responsabilidad de la M.C. Mirna del Carmen Brito Perea y con la colaboración de la Dra. Remedios Lozada Romero (ISESALUD)

Las infecciones por el virus de la Hepatitis C (VHC) afectan aproximadamente 10-30 % de la población mundial y constituyen una de las principales causas de enfermedad hepática crónica. Se estima que más del 70 % de los individuos que se infectan progresan a daño hepático crónico, 20 % desarrollan cirrosis y un porcentaje similar carcinoma hepatocelular (20 %), con una remisión de un 15 %.(Van der Poel CL, CuypersHTM, Reesink HW et.al.,2006)

El presente estudio tiene como Objetivo General; Determinar la Prevalencia de Genotipos del Virus de la Hepatitis C (VHC) y factores de riesgo asociados en una población de pacientes positivos a HIV-SIDA que son atendidos en Servicios Especializados del Hospital General (ISESALUD) de Tijuana, B.C. con la finalidad de analizar el comportamiento epidemiológico de la coinfección VIH-VHC en esta población considerada de alto riesgo, aportando datos sobre la posible respuesta al tratamiento y favorecer la decisión de esquemas terapéuticos para el control de este padecimiento.

Para la Realización del presente estudio se llevará a cabo una entrevista realizada por personal sanitario previamente adiestrado, y se aplicará un cuestionario en el que se consideran tanto variables socio-demográficas (edad, sexo, estado civil, nivel educativo, aspectos laborales) como factores de riesgo para la infección por VHC. Se requiere tomar una muestra de sangre venosa para la obtención de plasma en el que se realizará una prueba serologica para detección de anticuerpos AntiVHC (Prueba preliminar) y se seleccionarán las muestras con resultado Positivo para la posterior Genotipificación.

Se da seguridad de que no se identificará al paciente en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con su privacidad serán manejados en forma confidencial y se le proporcionará el resultado del estudio serológico.

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma del Investigador responsable _____

Nombre y firma de un Testigo _____

Anexo 3 Criterios de Inclusión y exclusión proyecto VHC
**PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y
FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS EN UNA POBLACION DE PACIENTES
DE SERVICIOS DE ATENCIÓN INTEGRAL DE VIH-SIDA DE ISESALUD EN
TIJUANA,B.C.**

RESPONSABLE: M.C.Mirna del Carmen Brito Perea
Universidad Autónoma de Baja California

COLABORADOR TITULAR: DRA.Remedios Lozada Romero
SEA-SAI, ISESALUD y PREVECASA,A.C.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con HIV-SIDA confirmado que son atendidos en los Servicios Especializados de ISESALUD en Tijuana,B.C.
- Ser mayor de Edad.
- Pacientes que acepten las condiciones del estudio a través de la firma de Carta de Consentimiento.
- Pacientes con disposición para responder al interrogatorio incluido en el estudio..
- Pacientes en buen estado de salud general y ambulatorios.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes con HIV-SIDA que no son atendidos en los Servicios Especializados de ISESALUD.
- Ser menor de Edad.
- Pacientes que se nieguen a aceptar las condiciones del estudio y no firmen la carta de consentimiento.
- Pacientes que no respondan al interrogatorio incluido en el estudio.
- Pacientes en mal estado de salud y hospitalizados.