

25
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"DETERMINACION DE INCIDENCIA DE HEPATITIS
C EN DONADORES DE SANGRE DEL H.T.O.L.V.
DEL I.M.S.S.."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
JOSEFINA GARCIA JIMENEZ

ASESOR: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
COASESOR: DR. GUILLERMO MARTINEZ LOPEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Determinación de incidencia de Hepatitis C en donadores de
sangre del H.T.O.L.V. del I.M.S.S.

que presenta la pasante: Josefina García Jiménez
con número de cuenta: 8653180-9 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica-Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Ixcalli, Edo. de Méx., a 10 de mayo de 1997

PRESIDENTE Q. F. B. Ramón Cendejas Ramírez

VOCAL Q. F. P. Antonio Sánchez Ortega

SECRETARIO Dca. Susana E. Mercedes Elvira

PRIMER SUPLENTE Q. F. B. Martha Patricia Campos Peón

SEGUNDO SUPLENTE Dr. Víctor M. Cendejas Ruizón

[Firma manuscrita]
[Firma manuscrita]
[Firma manuscrita]
[Firma manuscrita]

AGRADECIMIENTOS

**A la FES. Cuautitlán
Que me dio la oportunidad de
estudiar esta carrera**

**A todos mis profesores de la Facultad
que contribuyeron a mi formación
profesional.**

A mi asesora:

Dra. Susana E. Mendoza.

**Por su orientación, apoyo y paciencia para
la realización de este trabajo.**

A mi asesor:

Dr. Guillermo Martínez

**Por el apoyo y facilidades brindadas en la
realización de este trabajo en el I.T.O.L.V.**

Al Ing. Garibay Bermudez

**Por su asesoría en el
análisis estadístico.**

A los sinodales

**Por haber contribuido con
sus sugerencias**

**Al Dr. Victor M. Buitron Zendejas por
su apoyo. Así como por su manera tan
especial de hacerme ver la inmunología.**

DEDICATORIAS

A *Dios*, por todos esos momentos que han llenado mi vida de alegría, paz y amor.

A mis Padres:

Francisco y Lucila

Por haberme dado todo su amor
sin esperar nada a cambio.

A mis hermanas:

Virginia y Alicia

Por su apoyo en todo momento.

A mi *Familia*

Mil gracias a ustedes, que en su momento, me brindaron su tiempo y apoyo.

Ariel
Olga
Margrita

Adán y a sus Evas
A. J. E. G.

Ann Luisa
Rocio

Carmen
María Luisa

Andelin
Luis

Mirna
Victor B.

*En la amistad los pensamientos, los deseos, los anhelos nacen y se comparten
con una alegría que no necesita proclamarse*

Gibran.

Índice

Tabla de abreviaturas.....	i
Figuras.....	v
Tablas.....	vi
Resumen.....	vii
1.0 Introducción.....	1
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Estructura.....	3
1.2.1 Proteína de core (central).....	4
1.2.2 Envolturas proteínicas	4
1.2.3 Estructuras no proteínicas.....	6
1.3 Clasificación del VIH.....	7
1.3.1 Características de los subtipos del VIH.....	
1.4 Transmisión.....	11
1.5 Factores de riesgo.....	14
1.5.1 Ocupacional.....	14
1.5.2 Edad.....	15
1.6 Evolución Clínica.....	16

1.6.1 Fase aguda.....	16
1.6.2 Fase icterica.....	16
1.6.3 Fase crónica.....	17
1.6.4 Hepatitis fulminante.....	18
1.6.5 Coinfección viral.....	18
1.6.6 Posible mecanismo de supresión delVHB por el VHC.....	19
1.7 Aspectos inmunológicos.....	21
1.7.1 Análisis de la respuesta de células CD8+.....	23
1.7.2 Análisis de la respuesta de los linfocitos CD4+ al VHC.....	26
1.8 Mecanismo de daño hepático inducido por el VHC.....	27
1.9 Diagnóstico de Hepatitis C.....	32
1.9.1 Marcadores serológicos.....	33
1.9.2 Métodos de detección del VHC.....	36
1.9.3 Inmunolectrotransferencia.....	37
1.9.4 Reacción en cadena de la Polimerasa y/o Transcripción Reversa.....	38
1.10 Vacuna.....	40

1.11 Tratamiento de la Hepatitis C.....	41
1.11.1 Interferones.....	42
1.12 Reacciones adversas asociadas con el tratamiento del IFN.....	45
2.0 Hipótesis.....	47
3.0 Objetivos.....	48
4.0 Material y Métodos.....	49
4.1 Lugar de muestreo.....	49
4.2 Período de estudio.....	49
4.3 Material biológico.....	49
4.4 Manejo del donador.....	50
4.5 Manejo de la muestra.....	51
4.6 Material de vidrio y equipo.....	52
4.7 Reactivos.....	52
4.8 Principio del procedimiento de (ELISA 2).....	53
4.9 Procedimiento del ensayo de (ELISA 2).....	54
4.9.1 Dilución de muestras.....	54
4.9.2 Primera incubación.....	54
4.9.3 Segunda incubación.....	54

4.9.4 Desarrollo de color.....	55
4.10 Lectura.....	55
4.11 Cálculo de resultados.....	55
4.12 Interpretación de los resultados.....	56
5.0 Resultados.....	57
6.0 Discusión.....	73
7.0 Conclusiones.....	79
8.0 Referencias.....	80

Abreviaturas

a. a.	aminoácidos.
anti-C100-3	anticuerpos contra la proteína C100-3 del VHC.
anti-E1	anticuerpos contra la Envoltura E1 del VHC.
anti-E2	anticuerpos contra la Envoltura E2 del VHC.
anti-GOR	anticuerpos contra la proteína GOR.
ALT	Alanina Aminotrasferasa.
anti-RHV	anticuerpos contra la región hipervariable del VHC.
2' 5' AS	2' 5' Oligo Adenilato Sintetasa.
anti-VHC	anticuerpos contra el Virus de la Hepatis C.
B. A.	Brucella abortus.
CHC	Carcinoma Hepatocelular.
CTL	Linfocitos T citotóxicos.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
DNAc	DNA complementario.
EIA o ELISA	Ensayo inmunoenzimático.

EIA-1.....	Ensayo inmunoenzimático de primera generación.
EIA- 2.....	Ensayo inmunoenzimático de segunda generación.
E1.....	Envoltura-1, proteínica gp33 del VHC.
E2.....	Envoltura-2, del virus de la hepatitis C.
HCA.....	Hepatitis Crónica Activa.
HCVA.....	Hepatitis Crónica Viral Activa.
VIH.....	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
HLA.....	Antígeno de Leucocito Humano.
HLA 1.....	Antígeno de Leucocito Humano Clase 1.
HLA 2.....	Antígeno de Leucocito Humano Clase 2.
HLA A 2.....	Antígeno de Leucocito Humano Alelo Clase 2
H. T. O. L. V.	Hospital de Traumatología y Ortopedia de Lomas Verdes.
IgD.....	Inmunoglobulina D.
IgM.....	Inmunoglobulina M.
IgG.....	Inmunoglobulina G.
INF.....	Interferon
Iet.....	Inmunoelectrotransferencia
Iet-2.....	Inmunoelectrotransferencia de Segunda Generación

Iet-3	Inmunolectrotransferencia de Tercera Generación
NK	Célula Asesina.
OPD	Orto-Fenilendiamina.
Pc	Proteína de core o central del VHC.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PCR-RT	Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcripción Reversa.
RHV	Región Hipervariable del VHC.
RHV1	Región Hipervariable 1 del VHC.
RHV2	Región Hipervariable 2 del VHC.
RNA	Acido Ribonucleico.
TCR	Receptor de Celulas T.
TGO o AST	Transaminasa Glutámico Oxalacética.
TGP o ALT	Transaminasa Glutámico Pirúvica.
VHB	Virus de la Hepatitis B.
VHC	Virus de la Hepatitis C.
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory (Laboratorio de Investigación sobre Enfermedades Venereas).

Figuras

	Pag.
1.- Donadores totales durante el tiempo que..... duro el estudio.	44
2.- Donadores seropositivos por mes durante..... el tiempo que duro el estudio.	44
3.- Porcentaje de donadores seropositivos por..... mes durante el tiempo que abarco el estudio.	45

Tablas

	Pag.
1.- Diferentes subtipos del Virus de la Hepatitis.	6
2.- Donadores totales y seropositivos durante..... el tiempo que duro el estudio.	43
3.- Casos positivos del VHC en donadores de..... sangre de diferente sexo, por año.	46
4.- Proporcional poblacional de casos..... positivos.	47
5.- Datos para el Análisis de Regresión y..... Correlación.	48
6.- Datos para llegar a la ecuación de la recta.	49

Resumen

En Estados Unidos la Hepatitis C es un problema frecuente, donde se presentan 150 mil casos nuevos cada año. En México la prevalencia de anti- VHC positivo en hepatitis postransfusional es del 37%.

La hepatitis no A no B casi es idéntica a la hepatitis B aguda (39).

En los pacientes que padecen hepatitis C aguda no suele haber síntomas, aun cuando las pruebas de funcionamiento hepático se encuentren alteradas.

Se reporta que la cirrosis del hígado se desarrolla entre los 1.5 y 16 años, después de la transfusión de sangre; por lo tanto la cirrosis del hígado y cáncer hepatocelular pueden desarrollarse cerca de los 20 a 30 años respectivamente, después del inicio de la enfermedad aguda. Por estas razones es importante determinar el VHC (Virus de la Hepatitis C) en donadores de sangre.

En el Hospital de Traumatología y Ortopedia de Lomas Verdes se determinó por el método de Ensayo Inmunoenzimático de segunda generación (ELISA. 2) el VHC en donadores de sangre durante dos años (de enero del 94 a enero del 96). Un total de 5111

muestras fueron analizadas, de las cuales se encontraron 52 muestras positivas, lo que representa que la incidencia esta entre 0.74 y 1.29 % (con un intervalo de confianza del 95 %).

En el sexo masculino se encuentra entre 0.68 y 1.24 %, y en el femenino es de 0.45 y 2.96 %.

Además de determinar la incidencia de hepatitis C, se encontró que no hay una relación directa con el transcurso del tiempo y se mantiene relativamente sin grandes variaciones en este periodo que comprendió el estudio.

1.0 Introducción

La incidencia de la hepatitis tuvo un aumento significativo durante la década de los años 60 y 70 en personas transfundidas, a consecuencia de la práctica médica indiscriminada como el uso repetitivo de agujas que estaban contaminadas con el Virus de la Hepatitis C (VHC).

La existencia de la hepatitis infecciosa postransfusional diferente a la hepatitis A o B, fue reconocida en 1974. Y un pequeño fragmento del genoma del VHC fue por primera vez identificado en 1988 (1).

El Ensayo Inmunoenzimático de Primera Generación (ELISA. 1) disponible para detectar anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C, se realizó en 1989, usando la recombinación del antígeno C100-3 localizado en la región NS3-NS4 (2)

En un esfuerzo por reducir la incidencia de hepatitis asociada a transfusiones sanguíneas el 2 de mayo de 1990, la detección del anticuerpo contra el Virus de la Hepatitis C (ELISA.1) fue licenciada por la U.S. Food and Drug Administration para el ensayo de muestras de sangre y plasma provenientes de donadores. Estudios realizados posteriormente justificaron esta medida adoptada (3).

En Japón la Cruz Roja realizó una nueva prueba a los donadores de sangre para detectar anticuerpos contra el VHC empleando el ensayo de ELISA. La incidencia de hepatitis postransfusional después de utilizar el ensayo (diciembre de 1989 a diciembre de 1990), se comparó con la incidencia antes de su introducción (febrero de 1982 a 1988), el resultado fue el siguiente: la hepatitis postransfusional fue de 9.8% (219 a 2240) y 3.7% (12 de 326) después de la introducción de esta prueba (4).

En China se realizó un estudio para detectar anticuerpos anti-VHC, fue realizado a 100 donadores de sangre, 374 casos de hepatitis viral incluyendo 65 casos de hepatitis fulminante subaguda y crónica. Ninguno de los 100 donadores de sangre y receptores demostraron una respuesta positiva a la detección de anticuerpos contra el Virus de la Hepatitis C.

Un 7.6% fue positivo de pacientes con hepatitis crónica activa y 23.1% de pacientes con cirrosis hepática (5).

1.1 Generalidades

1.2 Estructura

Estudios realizados sobre este virus (VHC) sugieren que se trata de un virus monocatenario, es decir, que tiene un genoma con una sola cadena de RNA de un sentido positivo (que es infectante, y toda la molécula funciona como un mensajero de RNA dentro de una célula infectante). Este se encuentra dentro de un genoma que contiene aproximadamente 9400 nucleótidos codificados en una sola y larga operación de lectura por 3010 aminoácidos (6).

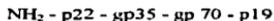
Este virus presenta una organización genómica similar a los flavivirus y pestivirus. Es probable que debido a la sensibilidad de su envoltura a solventes orgánicos este relacionado también con togavirus o flavivirus (7). Sin embargo se propone que el VHC corresponde a un nuevo género específico de la familia *Flaviviridae* distinto a los flavivirus y Pestivirus (8).

El virus tiene un diámetro de 30-60 nm. El RNA (ácido ribonucleico) codifica para dos estructuras proteínicas y para cinco estructuras no proteínicas (9).

1.2.1 Proteína de core (central)

La proteína recombinante c22-3 se codifica en la región central (el ácido nucleico y la capsida forman la nucleocapsida o core). El aminoácido terminal de esta región viral contiene como mínimo dos proteínas con mayor afinidad a los anticuerpos que son reconocidos virtualmente en todos los pacientes infectados con el virus no A no B (10,11).

Estudios *in vitro* realizados sobre esta poliproteína revelaron la presencia de cuatro proteínas arregladas convenientemente, al final del grupo amino terminal (NH₂) en el siguiente orden:



Fueron identificados cuatro epítopos de la Proteína central (Pc) : G15v de 31 aminoácidos (a.a) - 45 a.a., que parece ser el antígeno inmunodominante; Q15v de 7 a.a - 21 a.a que también tiene una fuerte reactividad, aunque este fue asociado con una baja especificidad; R15p de 49 a.a - 63 a.a que tiene una reactividad ocasional y P15R (12).

1.2.2 Envolturas proteínicas.

Consta de dos envolturas glicoproteicas, Envoltura 1 (E1 o gp33) y la Envoltura 2 no estructural (E2/NS1). Y en particular la región putativa estructural codifican a las proteínas virales gp35 y gp70 (8,13 y 14). En contraste a la variación substancial de la secuencia de aminoácidos de la envoltura, la proteína (Pc) del virus de la Hepatitis no A no

B demostró gran conservación en la secuencia idéntica entre los grupos aislados (80% a un 100% de secuencia idéntica) (10), y por lo tanto la subregión de Core inmunodominante puede ser inadecuada para tipificar serológicamente, debido a que es altamente conservada entre los virus aislados (11).

Por comparación de la secuencia de aminoácidos de varios subtipos del VHC aislados de algunos pacientes crónicos infectados. Un grupo de investigadores identificó dos regiones hipervariables (RHV(s)), la primera RHV1 de 27 a.a. y la RHV2 de 7 a.a. localizadas en la región amino terminal de la Envoltura E2/NS1.

Se ha reportado que la RHV1 contiene un epítopo inmunológico que es específico para cada virus aislado, y que en algunos casos sufre mutación, es decir, sufre un cambio de la secuencia de a.a. que asociado con una alteración de la segunda estructura de esta región, este puede escapar al reconocimiento inmunológico (anticuerpos anti-RHV preexistentes). La variabilidad en la secuencia de a.a. de la primera región (RHV1), fue observada durante un periodo de 2 a 13 años. Y por lo tanto puede ser el mecanismo de la cronicidad de la infección del VHC persistente.

1.2.3 Estructuras no proteínicas

Como ya se mencionó anteriormente el VHC consta de dos envolturas glicoproteicas y una cubierta lipídica que consta de cinco estructuras no proteínicas que están ordenadas como se demuestra a continuación: NH₂ - C - E1-E2/NS1 - NS2 - NS3 - NS4A - NS4B - NS5A - NS5B - COOH. Individualmente las proteínas del virus de la Hepatitis C son expresadas por traducción del RNA genómico (la organización del genoma del VHC se observa en la Figura 1).

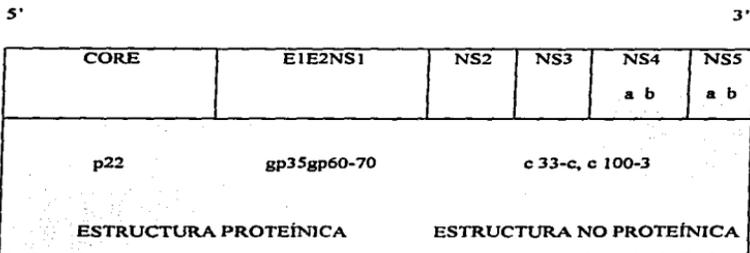


Figura. 1. Organización del genoma del virus de la Hepatitis C (6).

La envoltura proteínica (E1, y E2) están localizadas en la región central (core), la proteína c22-3 se codifica en esta región y gp35, gp60-70 son proteínas estructurales. La proteína c33-c se codifica en las regiones NS-3 y NS-4 del genoma vírico. Y c100-3 como c33c son proteínas no estructurales (NS).

1.3 Clasificación del VHC

El suero procedente de pacientes principalmente con Hepatitis C es extraído y clonado, las secuencias de aminoácidos son comparadas, encontrándose una amplia variación. Por consiguiente diferentes tipo del VHC (subtipos) pueden ser identificados y aislados en todo el mundo como se puede apreciar en la (Tabla. 1.) (15,16)

Tabla. 1. Diferentes Subtipos del virus de la Hepatitis C. (17,18) .

PAIS	SUBTIPOS					
	I	II	III	IV	V	VI
AFRICA	-	-	-	-	+	-
E. U.	+	-	-	-	-	-
EUROPA	-	+	-	-	-	-
HONG KONG	-	-	-	-	-	+
JAPON	-	+	-	-	-	-

Se ha clasificado al Virus de la Hepatitis C por medio de una amplificación por el método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de la secuencia de aminoácidos (secuencia universal del gen central) (18).

De acuerdo a la clasificación de los genotipos propuestos por Simmonds et al. (1993), y recientemente adoptada por consenso general en la Segunda Conferencia

Internacional del VHC (agosto de 1994), los tipos I, II, III, IV y V, VI corresponden a los tipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b de Okamoto et al.(1992) (18-22).

1.3.1 Características de los subtipos del VHC

Serotipo I

Se asocia con el avance de la enfermedad hepática (cirrosis y hepatitis crónica activa), y fue significativamente asociada con una coinfección con el VIH . Además este serotipo se caracterizó por una mínima respuesta al tratamiento con interferón, a diferencia del serotipo II y III (18,22) .

Serotipo II

Esté fue asociado con pacientes de más de 40 años de edad que no están infectados con el VIH o son adictos a drogas (por vía intravenosa). Se caracteriza por ser más resistente al tratamiento con Interferón (IFN) y tienen un severo daño hepático que otros subtipos (11,18 y 21) . Todos los donadores infectados con este genotipo del VHC son reactivos a la proteína viral c22-3, en cambio se reportó que la mayoría de estos individuos infectados con este subtipo demostraron una ausencia de la reactividad a la proteína viral c100-3.

Se detectó que la secuencia de aminoácidos de la RHV1 en particular de este genotipo es altamente divergente en los virus aislados del 5-8% de diferencia en la secuencia de nucleótidos y del 4-5% en la secuencia de a.a. (8) .

Serotipo III

Con una enfermedad crónica es más frecuente con este subtipo III. Entre el tipo I y III las infecciones con múltiples serotipos fueron identificados por la tipificación de la estructura no proteínica que por la proteína central. Un grupo de investigadores llegó a la conclusión de que los niveles séricos del RNA viral son bajos comparados con el genotipo II o IV (11,16).

Serotipo IV

Fue el serotipo más común detectado en donadores "sanos", además exhibe una baja prevalencia de anticuerpos anti-Gor, esto puede ser de interés porque puede indicar una tendencia de estos genotipos a producir un leve daño hepático comparado con otros genotipos.

Anti-Gor es un autoanticuerpo que se ha reportado que tiene una especificidad para el VHC y en varios grupos de enfermedades autoinmunes. Este anticuerpo contribuye a

mejorar la diferenciación de la hepatitis crónica (descubrimiento que tiene implicaciones terapéuticas).

Se tiene la propuesta de que anticuerpos, anti-Gor, son una marca severa de una infección del VHC, se reportó que los epítopes de Gor (antígeno nuclear) tiene una corta secuencia de aminoácidos como la proteína central del VHC y se piensa que inducen la producción de autoanticuerpos del VHC (18,23) .

Serotipo VI

Se reporta que la mayoría de individuos infectados con el genotipo VI demostraron también una ausencia de la reactividad a la proteína viral C100-3, en cambio han sido reactivos a la proteína viral c22-3 (22).

Una explicación de esta variabilidad de respuesta serológica es la existencia de más de media docena de cepas del VHC, en su inmunogenicidad y por lo tanto en la respuesta inmune del huésped (1). Es necesario estudiar no únicamente el genoma viral en cada subtipo sino también en cada estado de la enfermedad hepática crónica, cirrosis y cáncer hepatocelular. Así como la relación en cada región geográfica ya que es posible que predomine un subtipo en cada zona (1, 24 y 25) .

Los subtipos del VHC detectados por métodos serológicos pueden contribuir a descubrir las rutas de transmisión del virus especialmente en casos donde las muestras de suero no son almacenadas adecuadamente para preservar el RNA viral o un huésped infectado que no tienen claro si está presente el virus y por lo tanto tiene únicamente trazas o restos de anticuerpos identificados en infecciones pasadas(1).

Un reciente reporte describe la inoculación secuencial con cepas homologas o diferentes a varios Chimpancés con las proteínas virales (E1E2/NS1), obteniendo como resultado la reaparición de la viremia (7) .

Estos trabajos sugieren que el escape viral es debido a la mutación de la envoltura proteínica o epitopes inmunodominantes, y esto puede explicar la reinfección que sufrieron los Chimpancés con el desafío del mismo tipo de virus (22, 27) .

1.4 Transmisión

Un 40% de los casos de Hepatitis C ocurre en dos categorías ambiguas (personas de estado socioeconómico bajo y aquéllos en quienes no se identifican factores de riesgo) Una explicación posible de esto, es el uso de drogas por vía intravenosa (uso de agujas contaminadas) que los pacientes se niegan a confesar. Parece ser que el uso de drogas por

via intravenosa es la forma de transmisión más común del VHC y que explica el 40% de las infecciones (28).

Esto se confirmó con estudios realizados para evaluar los factores de alto riesgo para la infección del VHC en donadores de sangre en Sydney llegando a la conclusión de que una historia de uso de drogas (vía intravenosa) fue el factor de riesgo más importante en este estudio (28) .

Algunas fuentes de infección que en ocasiones se pasan por alto son: tatuajes , tratamientos por medio de acupuntura a inyecciones de vitaminas y minerales. No hay que pasar por alto la exposición posible a productos sanguíneos o sangre contaminada en accidentes y otras lesiones traumáticas, otras formas de exposición parenteral que tienen implicaciones en la transmisión del VHC (25).

Un grupo de investigadores descubrieron el RNA del VHC en saliva de pacientes con infección del virus de la hepatitis no A no B postransfusional, y que la Hepatitis C se transmite experimentalmente a Chimpancés por saliva (29) .

En la actualidad, sólo el 6% de los casos son secundarios a transfusiones. La transmisión heterosexual es frecuentemente menor que en el caso de la Hepatitis B, según los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades (25).

Se ha demostrado que la transmisión (vertical o perinatal) materna de la infección causada por el VHC, tiene una incidencia muy baja (menos del 1%). Es posible que la infección simultánea con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aumente el riesgo de la transmisión materna y quizá-sexual del VHC (1).

Debido a la transferencia de Anticuerpos anti-VHC por vía placentaria, la presencia de estos en la primera etapa de la vida del bebé puede no ser considerada como un indicio o marca serológica real de la infección (1). La transmisión vertical es conocida como un modo de infección más predominante en el VHB que induce un estado de portador de este virus (90).

Se ha reportado que la prevalencia de la positividad del anti-VHC en familiares de pacientes infectados con el VHC fue significativamente mayor que en donadores de sangre de 14.9% y 1.7% respectivamente (30), y por tanto la transmisión de persona a persona del VHC es posible y más probablemente en contacto con personas anti-VHC positivas con daño hepático.

Contradictoriamente se sugiere que la transmisión intrafamiliar niños-madre-sexual con familiares con antecedentes de hepatitis puede ser un modo de transmisión menos probable del VHC. Para resolver esta controversia se deben realizar nuevos estudios epidemiológicos (32).

1.5 Factores de riesgo.

Pacientes inmunocomprometidos semejante como VH I seropositivos y/o pacientes dializados, hemodializados y/o con un transplante renal crónico y la elevación de la alanina aminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvica (ALT o TGP). Todos estos factores correlacionan con un alto valor de positividad del anticuerpo anti-VHC, sin embargo la relevancia clínica y epidemiológica de la presencia del anti-VHC en pacientes hemodializados no es claro (33,34) .

Pacientes hemodializados con Hepatitis no A no B, leve o fase aguda evolucionan a una enfermedad crónica la cual usualmente sigue un curso subclínico (19).

La prevalencia de la infección del VHC tiene como evidencia la detección de anticuerpos únicamente del 1.1% para el transplante y 1.7% para pacientes hemodializados (31) .

1.5.1 Ocupacional

Personal sanitario, como personal de bancos de sangre, laboratorios, quirófanos, urgencias y la práctica dental, incrementan el riesgo probable debido a una predominante exposición ocupacional, esto se comprobó en un estudio realizado a Dentistas. Donde se descartó a los que usaban drogas por vía intravenosa, homosexuales, bisexuales y ningún

dentista que fue seropositivo fue un receptor reciente de transfusiones sanguíneas o productos de este tipo (35) .

1.5.2 Edad

Un análisis revela que la prevalencia de anti-VHC es de 0.9 - 1.2% en adultos, incrementándose con el avance de la edad debido a que es muy bajo en poblaciones menores de 16 años de edad (36) . Por otro lado el 63.6% de hepatitis no A no B postransfusional infantil fue positiva, por lo tanto es mas fácil que un niño en edad escolar sea saludable mientras no este expuesto al VHC, debido a que no puede desarrollar Anticuerpos anti-VHC como respuesta a esta clase de infección, porque su sistema inmune es inmaduro (1).

En Japón se realizó un estudio para determinar la positividad en la detección de anti-VHC en grupos de personas, la prevalencia en hombres fue cerca del doble que la prevalencia en mujeres y la alta prevalencia en ambos sexos fue en el grupo de 30-34 años de edad (37) .

Las múltiples exposiciones de varias cepas del VHC dan como resultado una infección, lo cual incrementa el riesgo de portadores crónicos del VHC (1).

1.6 Evolución clínica

1.6.1 Fase aguda

Suele ser leve, es decir, los títulos de RNA viral en el suero disminuyen marcadamente después del inicio de la hepatitis aguda y sufren una relevación. Los signos son súbitos; elevación moderada de las concentraciones de TGO (transaminasa glutámico oxalacética) y TGP (transaminasa glutámico pirúvica) (25).

La mayoría de los pacientes no experimentan síntomas y escapan a la detección clínica hasta que la enfermedad se vuelve crónica. En casi el 80% de los casos no hay ictericia, el cuadro clínico de la infección aguda sintomática se asemeja a la hepatitis B aguda, síntomas parecidos a los de un resfriado, anorexia, náusea, vómito, malestar general, molestias abdominales y febriles. Esta fase finaliza al inicio de la infección después de 2 a 3 años (38,39) .

1.6.2 Fase ictericia

Se caracteriza por la aparición de ictericia, en la cual las concentraciones de bilirrubinas directa e indirecta aumentan a 5-20 mg/dl y por una hepatomegalia dolorosa que ocasiona molestias en el cuadrante superior derecho. En el 10-20% de pacientes hay esplenomegalia y adenopatía cervical (25).

Durante la convalecencia, el paciente se siente bien y los síntomas desaparecen incluyendo la ictericia; puede ser que siga existiendo cierta elevación en la concentración de las enzimas hepáticas (25).

La recuperación clínica y bioquímica completa ocurre en 3-4 meses en el tipo C, después de la aparición de la ictericia. Durante la convalecencia es preciso vigilar a los pacientes para detectar una recidiva. En el 1-5% de los casos los síntomas y la ictericia vuelve a aparecer. Y hay un riesgo substancial de desarrollar una enfermedad hepática crónica la cual es usualmente asintomática por varios años (25).

1.6.3 Fase crónica

Como ya se mencionó anteriormente la transfusión esta asociada a la transmisión de la hepatitis no A no B en pacientes con una cronicidad y el valor sérico de enzimas hepáticas alto, que evidencia un estado de portador crónico. La cronicidad fue definida como la persistencia de un valor anormal de aminotransferesas por más de un año después de su inicio (25).

La diferencia en la frecuencia de la cronicidad entre pacientes con infección postransfusional e infección del VHC esporádica puede depender sobre el grado o cantidad de inoculos infecciosos en la etapa inicial de la infección, sin embargo, esta hipótesis no es aceptada (26).

El mecanismo de cronicidad de la Hepatitis C es desconocido, sin embargo recientes avances en el análisis de la molécula puede auxiliar a la explicación de esta cuestión. La hepatitis crónica activa se caracteriza por fatiga, malestar general y molestias abdominales, la hepatomegalia y la alteración en las pruebas del funcionamiento hepático incluyendo enzimas (que se incrementan y/o disminuyen o fluctúan en un rango moderadamente alto), bilirrubinas, tiempo de protrombina y globulinas indican el grado de la lesión hepatocelular (36).

1.6.4 Hepatitis fulminante

Se caracteriza por necrosis hepática masiva , es rara, pero la mortalidad sobrepasa el 80%. Aunque puede ocurrir en casos de Hepatitis C y D, mas de la mitad de los casos se observan en la Hepatitis B (25) .

1.6.5 Coinfeccion viral

También se ha observado que el VHC y el VHB pueden producir la infección, en donde el primero puede suprimir la replicación viral del segundo.

1.6.6 Posible mecanismo de supresión del VIH por el VHC

Los resultados de las investigaciones sugieren que las proteínas estructurales del VHC, en particular la Proteína central y la envoltura proteínica (está última probablemente en menor intensidad) pueden suprimir la expresión y replicación del virus de la Hepatitis B (VHB) (13).

Hallazgos preliminares indican que la terminal amino (N) de 122 aminoácidos de la Proteína (Pc) tienen la habilidad de unirse al RNA del VHB, y la demostración de la presencia de Pc son altamente sugestivos de esta función como un gen regulador proteico. Esta fuerte supresión puede ser debido también a los efectos combinados como el decremento de la síntesis del precursor del genoma viral del VHB. Un nuevo examen de las propiedades bioquímicas y biofísicas de la Pc pueden ayudar a delinear el mecanismo molecular de este efecto supresivo sobre el gen de expresión del virus B.

La frecuencia de células infectadas con dos tipos de hepatitis virales, es desconocido y notablemente el descubrimiento clínico de la interferencia entre el virus de la Hepatitis B y C no necesariamente indica una directa interacción entre ambos, posiblemente se involucren varios factores del huésped como el sistema inmune, fagocitosis, efectos de linfocinas entre otras (13).

La relación entre viremia y la elevación del valor de (ALT) puede ser debido a un efecto citopático del VHC o un incremento de la respuesta inmune del hospedador (39).

Observaciones similares se detectan en la hepatitis crónica activa del tipo B. La elevación de ALT es inducida por la replicación viral en el caso de hepatitis debido al VHC con el VHB (41) .

La necroinflamación en Hepatitis no A no B se distribuye homogéneamente mientras que en Hepatitis B es heterogénea. Es raro encontrar portadores de hepatitis C con un hígado sano comparado con la infección del virus de la Hepatitis B, la expresión del antígeno de core es algo similar al de la proteína viral de superficie del VHB (41) .

A diferencia de la Hepatitis B , la Hepatitis C se vuelve crónica en el 50% de los pacientes, por lo menos de los casos de Hepatitis C postransfusional y casi en el 60% de aquellos con Hepatitis no A no B adquirida en la comunidad. En cambio cerca del 20% de cirrosis hepática, hepatitis crónica y cáncer hepatocelular es detectado en portadores del VHB (25).

La incidencia anual de Carcinoma Hepatocelular (CHC) en pacientes reactivos al virus de Hepatitis C con cirrosis fue de 7.4% similar al que se reporta en pacientes reactivos al AgHBs (antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B) (7) .

1.7 Aspectos inmunológicos

El sistema inmune tiene dos tipos de respuesta: la respuesta humoral y la respuesta celular. La primera depende de la interacción entre el antígeno y anticuerpo, siempre que tengan de la interacción entre el antígeno y anticuerpos, siempre que tengan acceso a él , en cualquier forma y circunstancia (tanto soluble, como en una superficie sólida, como puede ser la pared de un microorganismo o una célula). Para que se inicie este tipo de respuesta es necesario la activación de los linfocitos B (que tras su transformación en células plasmáticas serán los encargados de producir los anticuerpos) y de los linfocitos T (que han de producir factores solubles que contribuyan a la activación de los linfocitos B) (43).

La respuesta celular, caracterizada porque se inicia a partir de la activación de los linfocitos T, se ha desarrollado filogénicamente para hacer frente a aquellos microorganismos que por encontrarse en el interior de células de nuestro organismo no son accesibles para los anticuerpos. La respuesta celular va a dar lugar por un lado a factores solubles que activen a las células fagocíticas y les permita superar los mecanismos defensivos de ciertos microorganismos, y por otro, a la proliferación y activación de células citotóxicas, capaces de destruir a las células infectadas si es necesario (como en el caso de células infectadas por virus) (43).

El reconocimiento se realiza sobre porciones muy pequeñas de las moléculas, denominadas determinantes antigénicos o epitopes, y es realizado por los receptores específicos presentes en la superficie de los linfocitos T y B (43).

En los linfocitos B, estos receptores son moléculas de inmunoglobulinas (fundamentalmente IgM e IgD). En los linfocitos T los receptores para el antígeno son los denominados Receptores de Células T (TCR) (43).

Los receptores de los linfocitos T, sólo reconocen y son capaces de unirse a epitopes de antígenos que han sido procesados por una célula que presente un pequeño péptido del mismo en el seno de una molécula de HLA presente en la superficie (44).

Los linfocitos T, entre otras funciones tienen una actividad efectora participando en la lisis de otras células (linfocitos T citotóxicos). Aunque la respuesta humoral depende de la presencia de estos anticuerpos, ellos directamente tienen poca capacidad efectora únicamente son capaces de neutralizar toxinas bacterianas o virus a los que impiden su unión y penetración en la(s) célula(s). Los mecanismos efectores más potentes derivados de la unión del anticuerpo con el antígeno dependen de la activación del sistema de complemento y la intervención de células fagocíticas que, por poseer receptores para productos de la activación del complemento y para el fragmento Fc del anticuerpo, ven considerablemente facilitada su función fagocítica (opsonificación de los microorganismos por los anticuerpos y el complemento) (44).

La respuesta celular también necesita de la cooperación de linfocitos T, mediante la producción de linfocinas, así se facilita la activación de las células efectoras que fundamentalmente son los linfocitos T citotóxicos, la célula NK y los macrófagos (7) .

Sin embargo, esto también abre la posibilidad de que al producirse una respuesta inmune frente a un antígeno extraño, la respuesta inflamatoria que se genera puede acabar lesionando asimismo a los propios tejidos del huésped (43) .

Como ya se menciono anteriormente, el sistema inmune del huésped produce anticuerpos específicos contra el patógeno infectante. Los anticuerpos se unen e inactivan a los viriones (anticuerpos neutralizantes), con esto se origina el primer paso en la interferencia de la replicación viral, se ha establecido que los anticuerpos neutralizantes actúan directamente contra los epitopes de las proteínas virales (que se expresan en la región estructural putativa) (27) .

1.7.1 Análisis de la respuesta de células CD8+

Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) tienen una respuesta marcadamente policlonal y multiespecífica durante una infección crónica con el VHC la célula T CD8+ reconoce a un péptido corto (antígeno de 9-11 aminoácidos) que se unen a la molécula HLA I. El péptido antigénico es un derivado de una división proteolítica en el citoplasma. La molécula de HLA I, la cual esta asociada con la β -2 microglobulina y que es transformada en la superficie de

la célula como una membrana proteínica integral que puede presentar al péptido antigénico que tiende a rearrreglarse con TCR sobre los linfocitos T citotóxicos (CTL), que pueden bloquear el crecimiento viral (27) .

Aunque no es posible determinar el número absoluto de linfocitos T CD8+ en pequeños fragmentos de tejido hepático y sangre periférica, no tienen una aparente diferencia en su habilidad de proliferación después de una estimulación específica (44).

Se ha reportado que la infiltración de linfocitos provenientes del hígado de dos pacientes con hepatitis C crónica fueron clonados, para determinar su actividad citolítica del VHC en el tejido dañado. Desafortunadamente limitaciones numerosas se tienen en el proceso de análisis de estimulación de la respuesta de los (CTL), por la estimulación de péptidos antigénicos cuyo genoma y secuencia han sido clonados y los cuales no son infecciosos, por reemplazo de la estimulación de las células blanco *in vitro* (42).

A continuación se mencionan las desventajas que existen en este proceso:

- a) Se requiere conocer la secuencia de los aminoácidos de la proteína viral en cuestión.
- b) Esta puede ser mas limitada por epitopes presentadores por alelos comunes a HLA. A2.
- c) La pérdida de la potencia de la respuesta de CTL a epitopes no conservados adecuadamente.
- d) Proceso ineficiente y costoso.
- e) La caracterización de la respuesta de los linfocitos CD8+ al VHC es un importante paso para definir el papel de estas células en la patogénesis de la enfermedad.

La conclusión de este trabajo es que la respuesta de los CTL al VHC, es suprimida por la participación de epitopes multiespecíficos involucrados en una estructura diferente del virus y las proteínas no estructurales. El estudio realizado acerca de las uniones de HLA.A2 revelan la posibilidad de que los CTL puedan reconocer al antígeno de core (un pequeño segmento) sobre los hepatocitos en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en hepatitis aguda y crónica; además es posible de que los CTL pueden contribuir a la patología y pueden también ser importantes para monitorear a pacientes infectados para una posible correlación entre hepatitis y la respuesta clínica a este péptido en pacientes positivos a HLA. A2 (7,10) .

En un estudio que se realizó en Alemania a tres pacientes con hepatitis crónica activa, se les practicó una biopsia donde no detectaron CTL en sangre periférica. Varias explicaciones posibles pueden estimarse para esto:

- i) La respuesta local puede también ser disminuida debido al reclutamiento local de antígenos no específicos por células inflamatorias.
- ii) El paciente puede tener una variante de alelos HLA.A2 (reacción cruzada serológicamente), pero que tiene diferente unión a HLA.
- iii) CTL específicos del VHC pueden ser secuestrados en el sitio de la infección (hígado) y por lo tanto pueden no ser detectados en la sangre periférica (7) .

1.7.2 Análisis de la respuesta de los linfocitos CD4+ al VHC.

Los resultados obtenidos en los estudios de proliferación de la célula T CD4+ como respuesta de las células mononucleares provenientes de la sangre periférica y/o la población de linfocitos intrahepáticos y a las proteínas recombinantes derivados del VHC que pueden ser inmunogénicas , así como todos los epitopos de las proteínas virales putativas (región putativa) que son reconocidos durante la infección crónica de los pacientes (42).

Se realizaron estudios de las células mononucleares de la sangre periférica de tres pacientes, que respondieron a E2, NS3, NS4 Y NS5, la clona específica NS4 derivó de la sangre periférica y tiene diferentes TCR(s) que la clona intrahepática, sugiriendo una división de la repuesta del linfocito T a la enfermedad (42).

Se identifico la proteína de core E2 como un blanco específico de CTL en personas infectadas crónicamente (44).

Después de un tiempo se observo que la Proteína central y la Proteína NS4 puede ser más inmunogenica a CD4+ de la sangre periférica al igual que la célula T, durante la infección crónica del VHC, de ahí la evidencia de que la respuesta es específica a NS4 (44).

La célula T CD4+ humana reconoce un corto péptido antigénico derivado de la división proteolítica de antígenos exógenos presentes en la unión antigénica "rutinaria" de

las moléculas de HLA clase II en la superficie del fagocito para presentar al antígeno a las células semejantes a macrófagos y células B (44).

1.8 Mecanismo de daño Hepático inducido por el VHC.

El daño hepático puede ser categorizado como el que es causado por conocidos virus semejantes como Hepatitis A, B, D o E y toxinas similares como acetaminofen y ketoconazol, entre otros (45).

Como ya se mencionó anteriormente, la Hepatitis C crónica representa un factor etiológico importante para padecer cirrosis y carcinoma hepatocelular (25) .

El mecanismo exacto del daño hepático todavía no se conoce bien, y varias observaciones clínicas subrayan la contribución de la respuesta inmune del huésped al daño celular del hígado por ejemplo: la inmunosupresión que beneficia el efecto dañino sobre las células hepáticas (42).

Además este virus tiene una reciente asociación con la patogénesis de hepatitis crónica autoinmune (44) .

Es interesante el dato reportado de que más de la mitad de los pacientes infectados con el VHC estudiados tienen una expresión de células CD19+/CD5+ en la sangre periférica, la población de células B es asociada con trastornos autoinmunes semejantes a la artritis reumatoide, cirrosis y carcinoma primario hepatocelular. Mas una variedad de trastornos extrahepáticos semejantes a glomerulonefritis, poliartritis y crioglobulinemia (7,46,47 y 48) .

Respecto a este último trastorno extrahepático mencionado, recientes estudios cuantitativos, demostraron que el 99% del RNA del VHC se detecto en el suero de pacientes con crioglobulinemia (47).

Un reciente estudio histopatológico de una biopsia hepática, demostró la presencia de agregación linfocítica y/o folículos en el tejido y una débil necroinflamación en el área portal características de una hepatitis crónica (49) . La necroinflamación es considerada determinante para la respuesta activa inmune contra la replicación viral. La débil necroinflamación en ambas fases aguda y crónica parece reflejar una endeble replicación del virus, la necrosis hepatocelular es siempre asociada con esta característica histológica denominada necroinflamación que es comúnmente observada en todos los tipos de hepatitis virales causadas por virus semejantes: adenovirus, virus de Lassa, fiebre amarilla, los cuales tienen un efecto citopático directo que difiere a los efectos del VHC (24).

Histológicamente la regeneración es caracterizada por pleomorfismo y polimorfismo de hepatocitos. La severa necroinflamación particularmente en una hepatitis aguda viral

frecuentemente es acompañada con una marcada degeneración (daño) de los hepatocitos alrededor de la necrosis. Esto incluye inflamación, tumefacción del ácino, debido a la adhesión multinuclear de la membrana celular y disposición de la bilis en el citoplasma o dilatación canicular biliar (50) .

Los cambios de los ductos biliares, alrededor del hepatocito y el espacio portal desaparecen, y los restos de los hepatocitos se transforman. Los ductos biliares (interlobulares) frecuentemente sufren daño variable, particularmente cuando en ellos se fija el tejido linfocítico. Así la parénquima llega a ser una composición de un mosaico de una población de hepatocitos heterogéneos en edad y forma. Este es un término irregular de regeneración y realiza un incremento prominente en el progreso de desordenes hepáticos (42).

La fibrosis se extiende desde la vena portal, naturalmente es fácil que la fibrosis se desarrolle continuamente desde el preexistente tejido fibroso. Esto ocurre en el caso de una larga o repetida necrosis.

En resumen los elementos morfológicos en la hepatitis viral son:

- 1) Necroinflamación.
- 2) Regeneración hepatocelular.
- 3) Reacción inflamatoria del espacio portal.

- 4) Cambio en los conductos biliares.
- 5) Regeneración irregular y
- 6) Fibrosis.

La hepatitis viral aguda es acompañada predominantemente por las características que comprenden el inciso 1-4, y la hepatitis crónica viral por determinado tiempo. La Hepatitis Crónica Viral Activa (HCVA) comprende todos los elementos en un grado variable (42) .

La acumulación de mutaciones, las cuales son fáciles de que ocurran en ciclos continuos de división celular pueden transformar eventualmente algunos hepatocitos a un proceso continuo. La disfunción de enzimas reparadoras del DNA durante la hepatitis crónica pueden también promover el desarrollo de carcinoma hepatocelular (24).

Se reporta que el VHC no realiza la actividad de transcripción y el análisis del tejido con cáncer hepatocelular no demostró la integración del genoma del VHC dentro del cromosoma del DNA del huésped. Y por lo tanto la teoría de inserción que produce mutagenesis o un modelo de intersección por un promotor no puede ser aplicado, debido a que la proteína viral unida al DNA(s) del huésped induce inestabilidad cromosomal causando mutaciones en el gen de cáncer y esto puede llevar eventualmente a desarrollarlo (24) .

La infección del VHC es persistente arriba del 50% de casos; en análisis actual se calcula que el riesgo para el desarrollar cirrosis fue de 40% en 5 años y el 68% en 8 años, después del inicio de la fase aguda. De las personas con hepatitis crónica, la cirrosis se desarrollo del 10-20% y se calcula que en el 70% de los pacientes cirróticos que se encuentran anticuerpos anti-VHC o RNA viral. Hay evidencias que hacen pensar que la Hepatitis C podría ser la causa que conduce a la cirrosis a los alcohólicos y a su vez pueden ser que el alcohol sea "potenciador" de la hepatitis C (25) .

Se ha reportado que la cirrosis del hígado se desarrollo en 8 pacientes (10%) entre 1.5 y 16 años después de la transfusión de sangre. Por lo tanto la cirrosis del hígado y Cáncer Hepatocelular (CHC) pueden desarrollarse cerca de 20 y 30 años, respectivamente, después del inicio de la enfermedad aguda (26).

La incidencia del tipo CHC en pacientes con hepatitis crónica activa fue significativamente alta como en pacientes con hepatitis crónica persistente (36) . En 1979 se estimo la incidencia de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular en 1.2 millones, 250,000 y 18,000 respectivamente. El valor de mortalidad provenientes de CHC sin embargo se fue incrementando y fue superior en 1990 (1) .

1.9 Diagnóstico de Hepatitis C

El valor de las pruebas serológicas y el índice bioquímico son predictivos de la infección activa. Si las concentraciones de transaminasas continúan elevadas y las pruebas serológicas para detectar Hepatitis B son negativas, será conveniente practicar pruebas para detectar Hepatitis C (19) .

Si los resultados son negativos, repita la prueba dentro de 3-6 meses debido a que la seroconversión es retardada y es necesario repetir la prueba de anti-VHC durante mucho tiempo antes de descartar que la hepatitis sea causada por el virus de la Hepatitis C. Los anticuerpos contra el VHC sólo pueden ser detectados hasta 6-8 semanas después de la infección (25). La Hepatitis no A no B fue diagnosticada entre la segunda y 26 semana después de la transfusión (51) .

Un descubrimiento retrospectivo de elevación de Alanina aminotransferasa (ALT) fue correlacionado significativamente con la positividad del anti-VHC pero no con la viremia del VHC (19) . Los cambios en el suero de aminotransferasas fueron observadas de 5 a 10 años asociados con una progresiva cirrosis del hígado (38) .

La mediana actividad de la aminotransferasa en el suero se eleva de 4-8 semanas después de la transfusión . Cabe señalar que 3-17 días el valor de ALT se eleva al mínimo del doble del límite superior normal. Un año después el valor de la aminotransferasa en el

suelo es aproximadamente tres veces mayor que el valor normal, 10 años después es > 1.5 veces el límite superior de lo normal.

Los niveles de las transaminasas retornan en 18 meses después de la transfusión. Es necesario aclarar que no tienen un valor predictivo de una infección del VHC (51).

1.9.1 Marcadores serológicos

Los principales indicadores serológicos de pacientes infectados con el VHC, que son utilizados para el diagnóstico de la Hepatitis C son el RNA viral y varios anticuerpos anti-VHC de la clase Ig (1).

El sistema de ensayo para detectar anticuerpos contra el VHC detecta principalmente IgG, recientemente la prueba de segunda generación también detecta anticuerpos de la clase IgM (anticuerpos anti-Proteína central del VHC) que pueden ser detectados en algunos casos de hepatitis crónica en alto grado y por esta razón solamente pueden ser usados como un punto de diagnóstico de Hepatitis C (52). También la IgG no es adecuada para el uso en un primer diagnóstico de la Hepatitis C aguda, porque la aparición ocurre igual al comienzo o al final de esta enfermedad (41).

El curso de Hepatitis C fue dividido en una infección persistente y transitoria basándose en los cambios del RNA viral. Varios individuos asintomáticos tienen niveles

normales de ALT y/o AST pero es positivo la detección del RNA del VHC este descubrimiento representa un daño hepático del virus en un sitio secundario (49) .

En el primer estado de Hepatitis C aguda IgM es positiva e IgG es negativa la detección es de bajos niveles. En Hepatitis C crónica IgG esta presente en altos niveles, independientemente de la presencia o ausencia de IgM (15). Es posible diferenciar los dos periodos por medición del RNA viral y también por un ensayo cuantitativo de segunda generación que detecte anticuerpos anti-VHC o anti-core, por la disminución en la infección transitoria y un alto nivel que es mantenido en una infección persistente.

Se ha reportado que el descubrimiento de que los titulos de anticuerpos anti-core en portadores asintomáticos fue consideradamente variable en 17 individuos exhibiendo niveles normales de ALT y AST y titulos de anticuerpos extremadamente altos o muy bajos. El alto nivel de anticuerpos puede sugerir que los portadores asintomáticos no son un grupo uniforme (53) .

Los anticuerpos contra la proteína E2 son detectados del 10% al 20% en pacientes con Hepatitis C. Estas observaciones indican que el anticuerpo anti-E1 pueden tener una actividad neutralizante. En varias infecciones virales la aparición de anticuerpos neutralizantes coinciden con el comienzo de la recuperación de la infección y estos pueden jugar un papel importante para eliminar a los virus que provienen de la circulación en infecciones que son características por viremia (27) .

La presencia de anticuerpos anti-C100-3 no es instrumento de diagnóstico completamente seguro. El anti-C1003 puede declinar a pesar de la persistencia del RNA viral en la actividad de hepatitis (1) .

Por esta razón las pruebas de segunda generación ELISA y/o inmunoelectrotransferencia (Iet), para detectar anticuerpos (IgG) contra el virus de la Hepatitis C, aunado a pruebas para detectar el RNA (Reacción en Cadena de la Polimerasa y/o Transcripción Reversa) son necesarias (30) .

La PCR es útil para los pacientes que se encuentran en las primeras etapas de la Hepatitis C aguda ya que esta prueba se vuelve positiva dentro de la segunda semana después de la infección (29)

Todas estas pruebas han permitido que el diagnóstico de Hepatitis C sea menos de exclusión como hace algún tiempo. Sin embargo su diagnóstico es difícil (15,51). Existen ensayos que necesitan ser modificados por el descubrimiento de más genotipos del VHC (22)

Las pruebas para detectar el virus no A no B son menos precisas, debido a que los pacientes suelen permanecer asintomáticos y las fluctuaciones características en las concentraciones de las transaminasas añaden un elemento adicional de confusión. La mayoría de los hepatólogos recomiendan practicar una biopsia confirmatoria seis meses después de realizar el diagnóstico inicial de hepatitis crónica (25,36) .

Por lo tanto estos ensayos complementarios pueden ser necesarios para confirmar una infección del VHC antes de informar al donador o paciente (3,54) .

1.9.2 Métodos de detección del VHC

Un nuevo ensayo inmunoenzimático con varios antígenos EIA-2 para detectar anticuerpos anti-VHC fue evaluado paralelamente con un ensayo EIA-1. Y el primero fue más sensible en detectar anticuerpos en donadores de sangre (56). Esto indica que el ensayo de EIA-2 reduce significativamente pero probablemente no elimina el riesgo de una infección con el VHC asociada a la transfusión sanguínea (55).

Se proyecta a nivel nacional el reemplazo de este ensayo por EIA-2 que puede originar la prevención y disminuir por lo menos de 40 casos adicionales del virus de la Hepatitis C asociados a transfusiones por día (55).

El EIA de segunda generación es más fácil de aceptar para el uso en una clínica. Sin embargo esta especificidad es cuestionable comparada con el ensayo de inmunoelectrotransferencia de segunda generación (52) .

Se está intentando el desarrollo de un ensayo IET el cual pueda ser usado potencialmente como una prueba complementaria de EIA.2 en el diagnóstico de la Hepatitis C aguda. Estos estudios sugieren que un bajo título de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C (en el primer nivel de la infección) no puede ser detectado por EIA.2 (56).

A pesar de que el ensayo de Iet es semicuantitativo y puede probablemente detectar únicamente anticuerpos que reconocen la primera estructura de las proteínas por lo tanto es necesario un mejoramiento para emplearla como una prueba de rutina, la ventaja de este método es que pueden cuantificar los anticuerpos mucho más fácil que otros, porque es altamente sensible y por consecuencia puede monitorear los cambios de títulos de anticuerpos durante un largo curso clínico, y como prueba de la efectividad de la terapia del Interferón (IFN).

1.9.3 Inmunoelectrotransferencia

Iet.2 esta constituida por cuatro péptidos virales recombinates derivados de la región NS3 no estructural (antígeno c33c) producido en *Escherichia coli*, NS4 , el antígeno 5-1-1 y c100-3, regiones del genoma del VHC y de la región estructural central o nucleocapside (Ag c22-3) unida a la superoxidasa dismutasa humana producida en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*(40).

Se ha reportado que la nueva introducción del péptido NS5 no mejoro la sensibilidad o especificidad de Iet.2. La precisión del análisis de Iet se ha reportado que es de un 90%. Y casi todos los pacientes reactivos son virémicos, sin embargo este ensayo esta sujeto a un intenso debate acerca de si es un buen indicador de viremia o no (38) .

Se han realizado estudios de evaluación, para el ensayo de Iet.2 e Iet.3. Con este ensayo de tercera generación la prevalencia de anticuerpos observada es generalmente más alta que con el ensayo de segunda generación, esto probablemente se deba a la incorporación de los diferentes segmentos de varias regiones virales. Estas modificaciones junto con cambios en el procesamiento técnico mejoran la especificidad del ensayo (18,40,56).

De acuerdo a las instrucciones de manufactura de Iet.2 es considerado positivo, cuando se detecta como mínimo dos de los cuatro anticuerpos, negativo cuando no se detecta ningún anticuerpo e indeterminado cuando únicamente está presente un tipo de anticuerpo (40).

Sin embargo los pacientes con un resultado indeterminado (probablemente el título de anticuerpos real es muy bajo) por Iet.2 tienen que ser confirmados con la demostración del RNA viral por la PCR(40).

1.9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa y/o Transcripción Reversa.

La PCR se ha utilizado en la detección del genoma del VHC en pacientes empleando muestras como suero o fragmentos hepáticos en pequeñas cantidades (48).

El método de PCR puede ser usado para valorar la persistencia del RNA viral y la presencia de la infección crónica, sin embargo el genoma viral puede no ser detectado de manera transitoria (40).

A pesar de que el RNA viral del virus de la Hepatitis C no es detectado por la PCR-RT en muestras séricas puede ser positivo la detección de anticuerpos anti-VHC (40).

La viremia puede ser valorada por la detección del genoma viral usando PCR-RT, en el cual es altamente sensible, como ya se menciono anteriormente. La sensibilidad del ensayo de PCR-RT para detectar el RNA viral fue confirmada por hibridación del DNAc. (DNA complementario a partir del RNA completo de polaridad positiva). Además es usada para estudios epidemiológicos aparte de detectar el genoma viral, este método es usado en la genotificación del VHC, para la caracterización e identificación del virus de la Hepatitis C aislados, y así para el análisis de la mutación que sufren (3).

La variación de los niveles séricos del genoma viral es determinado semicuantitativamente por el método de PCR-RT. Realizar una determinación especialmente es difícil cuando hay bajos niveles del RNA durante el tratamiento con el Interferón o justamente después de completar el tratamiento (41).

Ahora está disponible y resulta muy útil en los casos dudosos (hepatitis aguda), una prueba más sensible y precisa, da como resultado diagnósticos más confiables a medida que aumente la disponibilidad y el uso de la PCR (49).

Desafortunadamente este equipo de prueba no es fácil de usar o raramente se usa en una clínica. La PCR emplea una tecnología, la cual necesita un equipo específico, experiencia y estandarización. Como es sugerido por un reciente estudio de control internacional cualitativo, en el que se demostró una importante discrepancia en los resultados obtenidos por los diversos laboratorios que participaron (20). Esto se ve confirmado por reportes, de un tercer estudio realizado en Japón donde dio diferentes valores .Reportando una baja prevalencia (22%) de viremia en pacientes con anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C que fueron detectados. La diferencia puede ser debida a las poblaciones estudiadas y el procedimiento del uso de PCR-RT, puede explicar estas discrepancias (22).

1.10 Vacuna

Por lo tanto la prueba de donadores de sangre se dirige a reducir el número de casos de Hepatitis C postransfusional, pero no elimina la esporádica adquisición de la Hepatitis del virus C. De ahí la necesidad de una vacuna para prevenir o tratar la infección viral. Es de interés apreciable el conocimiento de que los epitopes reconocidos por los linfocitos T

citotóxicos específicos del Virus de la Hepatitis C puedan facilitar la elección de las bases de vacunas péptidicas para su inducción (42).

1.11 Tratamiento de la Hepatitis C

El único tratamiento aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y el único cuya eficacia ha sido demostrada, es el interferón β -2.

El régimen consiste en aplicar tres millones de unidades por vía subcutánea tres veces a la semana durante seis meses. Ese régimen conduce a la remisión clínica al 40-50% de los pacientes tratados, pero la enfermedad activa recurre en el 70-80% de los pacientes que entran en remisión en los primeros 6-12 meses que transcurren después de suspender el tratamiento. Se están estudiando varios protocolos de investigadores sobre el interferón α - β 2. Algunos comienzan con el régimen mencionado anteriormente, y disminuyen la dosis gradualmente después de seis meses. A continuación los pacientes siguieron recibiendo un tratamiento de mantenimiento a la dosis más baja que resulte eficaz (25).

Otro método consiste en iniciar con una dosis más alta y continuar con ella hasta que no sea posible detectar el RNA del virus de Hepatitis C por medio de la PCR. A partir de entonces se disminuye la dosis gradualmente en el transcurso de varios meses antes de sostener el tratamiento (25).

Se ha probado numerosas terapéuticas antivirales y de otro tipo para la Hepatitis C con éxito mínimo o nulo. Los tratamientos incluyen diversos agentes utilizados para la infección causada por el VIH, diversas terapéuticas combinadas con interferones (25).

1.11.1 Interferones

Función:

Los interferones humanos son proteínas de bajo peso molecular producidas, por ciertas células del organismo en respuesta a un estímulo de células extrañas (incluyendo células tumorales), bacterias, antígenos virales y una variedad de estímulos. Existen tres tipos de interferones conocidos como alfa, beta y gama (57).

El interferón alfa es sintetizado fundamentalmente en los linfocitos y macrófagos, mientras que las células epiteliales y los fibroblastos son los principales productores de interferón beta(57).

Interferón alfa y beta se unen al mismo receptor en sus células blanco, el interferón gama o interferón inmune que es producto exclusivamente por las células NK, se une a su receptor específico y posee una serie de funciones particulares que lo diferencian de otros interferones, especialmente por su rol fundamental como regulador de los mecanismos de defensa específicos y no específicos del hospedador (57).

Los interferones tienen efectos directos antivirales e inmunomodulatorio que pueden incluir el mejoramiento de la función de macrófagos, células citotóxicas T y la actividad antiviral natural de las células Killer (NK) (57).

Algunos resultados sugieren que el interferón endógeno produce primero la lisis del hepatocito infectado con el VHC, por células citotóxicas T y la restricción de la replicación de este virus, y simultáneamente activa o induce a la 2'5'OLIGO ADENILATO SINTETASA (2'5'AS), esta enzima que rompe por la parte inferior del RNAm viral o inhibe la iniciación de la síntesis proteica del virus y por la desaparición de hepatocitos infectados, por el cual el virus de la Hepatitis C es también eliminado (31).

Y su actividad se incrementa significativamente durante la terapia con el interferón y también la expresión del antígeno de HLA clase I expresado en los linfocitos de la sangre periférica, fue significativamente intenso en pacientes con Hepatitis del tipo B o C comparado con los controles positivos y negativos (31).

Casi todos los individuos quienes tuvieron una buena respuesta al tratamiento con el IFN, no se les detectó el RNA viral no obstante que se tienen niveles intermedios de anticuerpos anti-core, su presencia puede ser en este caso explicado por la memoria celular o por lo largo de la vida media de los anticuerpos (49).

Se ha reportado que aunque el tratamiento con el interferón da como resultado la reducción de TGP a niveles normales de varios pacientes el tratarlos de nuevo con este fue necesario tiempo después, debido a la elevación de ALT que ocurre con la suspensión del tratamiento. Con una alta dosificación en el régimen cerca del 90% de la respuesta del RNA viral es negativo mientras que el RNA esta en bajas concentraciones en pacientes tratados con un régimen de dosificación baja. Estos resultados sugieren la normalización de ALT puede ser realizado después de un tratamiento completo (58).

Dependiendo del tratamiento del IFN y el régimen usado como fue descrito anteriormente. los factores que predicen la respuesta del pretratamiento del IFN, son el grado de daño del hígado (hallazgos histológicos), el nivel sérico del RNA y genotipo del VHC. Aunque la severidad de la necroinflamación o reacción linfocitaria portal no es correlacionada con eficacia del tratamiento con el interferón (22,41 y 42).

En un estudio que se realizó para evaluar la concentración sérica del IFN alfa, se observó en 7 días y 28 días la máxima concentración sérica que se considera se alcanza en este periodo. En el día 56 las concentraciones séricas del interferón fueron menores, estos resultados indican que la degradación del INF ocurre progresivamente (durante su administración). Por lo tanto no es utilizada efectivamente (58).

Se ha reportado que en el caso del interferón beta el cual es administrado intravenosamente en Japón dio como resultado en un corto periodo de tiempo, un continuo

y mejor grado de respuesta. Aunque nuevos estudios se requieren sobre el régimen de dosificación de este interferón (58).

1.12 Reacciones adversas asociadas con el tratamiento del IFN

El síndrome Flulike ocurre en pacientes casi siempre tratados con el Interferón (INF). Además produce síntomas siconeuróticos, depresión y desordenes autoinmunes semejantes a la función anormal tiroidea debido a la conmoción inducida por el interferón en el sistema inmunológico, aunque es difícil decir que en todos los casos de funcionamiento anormal tiroideo son relacionados con la administración del INF(58).

Este funcionamiento anormal en la mayoría de los casos se piensa que puede ser debido a una tiroiditis autoinmune, neumonitis intersticial reumatoide y psoriasis (58).

Se reporto que los síntomas siquiátricos observados en 113 pacientes, fueron los siguientes: de 101 manías, en 3 depresión, en 2 síntomas esquizofrénicos y en 6 demencia. Estos síntomas usualmente comienzan con insomnio, irritabilidad o ansiedad sin causa aparente, también se ha reportado que en la administración del IFN continuo, se manifiesta depresión, confusión y alucinación, lo cual ueden no presentarse en algunos pacientes(58).

Se han reportado otros padecimientos como colitis ulcerativa en un paciente, trombocitopenia autoinmune y enfermedad de RAYNAUD en otro (58).

Más casos de Diabetes mellitus presentaron exacerbaciones después de iniciar la administración del interferón. Debido a la inducción de varias citocinas por un efecto directo e indirecto de este medicamento, su mejoramiento completo fue por una pronta suspensión en la administración del interferón (41).

2.0 Hipótesis

Si se detecta en los donadores de sangre problemas infectocontagiosas, principalmente por la presencia del Virus de la Hepatitis C (VHC), ya que en múltiples ocasiones está se presenta sin signos, ni síntomas propios de la enfermedad, y que al presentarse como donador aparentemente sano, entonces podría transmitir el virus de la Hepatitis no A no B, por lo cual es importante el diagnóstico de esta enfermedad.

3.0 Objetivos

3.1 General:

- Determinar la incidencia del Virus de la Hepatitis C (VHC) en donadores de sangre y corroborar la importancia de realizar el diagnóstico de esta enfermedad.

3.2 Particulares:

- Conocer la distribución mensual de sueros positivos a la detección del VHC para determinar su incidencia durante el tiempo que comprende el estudio, por medio del ensayo Inmunoenzimático de segunda generación (ELISA.2).

- Observar la tendencia de la incidencia del VHC durante el periodo que comprendió el estudio.

- Determinar la incidencia del VHC en donadores de sangre del sexo masculino y femenino.

4.0 Material y Método

4.1 Lugar de muestreo

Este trabajo se realizó en el laboratorio de análisis clínicos del HOSPITAL DE TRAUMATOLOGIA Y ORTOPEDIA DE LOMAS VERDES (H.T.O.L.V.).

4.2 Período de estudio

La detección del virus de la hepatitis C fue considerada de enero de 1994 a enero de 1996. Y la técnica que se empleó fue ABBOTT HCV E.I.A. de segunda generación.

4.3 Material biológico

Los donadores fueron principalmente familiares de los pacientes del mismo hospital, así como algunos donadores altruistas, la disponibilidad de donadores de sangre segura, continua siendo un problema grave, a pesar de las disposiciones legales relativas a la prohibición de bancos privados de sangre y con ello evitar la existencia de donadores profesionales, la realidad es que este tipo de donadores sigue existiendo mediante arreglos que se realizan fuera de los servicios hospitalarios de transfusión.

4.4 Manejo del donador

A la persona que desee suministrar su sangre se le practicará una evaluación clínica en la que se determine que reúne los requisitos siguientes:

- a) Edad entre 18 y 60 años
- b) Peso mayor de 50 kilogramos
- c) Tratándose de mujeres, no estar embarazadas ni lactando
- d) Sin antecedentes de:
 - Hepatitis
 - Enfermedad de Chagas
 - Brucelosis
- e) Sin antecedentes de paludismo en los últimos tres años
- f) En los últimos seis meses, sin antecedentes de:
 - Cirugía mayor
 - Parto
- g) En el último año, sin antecedentes de:
 - Acupuntura
 - Transfusión de sangre
- h) No practicar la prostitución y no ser homosexual o bisexual.
- i) Individuo clínicamente sano.
- j) Con cifras mínimas de hemoglobina o hematócrito de acuerdo con el parámetro ya establecido

En el supuesto caso de ser positivo ó que no cumpla los puntos anteriores, se rechaza su donación.

4.5 Manejo de la muestra

Minutos antes de la extracción de la sangre de donación, al donador, se le extrae una muestra de sangre aproximadamente 5 ml como ya se menciona anteriormente, se debe determinar, la concentración de hemoglobina, hematócrito, grupo sanguíneo, Rh, siendo estos los parámetros que si no son los requeridos la donación se rechaza. Posteriormente y a más de tardar de 24 horas después del sangrado se realiza la detección de VIH, HBsAg, HBcAg, V.D.R.L., B. A. y HCV.

Dichas determinaciones se hacen con el suero de las muestras previas. Todas las unidades positivas a estas pruebas serológicas, serán esterilizadas y se incineran sistemáticamente. A excepción de sífilis (*Treponema pallidum*), que no suelen ser un problema para los bancos de sangre, porque esta espiroqueta no sobrevive más de 24 horas en la sangre citrada y mantenida a cuatro grados centígrados, por ello, solamente las sangres "frescas" podrán transmitir la enfermedad.

4.6 Material de vidrio y equipo

Tubo vacutainer para la toma de muestra sin coagulante, pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml, placas de reacción, folios adhesivos, tubos de ensayo con portatubos de identificación, pipetas de precisión para suministrar 10, 200, 300 y 400 mL, Centrifuga marca Beckman, analizador Quantum, baño Maria, dispositivo para suministrar la solución de lavado tal como una bomba distribuidora Gorman-Rupp, un Qwikwash (sistema para el lavado de esferas) con una fuente de vacío, para retener el material aspirado y mantener un vacío adecuado, un distribuidor de una sola esfera y múltiples, un fórceps no metálico blanco.

4.7 Reactivos

Reactivo OPD (o-fenilendiamina. 2HCl), ácido sulfúrico 1N, ácido sulfúrico 6N.

PRUEBA SEROLOGICA PARA DETECTAR EL VHC

ABBOTT HCV E.I.A. de segunda generación en un ensayo inmunoenzimático *in vitro* para la detección de anticuerpos contra el VHC en suero o plasma humano.

4.8 Principio del procedimiento de (ELISA 2)

En esta prueba se diluye suero o plasma humano y se incuba luego con una esfera de poliestireno recubierta de antígeno recombinante (*Escherichia coli*, levaduras) del VHC. Si la muestra contiene anticuerpo, las inmunoglobulinas de la muestra del paciente se fijan a la esfera.

Después de eliminar los materiales no unidos y del lavado de la esfera sólida, incubando el complejo esfera-antígeno-anticuerpo con una solución que contiene anticuerpo de cabra, dirigidos contra las inmunoglobulinas (cadena pesadas y ligeras) humanas y marcadas con peroxidasa de rábano picante.

Después se elimina el conjugado enzimático no unido y se lavan las esferas. A continuación se agrega a la esfera una solución de o-fenilendiamina (OPD) que contiene peróxido de hidrógeno, y después de la incubación se desarrolla un color amarillo-anaranjado, cuya intensidad, es directamente proporcional a la cantidad de anti-VHC unido a la esfera.

4.9 Procedimiento del ensayo de (ELISA 2)

4.9.1 Dilución de muestras

Distribuir 10 mL de cada control o muestra en el fondo de una placa de predilución, agregar 400 mL de diluyente de muestras y mezclar, transferir 200 mL de cada muestra o control diluido a la cavidad correspondiente de la placa de reacción.

4.9.2 Primera incubación

Añadir una esfera en cada cavidad que contenga una muestra o un control diluido, cubrir con un folio adhesivo y agitar, incubar a 40 +/- 5 minutos en un baño María o en un Commander, retirar el folio adhesivo, aspirar el líquido y lavar cada esfera con agua destilada para completar un volumen total de lavado de 11 a 18 ml.

4.9.3 Segunda incubación

Pipetear 200 mL de conjugado en cada cavidad que contenga una esfera, cubrir con un nuevo folio adhesivo, incubar a 40 +/- 2 ° C durante 30 +/- 2 minutos, retirar el folio adhesivo, aspirar el líquido y lavar cada esfera como en la primera incubación.

4.9.4 Desarrollo de color

Transferir inmediatamente las esferas a tubos de ensayo debidamente identificados, pipetear 300 mL. de solución de sustrato OPD recién preparado en dos tubos vacíos (blanco de sustrato) y después en cada tubo que contenga una esfera.

NOTA: Purgar el distribuidor antes de suministrar la solución OPD, cubrir e incubar a la temperatura ambiente durante 30 +/- 2 minutos, agregar 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo.

4.10 Lectura

Ajustar el cero del espectrofotómetro con un blanco de sustrato a 492 nm, determinar la absorbancia de los controles y de las muestras a analizar a 492 nm dentro de las dos horas que siguen a la adición del ácido.

4.11 Cálculo de resultados

- Cálculo de la absorción del control negativo (NCX).
- Cálculo de la Absorción promedio del control positivo (PCX).
- Cálculo del valor límite: Valor Límite = $NCX + (0.25) PCX$

4.12 Interpretación de los resultados

La presencia o ausencia del VHC se determina por comparación de la absorción de la muestra con el valor límite. El valor límite es la absorción del promedio de los controles negativos más el factor 0.25.

Las muestras con valores de absorción iguales o superiores al valor límite se consideran reactivas.

La interpretación puede ser cualitativa, que consiste en tan sólo comparar la coloración del pozo de la muestra con los pozos positivos y negativos.

5.0 Resultados

Los resultados obtenidos de la detección del virus de la Hepatitis C, por el ensayo inmunoenzimático de segunda generación (ELISA. 2), fue realizado en el Hospital de Traumatología y Ortopedia de Lomas Verdes (H. T. O. L. V.) El periodo comprendió dos años de estudio. Se obtuvieron 5111 muestras de donadores de sangre de las cuales, 52 muestras fueron seropositivas. Para el análisis de estos datos obtenidos; se organizaron, resumieron y se representaron gráficamente por años (número de donadores, seropositivos y porcentaje)(Tabla. 2).

Tabla. 2. Donadores totales y seropositivos durante el tiempo que duro el estudio.

MES	NUMERO		SEROPositIVOS		PORCENTAJE %	
	1994	1995	1994	1995	1994	1995
ENERO	172	-	1	-	0.58	-
FEBRERO	168	138	2	3	1.19	2.17
MARZO	203	143	0	1	0.00	0.69
ABRIL	259	163	3	1	1.16	0.61
MAYO	189	160	2	1	1.06	0.63
JUNIO	272	219	3	3	1.47	1.37
JULIO	216	205	5	3	2.31	1.46
AGOSTO	234	295	1	2	0.85	0.68
SEPTIEMBRE	210	232	0	4	0.48	1.72
OCTUBRE	263	242	2	1	0.76	0.41
NOVIEMBRE	212	283	3	3	1.42	1.06
DICIEMBRE	169	166	0	1	0.00	0.60
ENERO (96)	-	298	-	4	-	1.34
TOTALES	2567	2544	25	27	-	-

En esta tabla se organizó y resumió los datos obtenidos, observamos que en el primer año se tuvo un número un poco mayor de donadores de sangre (2567) que en el segundo año (2544), y un mayor número de casos positivos en este último año.

Los casos positivos detectados mensualmente se representan en porcentaje (%), donde se observa una gran variabilidad (entre 0.00% y 2.013) de la seropositividad.

Para poder observar mejor los datos se hicieron figuras en donde las variables son, tiempo contra número de donadores, seropositivos y porcentaje (%) de seropositivos (Figura 2,3 y 4)

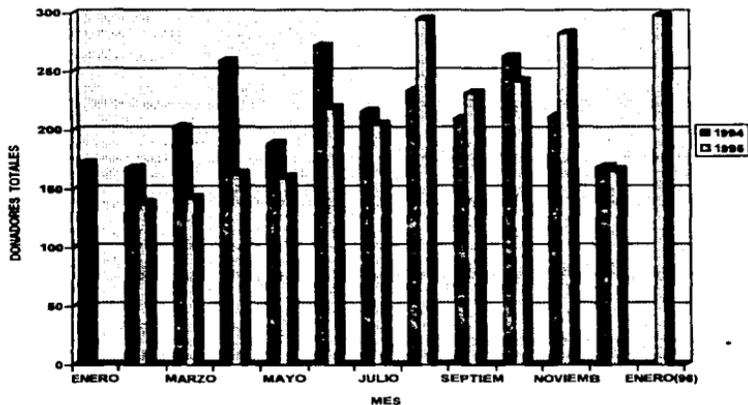


Figura 2. Donadores totales durante el tiempo que duro el estudio.

Como se puede apreciar el número de donadores de sangre varía y se ve incrementado en los meses de (Abril, Junio y Octubre) cercanos a la mitad del primer año. Al contrario del segundo año, donde se observa un aumento principalmente en Agosto y Enero de 1996.

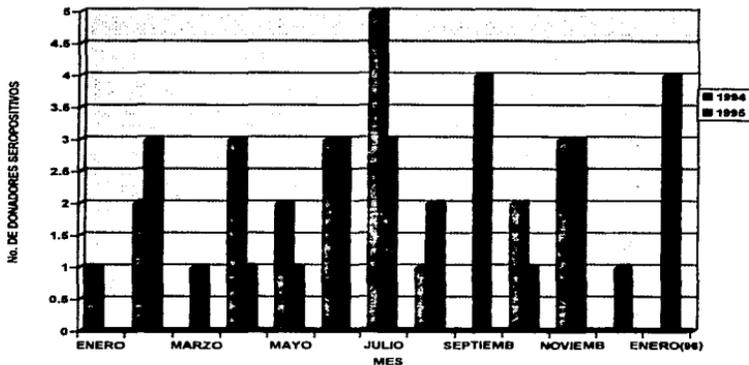


Figura 3. Donadores seropositivos por mes durante el tiempo que duro el estudio.

En está figura se visualiza un incremento de casos positivos, principalmente en Abril, Mayo y Julio del primer año. En el segundo año en Agosto, Septiembre, Diciembre y Enero (1996).

En Junio y Noviembre de ambos años que comprendió el estudio se detecto un número igual de donadores positivos del VHC y la no detección de este microorganismo sucedió en Marzo, Septiembre y Diciembre de 1994.

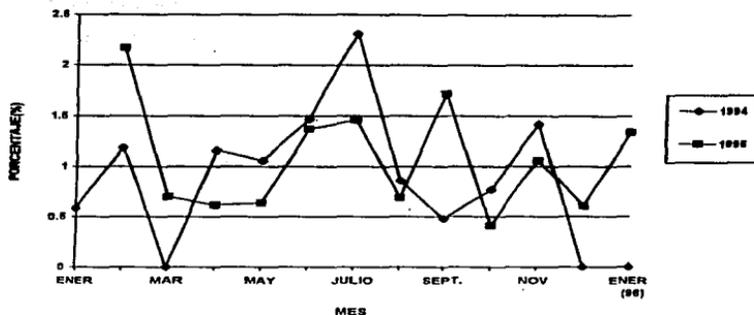


Figura 4. Porcentaje de donadores seropositivos por mes durante el tiempo que abarco el estudio.

En esta figura se observa un variable comportamiento de donadores positivo (%) en ambos años que se realizó el estudio. En el primer año, sobresale Julio por su incremento en comparación a Marzo y Diciembre donde no se detecto ningún caso positivo del VIH. En el segundo año (1995), los casos seropositivos se elevan en Febrero y Septiembre.

En el estudio también se quería establecer una posible relación entre el sexo y la seropositividad al VHC. Pero no se pudo hacer el estudio completo ya que el número de donadores de sexo femenino es bajo (Tabla 3).

Tabla. 3. Casos positivos del VHC en donadores de sangre de diferente sexo, por año.

AÑO	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL	
	FEM.	MASC.	FEM.	MASC.	FEM.	MASC.
1994	4	21	234	2308	238	2329
1995	3	24	169	2348	172	2372
TOTAL	7	45	403	4656	410	4701

En esta tabla observamos un mayor número de donadores de sangre de sexo masculino (4701) y por lo tanto un mayor número de detecciones positivas (45). En comparación de donadores de sexo femenino (410) con un número de siete casos positivos, durante los dos años.

Posteriormente se evaluó la proporción poblacional de casos positivos, a partir de una muestra extraída de una población, durante el primer, segundo y ambos años; así como su porcentaje proporcional de donadores tanto del sexo masculino, como el femenino durante los dos años. Encontrándose los siguientes resultados:

Datos	Fórmulas
<p>Z_0 = Coeficiente de confianza con nivel del 95 %.</p> <p>Donde:</p> <p>$1 - \alpha = 0.95$ por lo tanto $\alpha = 0.05$</p> <p>$\alpha / 2 = 0.025$ $Z_0 = 1.96$</p> <p>P = Proporcional poblacional de no positivos.</p> <p>p = Proporcional muestral de casos positivos.</p> <p>q = Proporcional muestral de casos no positivos.</p> <p>n = Total de muestras.</p> <p>b = No. de casos positivo.</p>	<p>$P = p + Z_0 \sigma_p$</p> <p>$\sigma_p = \sqrt{pq / n}$</p> <p>$p = b / n$</p> <p>$q = 1 - p$</p>

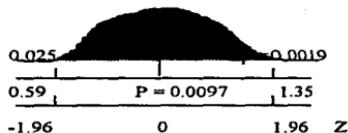


Tabla. 4. Proporcional poblacional de casos positivos

Año 1994 n = 2567 b = 25 p = 0.0097	$0.59 \leq P \leq 1.35 \%$
Año 1995 n = 2544 b = 27 p = 0.0106	$0.66 \leq P \leq 1.50 \%$
Total (Dos años) n = 5111 b = 52 p = 0.0102	$0.74 \leq P \leq 1.29 \%$
Sexo Masculino (Dos años) n = 4701 b = 45 p = 0.0096	$0.68 \leq P \leq 1.24 \%$
Sexo femenino (Dos años) n = 410 b = 7 p = 0.0171	$0.45 \leq P \leq 2.96 \%$

En la Tabla 4 se resumen los datos necesarios para realizar un estudio estadístico inferencial. Donde se determinó que en el primer año (1994). La incidencia de la población se encuentra entre 0.59 % y 1.35%, y en el segundo año se observa un incremento y la incidencia está entre 0.66% y 1.50%.

También se determinó la incidencia de los dos años que comprendió el estudio encontrándose entre 0.74% y 1.29% con los datos de la Tabla 3 se determinó en realidad la incidencia poblacional de donadores del sexo masculino (entre 0.68 % y 1.24 %) del sexo femenino (entre 0.45% y 2.96%).

Los cálculos del porcentaje de incidencia del VHC en donadores de sangre del H. T. O. L. V. se hicieron para cada año, por los dos años y por sexo. En la Tabla 4. se puede observar que el número de donadores positivos para cada año es casi igual, por lo tanto el porcentaje poblacional de incidencia para cada año son similares.

También se puede observar que el porcentaje poblacional de incidencia es mayor en mujeres que en hombres; pero estos resultados no son definitivos por la gran diferencia poblacional en el número de donadores de sexo masculino y el femenino (Tabla 3.).

Y finalmente se procedió a determinar la incidencia en porcentaje, durante los dos años que comprendió el estudio. Esta se examinó por medio del Análisis de Regresión y Correlación.

En la regresión simple interesan dos variables X y Y . Por lo general a la variable X se le conoce como variable independiente ya que los valores son relacionados, en este caso será el tiempo (meses); y a Y se le conoce como variable dependiente, en este caso será el porcentaje de incidencia. Y se habla por lo tanto de la regresión de Y con respecto a X (Tabla 5).

Tabla. 5. Datos para el Análisis de Regresión y Correlación.

X	Y	X ²	XY	Y ²
0	0.58	0	0.00	0.3364
1	1.19	1	1.19	1.4161
2	0.00	4	0.00	0.0000
3	1.16	9	3.48	1.3456
4	1.06	16	4.24	1.1236
5	1.47	25	7.35	2.1609
6	2.31	36	13.86	5.3361
7	0.85	49	5.95	0.7225
8	0.48	64	3.84	0.2304
9	0.76	81	6.84	0.5776
10	1.42	100	14.20	2.0164
11	0.00	121	0.00	0.0000
13	2.17	169	28.21	4.7089
14	0.69	196	9.66	0.4761
15	0.61	225	9.15	0.3721
16	0.63	256	10.08	0.3969
17	1.37	289	23.29	1.8769
18	1.46	324	26.28	2.1316
19	0.68	361	12.92	0.4624
20	1.72	400	34.40	2.9584
21	0.41	441	8.61	0.1681
22	1.06	484	23.32	1.1236
23	0.60	529	13.80	0.3600
24	1.34	576	32.16	1.7956

En la tabla 5 se resumen y organizan los datos obtenidos, manejando las variables "x" y "y"; la primera representa el tiempo, es decir, los 24 meses que duró el estudio de detección del VHC y por lo tanto es independiente. La segunda variable presenta la incidencia mensual obtenida durante estos dos años, es decir, la variable dependiente.

En un esfuerzo por llegar a una decisión referente a la posible relación entre tiempo e incidencia (%) del VHC en los donadores de sangre; se extrae una muestra de la población de interés; y usando los datos resultantes, se calcula una ecuación de regresión de la muestra que es la base para llegar a conclusiones referentes a la ecuación desconocida de regresión de la población.

Tabla. 6. Datos para llegar a la ecuación de la recta.

Σx	Σy	Σx^2	Σxy	Σy^2
288	24.02	4756	292.83	32.0962
$X = 12$	$Y = 1.008$	$(\Sigma x)^2 / n =$	$(\Sigma x)(\Sigma y) / n$	$(\Sigma Y)^2 / n$
$n = 24$	$n = 24$	$\Sigma x - (\Sigma x)^2 / n =$	288.24	24.0400
		3456	$\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y) / n =$	$\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / n =$
		1300	4.59	8.056183

Apartir de los datos que se encuentran en la tabla 6 y una serie de operaciones se llegó a obtener los valores de "a"=0.9585 (ordenada al origen), "b"= 0.003531 (pendiente de la recta). Y por lo tanto la ecuación de la recta $y = 0.9585 + 0.003531 x$

$$y = a + bx$$

Donde : $y =$ Valor estimado de y .

$x =$ Es un valor sobre el eje horizontal (tiempo).

$a =$ Ordenada al origen.

$b =$ Pendiente de la recta (coeficiente de regresión).

$$\therefore b = \Sigma xy / \Sigma x^2 = 4.59 / 1300 \quad y \quad a = y - bx = 1.0008 - 0.003531 (12)$$

$$b = 0.003531$$

$$a = 0.9585$$

Sustituyendo estos valores en la ecuación de la recta y los valores de "x" que corresponden a x = 0, 12, y 24, pueden obtenerse las coordenadas necesarias para trazar la recta.

$$Y = 0.9585 + 0.003531 (x)$$

Entonces: P (12 , 1.0000)

P (0 , 0.9505)

P (24 , 1.0432)

El coeficiente de correlación lineal de la muestra, indica el grado de relación mutua entre las dos variables, es decir, que la incidencia tiene poca relación con el tiempo.

$$r = \sum xy / \sqrt{(\sum x^2) (\sum y^2)} = 4.59 / \sqrt{(1300) (0.056183)} = 0.04485$$

El coeficiente de determinación indica el porcentaje de variación en la incidencia, que se explica o esta determinado por el tiempo (pequeñísimo).

$$r^2 = 0.00201 = 0.201\%$$

$$1 - r^2 = 1 - 99.79 = 799\%$$

Es el porcentaje de variación en la incidencia que no se explica por la variación del tiempo.

Sin embargo no se pasa el juicio final acerca de la ecuación hasta que se ha sometido a una prueba estadística objetiva. Esta prueba se realiza por medio de un análisis de varianza, que nos permite probar la hipótesis nula (Ho) de no relación lineal entre X y Y.

Con el conocimiento de las distribuciones muestrales de a y b pueden construirse los intervalos de confianza y probar las hipótesis relativas de α y β , se llaman intercepto y coeficientes de regresión poblacionales, respectivamente. Geométricamente α y β representan la ordenada al origen y la pendiente respectivamente.

Por lo común las inferencias referente a α no primordial y por otra parte existe un interés, sobre procedimientos inferenciales con respecto a β . La razón para esto, es el hecho de que b nos dice mucho acerca de la forma de la relación entre X y Y .

Prueba de Hipótesis para la Ordenada al Origen.

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_1: \alpha > 0$$

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_1: \alpha > 0$$

Datos

$$*g. l. = n - 2 = 24 - 2 = 22$$

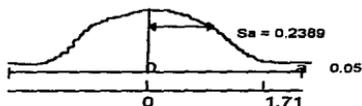
$$a = 0.9585$$

$$S_a = 0.2389$$

$$S_{yx} = 0.6045276$$

$$t_t = t_{22, 0.95} = 1.717$$

H_0 cierto



Fórmulas

$$S_a = S_{yx} \sqrt{1/n + x^2 / \sum x^2}$$

$$S_{yx} = \sqrt{\sum y^2 - b \sum xy / n - 2}$$

$$t_c = a / S_a$$

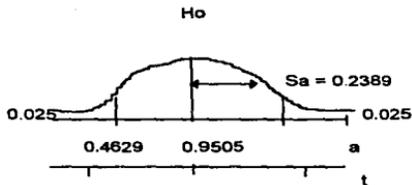
$$\alpha = a \pm t_t S_a$$

Como $t_c = 4.01 > 1.717$, se rechaza H_0 y se acepta H_1 . Por tanto se puede afirmar que $\alpha > 0$. Estimando α con un intervalo de 95 % de confianza.

$$1 - \alpha = 0.95$$

$$\alpha / 2 = 0.025$$

$$t = t_{22, 0.975} = 2.074$$



$$\alpha = 0.9585 +/- (2.074)(0.2389)$$

$$\alpha = 0.9585 +/- 0.4956$$

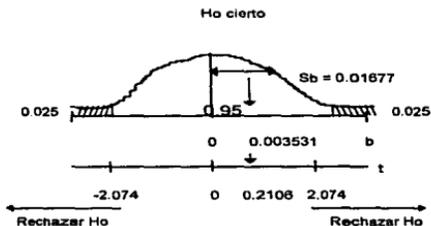
$$0.4629 \leq \alpha \leq 1.4540 \text{ \% de incidencia.}$$

* Grados de libertad, en el caso lineal simple se tienen dos constantes a y b, por lo tanto los grados de libertad para la regresión son n-2.

Prueba de Hipótesis para el coeficiente de Regresión Poblacional.

$$H_0 : \beta = 0$$

$$H_1 : \beta \neq 0$$



Datos:

$$b = 0.003531$$

$$S_b = 0.01677$$

$$t_c = 0.2106$$

$$t_t = t_{22, 0.975} = 2.074$$

Fórmulas:

$$S_b = S_{yx} / \sqrt{\sum x^2}$$

$$t_c = b / S_b = 0.003531 / 0.01677 = 0.2106$$

Como $t_c = 0.2106 < t_t 2.074$, entonces se acepta H_0 y se rechaza H_1 ; y por lo tanto se puede afirmar que $\beta = 0$ (es decir que la incidencia Y, es independiente del tiempo X).

Comparación de medias poblacionales

Datos

Fórmula

$H_0 : P_m = P_h$

$H_1 : P_m \neq P_h$

$$Z_c = \frac{P_m - P_h}{\sigma_{P_m - P_h}} = 1.145$$

Regla de decisión:

SI $-Z_1 \leq Z_c \leq Z_1$

\Rightarrow Aceptar H_0

$\alpha = 5\%$

$\pm Z_1 = \pm Z_{0.475} = \pm 1.96$

$P_m = 0.0171$

$$\sigma_{P_m - P_h} = 0.006553$$

$q = 0.9829$

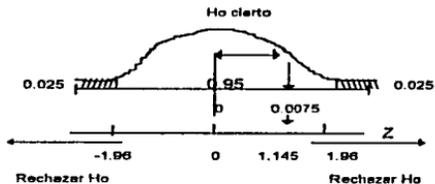
$P_h = 0.0096$

$P_m = 0.9904$

$n_m = 410$

$n_h = 4701$

$$\sigma_{P_m - P_h} = \sqrt{\frac{P_m q_m}{n_m} + \frac{P_h q_h}{n_h}}$$



Como $1.145 < 1.96$

D : aceptar H_0

6.0 Discusión

Como se observa, la incidencia de Hepatitis C en todos los donadores de sangre del Hospital de Traumatología y Ortopedia de Lomas Verdes se calculó que tiene por límites 0.74% y 1.29% (Tabla 4). Cabe señalar que se determinó también la incidencia en el primer año (entre 0.59% y 1.35%) y segundo año (entre 0.66 y 1.50), encontrándose un incremento no significativo si no fueran personas que se les realizó una previa selección para ser donadores, a través de una evaluación, que determinó aparentemente que eran personas sanas.

Se determinó en donadores de sexo masculino (entre 0.68% y 1.24%) la incidencia y en donadores de sexo femenino (entre 0.45% y 2.96%) (Tabla 4).

Respecto a estos resultados es conveniente señalar lo importante de realizar un tratamiento estadístico, como primera razón, para organizar y resumir los datos.

En la tabla 2 se describe el número de donadores de sangre por mes, casos positivos, que en el año de 1994 fueron en total de 25 y en el segundo 27 casos. Además de la incidencia (%) mensual, estos datos se representan por la figura 2,3 y 4 respectivamente (lo que representa la estadística descriptiva).

Y como sucedió en el caso de la seropositividad del VHC en donadores de diferente sexo, aparentemente el sexo masculino presenta un mayor número de casos positivos (45) que en el sexo femenino (7), pero realizando un estudio estadístico más profundo (inferencia) se demostró que el sexo femenino es el que presenta mayor incidencia (Tabla 3).

Pero al realizar una comparación de las medias de población se demostró finalmente que no existe una diferencia significativa. A diferencia de reportes que indican que la incidencia en el sexo masculino es el doble que en el femenino, tal vez se deba a que en las 5111 muestras de donadores, no se fijo un número determinado para cada sexo.

Se presentaron 4701 donadores masculinos y 410 donadores femeninos en los dos años que comprendió el estudio. Tal vez esto se deba a que el sexo masculino fisiológicamente tiene mayor probabilidad de ser aceptado como donadores sanguíneos.

Finalmente, la inquietud de saber la tendencia que seguía la incidencia durante estos 24 meses que abarcó el estudio, nos llevó a realizar el análisis estadístico de regresión y correlación.

Dos técnicas estadísticas que aunque relacionadas tienen propósitos diferentes; la primera es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables y para predecir o estimar el valor dado de otra, y la segunda técnica se refiere a la medición de la

intensidad de la relación entre variables y que finalmente es evaluada objetivamente por las pruebas de hipótesis.

Para llegar a este propósito los datos fueron organizados en la tabla 5, donde “x” representa la variable independiente, que es el tiempo que duro el estudio (24 meses) y “y” la variable dependiente que representa el porcentaje mensual de casos positivos del VHC. Estos resultados se representaron en la figura 3 donde observamos que la incidencia se eleva en el primer año, sobresaliendo el mes de Julio.

Y a partir de los resultados que se describen en la tabla 6 se llegó a obtener el valor de “a” (ordenada al origen) que representa el valor de la incidencia al inicio del estudio, y “b” (pendiente de la recta) que nos muestra la incidencia porcentual del VHC en donadores de sangre, que en este caso no se incrementó durante el tiempo que comprendió el estudio. Y por lo tanto, no tiene ninguna relación dependiente con el tiempo.

Estos resultados nos hacen reflexionar de la importancia que tiene el diagnosticar la Hepatitis C para tener la seguridad en la sangre que se utilice para transfusiones. Y así evitar en el futuro el desarrollo no sólo de Hepatitis del tipo C sino de cáncer de hígado.

A pesar de que la incidencia no se ha incrementado significativamente en los últimos años, el problema sigue presente.

Seria interesante realizar otro tipo de estudio para evaluar los factores como edad, estado nutricional entre otros que se encuentran implicados en la incidencia del VHC, ya que no hay una relación proporcional con el tiempo, al contrario de los casos reportados, en los Estados Unidos, donde la incidencia del VHC cada año aumenta.

La detección del VHC es una labor difícil por varios factores. Primero el tiempo que se necesita para la detección de este virus, por la técnica de ELISA de segunda generación. En este caso se realiza en el turno de la tarde debido a que no es la única prueba que se realiza a las muestras sanguíneas, como ya se mencionó anteriormente. Segundo el número de muestras de donadores de sangre como se observa en la Tabla 2 es alto y en determinados meses del año tiende a incrementarse y además se atiende a pacientes internos y externos aumentando la carga de trabajo del personal del H.T.O.L.V. que da como consecuencia que no se efectúe un monitoreo de seguimiento en los casos seropositivos detectados.

Además el costo monetario de los reactivos empleados es elevado, esto se refleja por ejemplo en el mes de Enero de 1995 que no se detecto el VHC por no contar con estos y el número reducido del personal del laboratorio, limitan la detección de esta enfermedad desafortunadamente. Por estos factores es muy importante su diagnóstico y la información que sobre esta enfermedad tenga la población en general.

Actualmente en los bancos de sangre se trata de reducir el índice de Hepatitis postransfusional, debido a que se han reportado en México que la frecuencia del VHC en pacientes politransfundidos van desde 8.7% a 13.28 % (60).

Es importante corroborar lo necesario que es realizar la detección del agente etiológico de la Hepatitis no A no B, no sólo en las zonas aledañas al Distrito Federal sino también en zonas del Estado de México, como es la zona oriente de la Ciudad de México en donde la incidencia de Hepatitis C fue de 2.2% en 1994 (60), la cual es superior al promedio que se encontró en este estudio, el cual fue de 1.29 % entre los años 1994-1996.

Es de destacar que el estudio realizado en el Hospital General Regional No. 25 del I.M.S.S. el cual es el mismo que nosotros empleamos fue por un método inmunoenzimático (ELISA.2) de segunda generación.

Debido a que la Hepatitis del tipo C ha seguido siendo un problema importante, no sólo en la población adulta, si no también en la infantil. Cabe señalar que en los adultos, muchos casos del virus de la Hepatitis C se presenta frecuentemente en personas inmunodeprimidas, como aquellos pacientes positivos al V.I.H.

El diagnóstico preciso de Hepatitis C radica en una historia clínica completa, con atención cuidadosa a las exposiciones parenterales y una detección serológica del padecimiento por la técnica de ELISA.2.

Se debe informar de manera confidencial a la persona identificada como portador, sobre las medidas de higiene y prevención de la diseminación, así como llevar un buen control de la infección por el virus de Hepatitis C.

Por ser clínicamente una enfermedad de signos y síntomas menos aparentes, y por esta razón no llevar un tratamiento y medidas dietéticas adecuadas, es una enfermedad con complicaciones más frecuentes y de consecuencia fatal en más casos que los otros tipos de Hepatitis. De ahí la importancia de su diagnóstico temprano y su tratamiento adecuado.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

7.0 Conclusiones

Se determinó la incidencia del VIH en donadores de sangre del H. T. O. L. V. la cual tiene por límites 0.74% y 1.29 %, reportandose un incremento relativo, sin ser significativo, durante los dos años de estudio, es decir, que se mantiene sin grandes variaciones en este período de tiempo.

En comparación con otro estudio efectuado en la zona oriente de la Ciudad de México en el año de 1994 el cual fue de 2.2%, nuestros resultados de la incidencia de la hepatitis son menores. Sin embargo, todavía se pueden considerar alta debido a que se trata de donadores aparentemente sanos, y por ser una enfermedad que se trasmite por vía sanguínea.

Aparentemente los donadores de sangre de sexo femenino (entre 0.45 % y 2.9%) tuvieron una mayor incidencia de la enfermedad con respecto a los donadores de sangre de sexo masculino (entre 0.68 % y 1.24 %), pero esta diferencia no es significativa.

Referencias

1. Kusuya Nishioka. Epidemiological studies on Hepatitis C Virus infection: detection, prevalence, exposure and prevention. *Intervioly*. 37:58-67:1994.
2. Okochi, MD. C. Effect of screening for Hepatitis C virus antibody and hepatitis B virus core antibody on incidence of post-transfusional hepatitis. *Lancet*. 338:1040-1041:1991.
3. Y. Zhang, I.K. Kuramoto, D Mamish., K Sazama, P.V Holland and J.B Zeldis. Hepatitis C Virus in blood sampled from volunteer donor. *Jour. of Clinical Microbiology*. 31:606-609:1993.
4. Takano-s, Omata-M, Ohto-M, I. Prospective assessment of donor blood screening for antibody to hepatitis C virus and high-titer antibody to HBcAg as a means of preventing post-transfusion hepatitis. *Hepatology*. 18:235-239:1993.
5. Zhang-D, Zhou-YS, Jia-XP. Prevalencia of antibodies to hepatitis C virus in Chinese patients with viral hepatitis and hepatic failure. *Chin-Med-J-Engl*. 105:5339-543:1992.
6. Matura, T. Harada, M. Makimura. Characterization of HCV structural proteins expressed in various animal cells. *Intervioly*. 37:114-118:1994.
7. Shuichi Kaneko, Masashi Unoura, Masayu Takeuchi I. The role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma in Japan. *Interviolog*. 3 7:108-113:1994.
8. Nobuyuki Kato, Hitumi Sekiya, Yuko Dotsuyama. Humoral immune response to hypervariable region I of the putative envelope glycoprotein (gp 70) of hepatitis C virus. *J. of virology*. 67:3923-3930:1993.

9. Tanaka T, Kato N. Base transition seen In mutation among various types of the hepatitis C viral genome febs. Letters. 315:201-03:1993.
10. Mutsuroni Shiral, Hiroshi Okada, Mikio Nishioka. An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. Journal of Virology. 3334-3342:1994.
11. Mario U. Mondelli, Antonella Cerino. Hepatitis C virus (HCV) core serotypes in chronic HCV. Infection. 32:2523-2527:1994.
12. Ferroni-P, Mascolo-G, Zaninetti-MI. Identification of four epitopes in hepatitis C virus core protein: J-Clin-Microbiology. 31:1586-1591:1993.
13. Chau-Ting Yeh, Chia-Mfin Han, Shih Yen Io, Jin-Hsiung Ou, Kung-Dee Fan. Early detection of anti-HCV antibody in agute hepatitis C virus (HCV) by Western Blot (Immunoblot) using a recombinante HCV core protein fragment. Journal of Clinical Microbiology. 2231-2241:1994.
14. Antonella Ravaggi, Antonella Zonaro, Maria Grazia Marin. Distribution of viral genotypes in Italy. Determined by hepatitis C virus typing by DNA Immunoassay. J. of Clinical Microb. 32:2280-2284:1994.
15. Hiroaki Okamoto, Shunji Mishiro. Genetic heterogeniety of hepatitis C virus. Interviology. 37:68-76:1994.
16. Pistello, F. Maggi, L. Vatteroni. Prevalencia of hepatitis C virus genotypesin Italy. Journal of Clinical Microbiology. 32:232-234:1994.
17. Andonov and R.K. Chaudhary. Genotyping of Canadian hepatitis C virus isolates by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 32:2031-2034: 1994.

18. Maggi, M.L.; Vatteroni, M; Pistello, C.M; Avio, N; Cecconi. Serological reactivity and viral genotypes in hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:209-211:1995.
19. Enrico Silini, Fulvia Bono, Antonella I. Virological features of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:2913-2917: 1993.
20. Andonuv and R. K. Chaudhary. Subtyping of hepatitis C virus isolates by a line probe assay using hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:254-256: 1995.
21. Chatcha Wann Apichartpiyakul, Charoon Chittivudikarn Hirdfumi Miyajima. Analysis of hepatitis C virus isolates among healthy blood donors and drug addicts in Chiang Mai Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:2276-2279: 1994.
22. Mcomish, P.L. Yap, B.C. Dow. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors. *J Clin. Microbiology*. 32:884-892.1994
23. Gerd Michel, Anne Ritter, Guido Gerken. Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver diseases. *The Lancet*. 339:267-269.
24. Toshikazu Uchida. Pathology of hepatitis C. *Interviolygy*:37. 126-132:1994.
25. Mohammed, N. Bazzl Dr. *Infectologia: caso Clinico. Atención Médica*. 32:69-76:1994.
26. Alonso, D. QU, J.P. Lamelin. Serological responses to different genotypes of hepatitis C virus in France. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:211-212:1994.
27. Yohko K. Shimizu, Minako Hijikata, Aikichi Iwamoto. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *Journal of Virology* . 68:1494-1500:1994.

28. Kaldor JM, Archer GT, Buring ML. Risk factors for hepatitis C virus infection in blood donors: a case-control study. *Med J Aust.* 157:227-230:1992.
29. Akira Nishizono, Masa horo, Hiraga. Correlation of serum antibody titers against hepatitis C virus core protein with clinical features by Western Blot (Immunoblot) analysis using a recombinant vaccinia virus expression system. *Journal of Clinical Microbiology.* 31:1173-1178:1993.
30. Lenzi, P.J; Johnson, I.G. Mcfarlane . Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *The Lancet.* 338:277-280:1991.
31. Karino-Y. Mechanisms of the effect of interferon (IFN) therapy in patients with type B and C chronic hepatitis: Cita Bibliografica: *Hokkaido-Igaku-Zasshi.* 68:3:297-309:1993.
32. Conlon-PJ, Walshe-JD, Smith-EG. Lower prevalence of anti-hepatitis C antibody in dialysis and renal transplant patients in Ireland. *Ir J Med Sci.* 162:4:145-147:1993
33. Wright-TL. Liver transplantation for chronic hepatitis C viral infection: *Gastroenterol-clin-North-Am.* 22:231-242:1993
34. Jean-Michel Pawlotsky, Antoine Fleury, Valérie Choukroun et al. Significance of Highly Positive c22-3 "Indeterminate" second generation Hepatitis C Virus (HVC) recombinant immunoblot assay (RIBA) and resolution by third-generation HCV RIBA. *Lancet.* 32:1357-1359:1994
35. Robert S. Klein, Katherine Freeman. Occupational risk for hepatitis C virus infection among New York City dentists: *The Lancet.* 338:1539-1542:1991
36. Kendo Kiyosawa, Eiji Tanaka. Natural history of Hepatitis C. *Intervirology.* 37:101-107:1994.

37. Archer-GT, Buring-ML, Clark-B. Prevalence of Hepatitis C virus antibodies in Sydney blood donors. *Med-J-Aust.* 157:225-227:1992.
38. Shiro Iino, Kunihiko Hino, Kiyomi Yasuda. Current state of interferon therapy for chronic Hepatitis C. *Intervirolgy.* 37:87-100:1994.
39. Dr. Edwin A. Brown, Dr. Hidenori Kawanishi. Hepatitis C y E: ¿Constituyen una amenaza?. *Atención Médica.* 44-52:1944.
40. Mariel Francois, Frédéric Dubois, Denys Brand. Prevalence and significance of Hepatitis C Virus (HCV) viremia in HCV antibody-positive subjects from various populations. *Journal of Clinical Microbiology.* 31:163-164:1993.
41. Kunihiko Hino. Diagnosis of Hepatitis C. *Intervirolgy.* 37:77-86:1993
42. Andreas Cerny and Francis V. Chisari. Immunological aspects of HCV infection. *Intervirolgy.* 37:119-125:1994.
43. Gómez de la Concha, R. Boimorto Pérez y L. Fernández Pereida. Introducción a la inmunología. *Tratado de Medicina Práctica.* 47:3044-3053:1993.
44. Margaret James Koziel and Darryll Dudley. Hepatitis C Virus (HVC)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the Core and envelope proteins of HCV. *Journal of Virology.* 67:7522-7532:1993.
45. Teresa I. Wright, Dia Mamish. Hepatitis B Virus and apparent fulminant non-B Hepatitis. *The Lancet.* 339:952-955:1992.
46. Sherman, J.O'Brien, A.G. Gutierrez. Quantitative evaluation of Hepatitis C Virus RNA in patients with concurrent Human Immunodeficiency Virus infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 31:2679-2682:1993.

47. Maria Grazia Marin, Susanna Bresciani. Clinical significance of serum Hepatitis C Virus (HCV) RNA as Marker of HCV infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:3008-3012:1994
48. Aldo Manzin, Patrizia B'agharelli, Stefano Menzo. Quantitation of Hepatitis C Virus genome molecules in plasma samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:8:1939-1944:1994.
49. Akira Nishizong, Masaharu Hiraga, Kumato Mifure. Correlation of serum antibody titers against Hepatitis C Virus core protein with clinical features by western blot (Immunoblot) analysis using a recombinant vaccinia virus expression system. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:1173-1178:1993
50. Johnson Y. N. Lau, Gary L. Davis. Significance of serum Hepatitis C Virus RNA levels in chronic hepatitis C. *The Lancet*. 341:1501-1504:1993
51. Marcela Contreras, John A. J. Barbara, Catherine C. Anderson. Low incidence of non-A non-B post transfusion hepatitis in London confirmed by hepatitis C virus serology. *The Lancet*. 337:753-754:1991
52. Chau-tingyeh, Chia-Minhan. Early detection of anti-HC antibody in acute Hepatitis C Virus (HCV) by Western Blot (Immunoblot) using a recombinant HCV core protein fragment. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:2231-2241:1994
53. Romeo-R, Thies-V, Driss-F. Hepatitis C Virus RNA in serum of blood donors with or without elevated transaminase levels. *Transfusion*. 33:629:633:1993
54. Leon-P, López-JA, Domingo-C. Evaluation of laboratory assays for screening antibody to hepatitis C virus. *Transfusion*. 33:268-270:1993

55. Kleinaman-S, Alter-H, Bush-M. Increased detection of hepatitis C virus (HCV) infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion*. 32:805-813:1992
56. Chaudhary and H. Jacobsen. Performance of third-generation confirmatory tests for detection of antibody to Hepatitis C Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:10:2606-2608:1994
57. Dianzani-F. Biological basis for the clinical use of interferon. *Cita Gut* 34(2 Suppl):574-576:1993
58. Shiro Iina Kuniyaka Hina y Kiyami Yasuda. Current state of interferon therapy for chronic Hepatitis C. *Interviología* 37:87-100:1994
59. Wayne W. Daniel. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Editorial Limusa, Sexta reimpresión. 119, 243-261:1995.
60. Patacios Bonilla María Cristina. *Relación diagnóstica de enzimas aminotransferasas con marcadores serológicos de la hepatitis C en donadores de la zona Oriente de la Ciudad de México*. Tesis de Licenciatura. 1-70:1994.