

11262
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA HEPATITIS
VIRAL C EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL
CRONICA TERMINAL

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PROGRAMA:

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS, SEDE SUR
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

P R E S E N T A :
LUIS GONZALEZ MICHACA

TUTOR ACADEMICO: DR GERARDO GAMBA

28/157



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Caracterización molecular de la hepatitis viral C
en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

Programa:

Maestría en Ciencias Médicas, Sede Sur
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

Alumno

Luis González Michaca¹

Tutor Académico.

Dr. Gerardo Gamba²

Co-Tutor

Dr. Ricardo Correa Rotter³

¹ Alumno de Maestría en Ciencias Médicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

² Investigador Titular "A" Instituto de Investigaciones Biomédicas y Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

³ Jefe del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

RESUMEN	4
RESUMEN EN INGLÉS	5
INTRODUCCIÓN	6
Hepatitis viral en pacientes con insuficiencia renal crónica	6
Virus de la hepatitis C	8
Hepatitis viral C en diálisis	10
Epidemiología de la hepatitis viral en diálisis en México	12
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
HIPÓTESIS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
GRUPOS DE ESTUDIO	14
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	15
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	15
VARIABLES	15
TAMAÑO DE LA MUESTRA	15
DEFINICIONES OPERACIONALES	17
DESARROLLO DEL ESTUDIO	18
Objetivo 1	19
Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	20
Objetivo 2	22
Objetivo 3	23
Objetivo 4	24
Objetivo 5	24
ASPECTOS ÉTICOS	25
RECURSOS HUMANOS	26
RECURSOS MATERIALES Y ECONÓMICOS	27
LOGÍSTICA	27
RESULTADOS	29
Prevalencia de la hepatitis viral C	30
Genotipos virales	34
Determinación cuantitativa del RNA viral en pacientes positivos	35
Búsqueda del RNA viral en líquido de hemodiálisis y diálisis peritoneal	37
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	45
APÉNDICE	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Dedico la tesis de mi maestría a quien me ha impulsado, con su admirable comprensión

Angelina

RESUMEN

Caracterización molecular de la hepatitis viral C en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal

Antecedentes. Los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) constituyen una población de alto riesgo para el desarrollo de hepatitis viral (HV). Sin embargo, la prevalencia de esta enfermedad en pacientes bajo tratamiento sustitutivo no se conoce en México. En el presente trabajo evaluamos la prevalencia de la infección por virus de hepatitis C (VHC) en una población de enfermos con IRCT en terapia sustitutiva [diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y hemodiálisis (HD)] mediante la identificación de AcVHC y amplificación del RNA viral en plasma.

Pacientes y Métodos. Se evaluaron tres grupos de pacientes con IRCT en tratamiento sustitutivo: 1- DPCA. 2- Pacientes en DPCA con historia de HD (DP/HD). 3- HD. En todos los casos se evaluaron las siguientes variables: edad, género, estado civil, historia de transfusiones, hepatitis y trasplante renal, cirugías previas, causa de la IRCT y tiempo en diálisis. Se les tomó una muestra de sangre, de la cual se extrajo el suero que fue dividido en tres alícuotas: una para detección de AcVHC mediante la técnica de ELISA 2a. generación, otra para determinación de biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos y pruebas de funcionamiento hepático y la tercera para detección de RNA viral mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En los pacientes positivos se determinó la carga viral en suero mediante el kit Amplicor HCV 2.0, se efectuó genotipificación viral mediante enzimas de restricción (*Mva I*, *Hinf I*, *BstU I* y *ScrF I*) y se realizó PCR en líquido de dializado.

Resultados. Se evaluaron en total 235 pacientes (DPCA, n=132), (DP/HD, n=17), (HD, n=86). Al comparar los grupos no observamos diferencias en sus características generales. No existió diferencia en la exposición a los factores de riesgo para la infección, a excepción de las transfusiones realizadas antes de 1991 que estuvieron presentes en 64.7% de los pacientes con DP/HD vs. DPCA=11.3% y HD=13.9% ($P<0.001$). El tiempo en DPCA fue 29.6 ± 22.3 meses, DP/HD 39 ± 42.3 y en HD 14.2 ± 15.6 ($P<0.01$). En DPCA la prevalencia de la infección por VHC fue de 4.55% (6/132), en DP/HD de 41.18% (7/17) y en HD de 12.79% (11/86) ($P<0.001$). Para el análisis de factores de riesgo dividimos a la población en dos sub-grupos: VHC+ y VHC-. No se observaron diferencias en cuanto a la distribución por género, edad, antecedente de transfusiones y de hepatitis y tiempo de estancia en diálisis. Sin embargo, observamos mayor número de pacientes VHC+ con transfusiones antes de 1991 (DPCA: 66.6% vs. 8.73%; DP/HD: 100% vs 40%; HD 36.6% vs. 10.6%. $P<0.01$), así como en pacientes con historia de cirugía previa en DP/HD: 100% vs. 50% y HD 90.9% vs. 61.3% ($P<0.05$). El análisis multivariado de regresión logística mostró que las variables con asociación independiente a la presencia de VHC+ fueron la historia de hepatitis (Razón de momios: 5.7, $P<0.01$) y la transfusión previa a 1991 (10.7, $P<0.01$). El genotipo viral más común fue el 1b, seguido del 1a. Esto se conservó en los diferentes grupos de estudio. La carga viral (copias $\times 10^6$) fue mucho menor en los pacientes con DPCA (0.20 ± 0.29) en comparación con HD (2.04 ± 0.88) ($P<0.05$). El virus no se aisló en líquido de ultrafiltrado.

Discusión. La hepatitis viral C en pacientes con IRCT en terapia sustitutiva tiene una prevalencia en nuestro medio menor a la reportada (promedio en otros países 18.5%). La prevalencia de VHC fue mayor en HD que en DPCA. Sin embargo, al analizar lo enfermos en DPCA con historia de HD encontramos una mayor prevalencia, seguramente por mayor tiempo de evolución en IRCT y por lo tanto más número de factores de riesgo acumulados. Los factores de riesgo con asociación independiente al desarrollo de VHC son la historia de hepatitis y las transfusiones antes de 1991 en que no se conocía al virus C, lo que indica que en la mayoría de los casos la infección se adquirió antes de ingresar a diálisis. El genotipo más común es el 1b, el genotipo 2b está asociado con HD. La carga viral es menor en DPCA, lo que indica que en esta modalidad terapéutica probablemente exista menor riesgo de infección crónica.

Palabras Clave. Hepatitis C, Insuficiencia Renal Crónica Terminal, Diálisis, Prevalencia, Genotipos, Carga Viral.

RESUMEN EN INGLÉS

Molecular characterization of the viral hepatitis C in patients with end stage renal disease

Background. The patients with end stage renal disease (ESRD) are a population with high risk of viral hepatitis infections. However, the prevalence of this infection in patients with ESRD in Mexico is unknown. In this work we evaluated the prevalence of hepatitis C virus (HCV) in ESRD patients under substitutive therapy [continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and hemodialysis (HD)] with the identification of HCV antibodies (HCVAb) and viral plasma RNA amplification.

Methods. We perform a cross sectional study in patients with ESRD divided in three groups: 1- CAPD, 2- Patients in CAPD with history of HD (PD/HD), 3- HD. In all of the cases we evaluated the following variables: age, gender, civil status, transfusion, hepatitis and surgery history, kidney transplant antecedent, etiology of ESRD, time of evolution in dialysis, serum albumin, aminotransferases, BUN, and serum creatinine. The presence of hepatitis C virus was assessed by ELISA II and qualitative RT-PCR in blood samples. In all patients diagnosed as having hepatitis C, RT-PCR to amplified part of the virus genome was also carried out in the dialysis fluid. The genotype of the hepatitis C virus was determined by analysis of the restriction pattern of the RT-PCR product using *Mva I*, *Hinf I*, *BstU I* and *ScrF I* restriction enzymes. Viral load was quantified with RT-PCR by using a commercial kit known as Amplicor HCV 2.0.

Results. We evaluated 235 patients (CAPD, n=132), (PD/HD, n=17), (HD, n=86). We do not observed difference between groups in the general characteristics and in the exposition to the risk factors for the HCV infection, with exception of the transfusions before of 1991 presents in 64.7% of the PD/HD patients vs. CAPD=11.3% and HD=13.9% (P<0.001). The time in CAPD was 29.6 ± 22.3 months, PD/HD 39 ± 42.3 and in HD 14.2 ± 15.6 (P<0.01). The prevalence of HCV infection in CAPD was 4.55% (6/132), in PD/HD 41.18% (7/17) and in HD 12.79% (11/86) (P<0.001). For the risk factors analysis we divided the study population in two groups: HCV+ and HCV-. We do not observed differences in gender, age, transfusions, history of hepatitis and time in dialysis. However, we saw most patients HCV+ with transfusions before of 1991 (CAPD: 66.6% vs. 8.73%; PD/HD: 100% vs 40%; HD 36.6% vs. 10.6%. P<0.01), and surgery history in PD/HD: 100% vs. 50% and HD 90.9% vs. 61.3% (P<0.05). The multivariate analysis of logistic regression showed that the variables with independent association with infection risk were: history of hepatitis (Odds Ratio: 5.7, P<0.01) and transfusions before of 1991 (10.7, P<0.01). The most common viral sub-type was the 1b, followed of the 1a. Without difference between the study groups. The viral load quantification (copies×10⁶) was lower in CAPD patients (0.20 ± 0.29) than patients with exposition of HD (2.04 ± 0.88) (P<0.05). We do not observed viral RNA in the dialysis fluid.

Discussion. Our results show that the prevalence of hepatitis C is lower in our patients than the prevalence reported by many others (average of other countries 18.5%). Since we found a higher prevalence in HD than in CAPD, even with the lower time under dialysis in the HD group, it is possible that our lower overall prevalence is secondary to the fact that CAPD is the most frequent mode of dialysis in our country. We observed the highest prevalence in the PD/HD group, that is probably due to longer exposure to the risk factors. The association with transfusions before 1991 indicates that the infection was acquired in some patients before dialysis was started. Our results showed that the CAPD is the dialysis technique with lower risk of hepatitis C infection. The assessment of viral genotype revealed that 1b is the most common genotype in patients on chronic dialysis in Mexico City. The fact that the 1b and 1a genotypes were the most common types in our dialysis population suggest that transmission was similar to the general population; that is, probably by blood transfusions. The average in viral load of our patients in dialysis is lower than the levels usually observed in hepatitis C infected patients without end stage renal disease. The lower viral load in patients treated with peritoneal dialysis, and no history of hemodialysis, probably denotes lower risk of chronic liver disease in these subpopulation.

Key words: Hepatitis C, End Stage Renal Disease, Dialysis, Prevalence Genotypes Viral Load.

INTRODUCCIÓN

Hepatitis viral en pacientes con insuficiencia renal crónica

La insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) representa un problema médico, económico y de salud pública de grandes proporciones en nuestro medio. El advenimiento de la terapia sustitutiva (hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante renal) para el tratamiento de la IRCT ha mejorado considerablemente la esperanza de vida en el paciente con esta patología, lo que ha condicionado el desarrollo de diferentes enfermedades concurrentes, entre las que se encuentran las hepatitis virales (B y C). Los pacientes nefrópatas constituyen un subgrupo poblacional de "alto riesgo" de infección por los virus de hepatitis, esto parece ser consecuencia de que es común la necesidad de realizar transfusiones sanguíneas, y en el caso de los pacientes que se encuentran en hemodiálisis, además existe un riesgo por el manejo de su sangre en la unidad de diálisis.

La hepatitis en los pacientes con IRCT es una complicación más seria que en la población general. Por un lado, se trata de pacientes con cierto grado de inmunosupresión, en los que la enfermedad renal disminuye las posibilidades de utilizar medicamentos antivirales y la evolución de la infección es más grave y, por otro lado, la hepatitis en pacientes con diálisis disminuye la posibilidad de trasplante renal.

Afortunadamente, ha disminuido la prevalencia de la hepatitis viral B en los pacientes nefrópatas, debido a la posibilidad de identificar fácilmente los antígenos virales y al desarrollo de vacunas.

En hepatitis C, se cuenta con métodos para identificar al virus desde hace poco tiempo, sin embargo los más accesibles se basan en la determinación de anticuerpos, lo cual puede no detectar la infección en todos los casos. Por lo que específicamente en éste tipo de hepatitis la aplicación de la biología molecular tiene utilidad clínica.

El desarrollo y crecimiento de la biología molecular en los últimos años ha generado un nuevo grupo de metodologías útiles tanto para la investigación clínica, como para el diagnóstico y tratamiento. Uno de estos procedimientos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una técnica que permite la amplificación rápida de secuencias conocidas de ácido desoxirribonucleico (DNA), obteniéndose millones de copias de un segmento determinado de DNA.

a partir de una sola copia. Por este motivo, la PCR se ha convertido en una herramienta muy útil para diversos campos de la ciencia.

En el caso de la hepatitis viral C, la PCR permite la identificación del virus en el plasma mediante la amplificación de secuencias específicas^{1,2,3,4,5,6,7}

Actualmente existen tres métodos para el diagnóstico de infección por virus de hepatitis C (VHC):

1) La detección de anticuerpos dirigidos contra el VHC mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que es capaz de detectar inmunoglobulinas dirigidas contra cuatro antígenos del virus (c22-3, c33, c100-3, c200).

2) Determinación de anticuerpos anti-VHC con ensayo inmunológico recombinante (RIBA), que detecta anticuerpos dirigidos contra los antígenos c100-3, c22-3, c33 y 511. Sin embargo, la reacción sólo es positiva cuando existen dos o más antígenos, si sólo hay uno es indeterminada y con ninguno es negativa. Esto hace que la prueba sea altamente específica, pero con baja sensibilidad

3) PCR para detectar ácido ribonucleico (RNA) del VHC⁸

Tomando como estándar de oro a la PCR, se ha evaluado que el ELISA II (segunda generación) tiene una sensibilidad de 93% y especificidad de 92%; y RIBA 86 y 94% respectivamente.^{8,9,10,11}

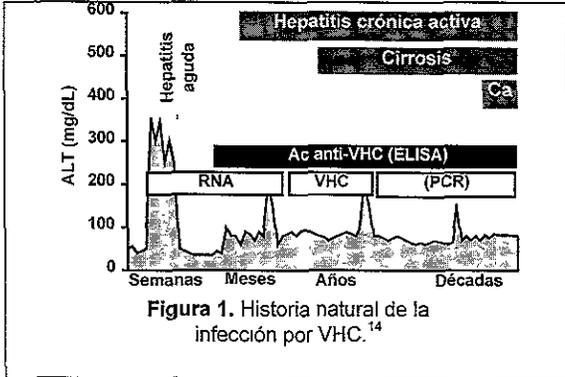
Existen varias circunstancias por las que es conveniente utilizar la PCR para amplificación del virus en plasma:

1) La ventana inmunológica. Este es el período de tiempo que transcurre entre la adquisición de la infección y el desarrollo de anticuerpos. Este período es generalmente de 2 a 6 meses, pero puede llegar a ser mayor. Durante este tiempo es posible identificar al virus en sangre mediante PCR aunque los anticuerpos sean aún negativos¹². (Figura 1)

2) Viremia. Los anticuerpos son útiles para el diagnóstico de contacto con el virus C, pero no sirven para conocer el estado de portador del virus, ni tampoco para saber si el enfermo cursa

con replicación activa del virus. Este tipo de información puede obtenerse a partir de PCR y es útil en el manejo del paciente bajo terapia con interferón¹³.

3) Con PCR es posible no sólo detectar el virus en sangre, sino también detectar el



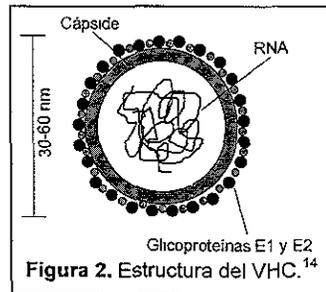
genotipo viral específico y cuantificarlo. Trabajos recientes sugieren que el genotipo del virus y su cuantificación pueden ser de utilidad para predecir el curso clínico, como progresión del daño hepático, o la respuesta al tratamiento^{13,14,15,16,17,18}.

Se ha observado que algunos enfermos muestran patrones de replicación significativamente diferentes que otros y que aquellos con mayor viremia son los que fueron contagiados por medio de transfusión y responden menos a terapia con interferón- α . También se conoce que el genotipo viral puede estar relacionado con la evolución de la hepatopatía y que la distribución de los genotipos virales varía en diferentes áreas geográficas¹⁹.

El uso de PCR en pacientes en diálisis con VHC positivo detecta el RNA viral en 60-90%^{20,21,22}, lo que confirma la presencia de viremia en estos pacientes. En los pacientes con VHC negativo (por anticuerpos) la PCR puede resultar positiva^{8,20,21}, esto se ha interpretado como falla de las pruebas diagnósticas convencionales²⁰, fase inicial de la infección (período de ventana), o retardo de la respuesta inmunológica secundario a uremia^{23,24}.

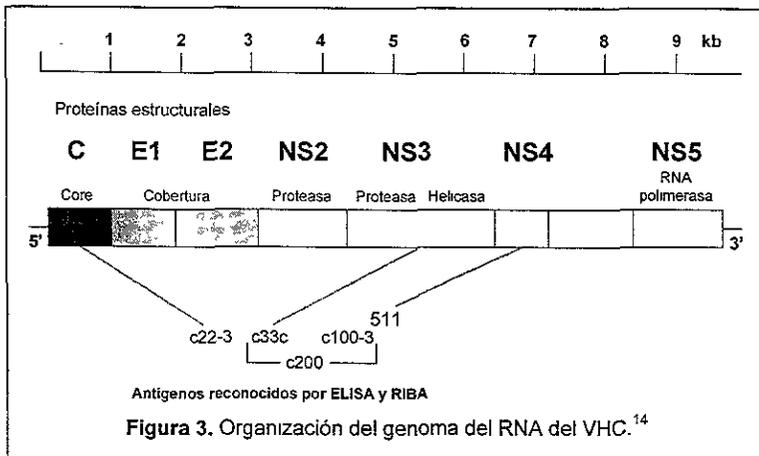
Virus de la hepatitis C

El VHC es similar a los flavivirus humanos o pestivirus animales (virus del dengue o fiebre amarilla), por lo que se considera un miembro de la familia *Flaviviridae*. Tiene forma esférica, con envoltura lipídica y diámetro de 35-60 nm.²⁵ (Figura 2) Se han descrito hasta la fecha más de 10



variantes del virus C, que comparten de 55 a 72% de los aminoácidos. Estas han sido agrupadas con la finalidad de tener una nomenclatura sencilla. Inicialmente Okamoto y colaboradores dividieron a los diferentes tipos de VHC en cuatro grupos: I, II, III y IV^{25,26,27,28}. Sin embargo, posteriormente Simonds *et al*²⁹ propone una clasificación de acuerdo a la semejanza genómica de las variantes en seis grupos de genotipos (1-6), los cuales tienen subclasificaciones (subtipos) denominadas con letras (a-d). De esta forma el subtipo 1a de esta clasificación corresponde a I de Okamoto y el 1b al II. Por ser más completa la clasificación de Simonds, será la que utilizaremos en adelante.

Todos estos virus causantes de la hepatitis C están constituidos por un genoma de RNA de aproximadamente 9,400 nucleótidos. La región traductora codifica para una proteína de 3010 ó 3011 aminoácidos, lo que indica que las regiones no transcritas en los extremos 5' y 3' son muy cortas. La región 5' no transcrita es la que se encuentra mejor conservada entre todas las variantes del virus, por lo que se considera que quizá juegue un papel importante en la regulación de la replicación viral. Esta región 5' varía de 324 a 341 nucleótidos y tiene una conservación mayor al 97%³⁰. Sin embargo, algunas diferencias sutiles en esta región se han utilizado para determinar el genotipo del virus mediante reacción en cadena de la polimerasa^{17,18,19}. (Figura 3)



Hepatitis viral C en diálisis

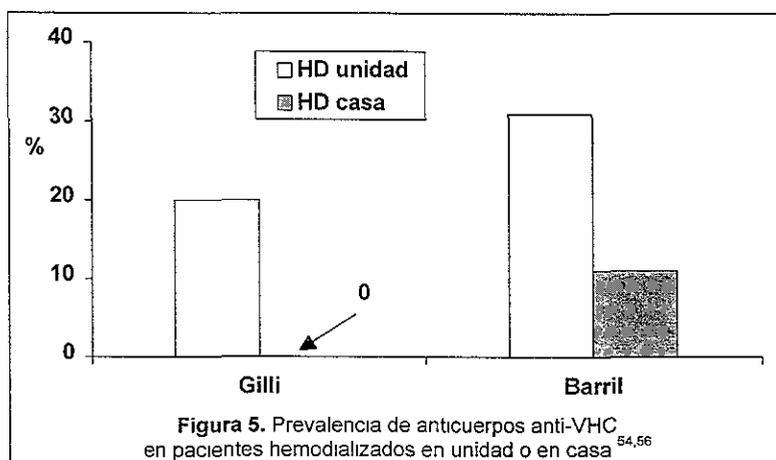
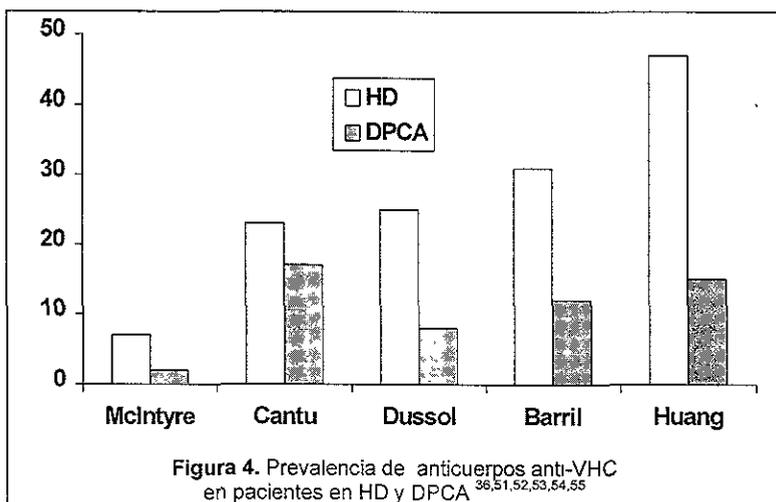
La terapia sustitutiva de la función renal está conformada por dos métodos principales, la hemodiálisis (HD) y la diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA). En ambos casos existe mayor prevalencia que en la población general de infección por VHC.^{31,32,33,34,35,36}

La hepatitis asociada a VHC se ha identificado en las unidades de hemodiálisis (HD) desde hace algunos años^{31,32,33,34,35,36,37,38}, su curso clínico es semejante aunque parece que las enzimas hepáticas permanecen elevadas durante mayor tiempo con respecto a la población general³⁹, además tiene una mayor prevalencia, a pesar de las medidas generales para control de transmisión de la hepatitis como la realización en forma rutinaria de marcadores virales B y C a donadores de sangre y pacientes, el uso de máquinas de diálisis exclusivas para pacientes positivos para virus B o C, la implementación de programas de vacunación tanto en pacientes como en personal médico y paramédico y la prohibición de reutilización del material de diálisis en pacientes positivos. De esta manera, la hepatitis viral continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con IRCT bajo tratamiento sustitutivo.

El descubrimiento y clonación del virus causante de la mayor parte de las hepatitis no A no B, conocido hoy como virus C, permitió el desarrollo de pruebas de ELISA para la detección del virus^{40,41}. Con esta metodología se ha observado alta prevalencia de positividad en el análisis de anticuerpos contra el VHC en unidades de HD: entre 8 a 36% en Estados Unidos y Canadá, 39% en Sudamérica, 31% en Europa, 17 a 51% en Asia y de 12 a 10% en Nueva Zelanda y Australia. Esta variación responde a la región en donde se encuentra localizada la unidad de HD, al número de transfusiones y al tiempo en diálisis.^{8,9,20,24,38,42,43,44,45,46,47,48,49,50}

El mecanismo de transmisión que se pensó inicialmente como responsable de la hepatitis viral C en las unidades de HD son las transfusiones sanguíneas. Sin embargo, se ha demostrado que existe mayor número de pacientes con VHC a mayor tiempo de estancia en diálisis y esto no correlaciona con el número de transfusiones sanguíneas, ni con transmisión intrafamiliar, lo que sugiere la posibilidad de transmisión inter-paciente dentro de la unidad.^{22,23,31,34} Además, los pacientes nefrópatas en DPCA o los que se hemodializan en casa, quienes reciben el mismo número de transfusiones sanguíneas que los que se dializan en una unidad, tienen menor prevalencia de anticuerpos anti-VHC.^{9,51,52}

La prevalencia de anticuerpos contra el VHC en población bajo tratamiento sustitutivo con DPCA oscila alrededor de 15%^{9,43}, mayor que en la población general (~1%)²⁸, pero menor que en la población en HD (~25%)^{8,9,20,24,38,42,43,45}. Sin embargo, cuando se excluyen los pacientes en DPCA que estuvieron anteriormente en HD, la prevalencia disminuye a 5.9%.⁵³ Esta diferencia es probable que se deba a la ausencia de accesos vasculares en DPCA y al hecho de que la diálisis se realiza en casa y no en un centro hospitalario (Figuras 4 y 5).



La caracterización de la infección por VHC en los pacientes en diálisis a partir de los genotipos del virus, ha permitido suponer una transmisión nosocomial debido a una relativa homogeneidad en los subtipos virales: el más frecuente es el 2a (56%), seguido del 1b (31%) y del tipo 3 (3%) y 4 (3%) Sin embargo no se ha encontrado asociación entre el genotipo y las características clínicas de los pacientes en IRCT⁵⁷

Epidemiología de la hepatitis viral en diálisis en México

La información con la que contamos en México en relación con hepatitis viral y diálisis es pobre. La población en México es de interés particular porque existe una alta proporción de pacientes en DPCA (90%), mientras que en países desarrollados pocos pacientes con IRCT son manejados con ésta técnica dialítica (17% en EE.UU. y 6% en Japón).⁵⁸

El único estudio de prevalencia de hepatitis viral C en pacientes con HD y con DPCA se realizó en 1995 en pacientes con IRCT en lista de espera para trasplante renal en diálisis, en el que se encontró 26% de positividad para anticuerpos anti-VHC (ELISA II y RIBA), de los cuales 78% de los pacientes se encontraban en HD y 22% en DPCA⁵⁹.

JUSTIFICACIÓN

No conocemos la prevalencia de la infección por virus de hepatitis C en nuestro medio en pacientes con IRCT. Tampoco conocemos los genotipos específicos, ni la cuantificación promedio del virus en pacientes con IRCT en diálisis. Además, no existen estudios que sustenten claramente la correlación del tipo de virus o su cuantificación con el tipo de terapia sustitutiva recibida.

El presente trabajo fue además el primer paso de la vinculación entre la actividad clínica del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) y la biología molecular en la Unidad de Fisiología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas localizada en el mismo.

En este proyecto nos propusimos utilizar las herramientas de la Unidad para llevar a cabo una caracterización molecular de la hepatitis C en pacientes con IRCT.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la prevalencia de la infección por virus de hepatitis C en pacientes con IRCT en diálisis en nuestro medio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Conocer la prevalencia de hepatitis viral C en pacientes con IRCT bajo tratamiento sustitutivo con HD y DPCA
- 2 Determinar el genotipo específico viral en los pacientes infectados.
3. Determinar cuantitativamente la presencia de RNA viral en suero de pacientes positivos.
- 4 Determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de RNA viral en líquido de ultrafiltrado en pacientes positivos bajo tratamiento con HD y en líquido peritoneal en pacientes positivos bajo tratamiento con DPCA
5. Correlacionar los hallazgos en 2, 3 y 4 con las variables clínicas o de laboratorio de interés

HIPÓTESIS

1. La prevalencia de virus de la hepatitis C en pacientes con insuficiencia renal crónica en terapia sustitutiva es al menos 35% mayor en HD que en DPCA^{8,12,60}.
2. El genotipo del virus de la hepatitis C más comúnmente encontrado en los pacientes en hemodiálisis es el 1b.
3. Todos los pacientes con anticuerpos contra virus de la hepatitis C tienen RNA viral en sangre, incluso este se encuentra en un 5% de los pacientes en diálisis con anticuerpos negativos. Además, la carga viral es al menos un 20% mayor en HD que en DPCA
4. El RNA viral no se puede recuperar en líquido de diálisis, tanto en hemodiálisis como en diálisis peritoneal
5. La elevada prevalencia del VHC en HD en comparación con DPCA, no correlaciona con el número de transfusiones, pero si lo hace con el tiempo de estancia en diálisis.

OBJETIVO GENERAL

Conocer la prevalencia de la infección por virus de hepatitis C en pacientes con IRCT en diálisis en nuestro medio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer la prevalencia de hepatitis viral C en pacientes con IRCT bajo tratamiento sustitutivo con HD y DPCA.
2. Determinar el genotipo específico viral en los pacientes infectados
3. Determinar cuantitativamente la presencia de RNA viral en suero de pacientes positivos
4. Determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de RNA viral en líquido de ultrafiltrado en pacientes positivos bajo tratamiento con HD y en líquido peritoneal en pacientes positivos bajo tratamiento con DPCA
5. Correlacionar los hallazgos en 2, 3 y 4 con las variables clínicas o de laboratorio de interés

HIPÓTESIS

1. La prevalencia de virus de la hepatitis C en pacientes con insuficiencia renal crónica en terapia sustitutiva es al menos 35% mayor en HD que en DPCA^{8,12,60}.
2. El genotipo del virus de la hepatitis C más comúnmente encontrado en los pacientes en hemodiálisis es el 1b.
3. Todos los pacientes con anticuerpos contra virus de la hepatitis C tienen RNA viral en sangre, incluso este se encuentra en un 5% de los pacientes en diálisis con anticuerpos negativos. Además, la carga viral es al menos un 20% mayor en HD que en DPCA.
4. El RNA viral no se puede recuperar en líquido de diálisis, tanto en hemodiálisis como en diálisis peritoneal
5. La elevada prevalencia del VHC en HD en comparación con DPCA, no correlaciona con el número de transfusiones, pero sí lo hace con el tiempo de estancia en diálisis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, prolectivo y comparativo, en el que se analizó la prevalencia de infección por VHC en los pacientes con IRCT en hemodiálisis y en diálisis peritoneal continua ambulatoria. De esta forma el tipo de terapia sustitutiva definió el grupo de estudio. Es importante aclarar, que debido al hecho sustentado en la literatura de que en los pacientes en DPCA con historia de HD la prevalencia de infección por VHC por lo menos se duplica⁵³, decidimos crear un tercer grupo de análisis, constituido por los pacientes que en el momento del estudio se encontraban en DPCA, pero que en alguna ocasión habían estado en HD por más de un mes.

GRUPOS DE ESTUDIO

Grupo 1 (DPCA). Los pacientes en diálisis peritoneal a estudiar fueron los de la clínica de DPCA del INNSZ. Esta clínica consiste en una población activa de 160 enfermos que acuden regularmente a consulta.

Grupo 2 (DP/HD). Pacientes que en el momento del estudio se encontraban en DPCA pero que tenían historia de haber estado en HD por lo menos en alguna ocasión por más de un mes.

Grupo 3 (HD). En el caso de hemodiálisis la selección de los pacientes fue diferente. En el INNSZ se maneja HD únicamente como terapia sustitutiva en pacientes que forman parte del programa de trasplante de donador vivo relacionado. Por lo tanto, los enfermos permanecen poco tiempo en HD, por lo que nuestra población estuvo limitada tanto en número de enfermos como en el tiempo que han estado expuestos a HD. Para que la población de enfermos en HD fuera mayor estudiamos también pacientes de las Unidades de Hemodiálisis del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y del Hospital Médica Sur en la Ciudad de México.

En las unidades de HD de estos hospitales, se cuenta con el mismo tipo de máquinas de HD, el mismo sistema de reprocesamiento de los dializadores, los filtros son de la misma marca y con las mismas características. Se establece el mismo tipo de manejo dialítico y se tienen las mismas políticas de tratamiento de los pacientes. Lo anterior aseguró similitud en los procedimientos hemodialíticos realizados en los tres hospitales.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes con IRCT bajo terapia sustitutiva con HD o DPCA la cual tuviera una duración de cuando menos un mes y con edad mayor a los 18 años.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio aquellos enfermos sin enfermedad renal previa que se encontrarán en diálisis por insuficiencia renal aguda.

VARIABLES

De todos los enfermos se obtuvieron los siguientes datos (variables independientes) edad, género, causa de la insuficiencia renal, tipo y tiempo en terapia sustitutiva, historial de transfusiones, historial clínico de hepatitis, pruebas de función hepática (albúmina sérica, globulinas, bilirrubinas, fosfatasa alcalina, transaminasas y deshidrogenasa láctica), nitrógeno uréico, creatinina sérica y biometría hemática (ver hoja de captación de datos en el Apéndice I).

En el caso de pacientes en HD se evaluó la actividad del personal de la unidad, observando el trabajo en cada una de las unidades y llenando los datos mostrados en la hoja de captación de datos (Apéndice I).

Las variables dependientes fueron la infección por VHC (PCR+ y/o ELISA II +), genotipo viral y análisis cuantitativo del VHC por PCR (carga viral).

TAMAÑO DE LA MUESTRA

El presente estudio se diseñó para conocer la prevalencia de infección por el virus de hepatitis C en los pacientes con IRCT en terapia sustitutiva (HD o DPCA). Debido a que la prevalencia puede ser muy baja especialmente en el grupo de pacientes con DPCA, y a que contamos con los recursos humanos, físicos y económicos para estudiar la población íntegra, pretendemos no realizar un muestreo.

Sin embargo, si intentamos conocer el número de sujetos que necesitaríamos en caso de querer realizarlo y aplicamos con el fin de comparar la prevalencia en los dos grupos en donde está claramente definida la terapia sustitutiva (HD y DPCA) la siguiente fórmula⁶¹:

$$n = \frac{2 (PQ) (Z\alpha + Z\beta)^2}{\Delta^2}$$

Donde P se calcula a partir de:

$$P = \frac{P_{HD} + P_{DPCA}}{2}$$

Q a partir de.

$$Q = 1 - P$$

y, Δ a partir de:

$$P_{HD} - P_{DPCA}$$

P_{HD} será la prevalencia de infección por VHC en HD y P_{DPCA} la prevalencia de la infección en DPCA, ambas conocidas de acuerdo a estudios anteriores.

$Z\alpha$ es la probabilidad mínima aceptada de cometer un error tipo 1*, con valor $\alpha=0.05$; entonces $Z=1.645$ de una cola por la direccionalidad de la hipótesis. $Z\beta$ es la probabilidad de cometer un error tipo 2 (poder del estudio)**; con valor $\beta=0.80$; entonces $Z=0.84$ de una cola Δ es la discrepancia máxima permisible.

De acuerdo con Aiberú *et al*⁵⁹ la prevalencia de hepatitis viral C en nuestro país es de 52% (25/48) en HD y la prevalencia de VHC detectado mediante PCR en HD oscila entre 15 y 60%^{8,12,60}, de esta forma P_{HD} será 45 (promedio de las prevalencias mencionadas).

De la misma forma la prevalencia de hepatitis viral C en nuestro país es de 9.3% (7/75) en DPCA y la prevalencia de VHC detectado por PCR en DPCA es de 8-12%^{8,12,60} por lo que P_{DPCA} será 10 (promedio de las prevalencias).

*Concluir que hay diferencia cuando en realidad no la hay (falso positivo).⁶¹

** Concluir que no hay diferencia cuando en realidad sí la hay (falso negativo).⁶¹

Entonces:

$$P = (0.45 + 0.10) / 2 = 0.275$$

$$Q = 1 - 0.275 = 0.725$$

$$\delta = 0.45 - 0.10 = 0.35$$

Por lo que:

$$n = \frac{2 (0.275 * 0.725) * (1.645 + 0.84)^2}{0.35^2} = 20.1$$

$$20.1 + 30\% \text{ de pérdidas estimadas} = 26$$

De esta forma creemos que podemos alcanzar nuestros objetivos con 30 enfermos en cada grupo.

DEFINICIONES OPERACIONALES

Insuficiencia renal crónica terminal (IRCT): Pérdida de la función renal que hace necesaria la utilización de cualquier método de terapia sustitutiva en forma crónica.

Diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA): Método dialítico en el que se utiliza a la membrana peritoneal como filtro para depurar los azoados, está basado en la instalación de un catéter peritoneal (v.g. *Tenckhoff*) y en la administración continua y ambulatoria de soluciones hiperosmolares que logran la depuración de azoados y agua.

Hemodiálisis (HD): Método dialítico en el que se emplea un filtro o dializador para realizar la depuración de azoados y agua. Se realiza directamente en la sangre que es bombeada por una pequeña bomba de circulación.

Infección por virus de hepatitis C (VHC): Aquel paciente que tenga en suero la presencia de anticuerpos dirigidos contra el VHC detectados mediante ELISA II y/o RNA viral determinado mediante PCR.

Subtipo o genotipo viral: Diferentes clases de VHC, diferenciadas por sutiles cambios en la secuencia de RNA

Carga viral: Es la cantidad de partículas virales que se encuentran en la sangre del paciente infectado determinadas mediante PCR cuantitativo.

Tiempo de diálisis: Tiempo transcurrido entre que el paciente inició con la utilización de HD o DPCA y la fecha en que se realizó la valoración para el presente estudio

Cirugías previas: Cualquier intervención quirúrgica con el uso anestesia general y/o bloqueo espinal, que haya tenido el paciente durante su vida.

Transfusiones previas: Infusión de al menos un paquete globular (sangre) antes de que el paciente haya ingresado a diálisis

Transfusiones en diálisis: Infusión de al menos un paquete globular durante el tiempo en que el paciente ha estado con terapia sustitutiva, sin que necesariamente la transfusión haya sido en la unidad de hemodiálisis.

Transfusiones antes de 1991: Cualquier infusión de uno o más paquetes globulares que haya sucedido antes de 1991, tiempo en que no se conocía el virus de la hepatitis C.

Hepatitis: Cualquier cuadro que el enfermo haya presentado durante su vida, que identifique como "hepatitis" y/o se haya caracterizado por presentar ictericia (coloración amarillenta de los ojos y/o la piel), coluria (coloración oscura de la orina) y/o acolia (color blanco de las heces fecales)

Reuso de filtros en hemodiálisis: Mecanismo mediante el cual en la unidad de hemodiálisis se lavan los filtros o dializadores después de la sesión para poder utilizarlos en las subsecuentes.

DESARROLLO DEL ESTUDIO

Los pacientes del grupo 1 (DPCA) fueron identificados en la consulta de terapia sustitutiva del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. En dicha consulta se les tomó una muestra de sangre y de líquido de diálisis peritoneal. La sangre se dividió en tres alícuotas:

- 1) Para la realización inmediata de pruebas de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos, pruebas de función hepática)

- 2) Para la determinación, también inmediata, de anticuerpos anti-VHC mediante la técnica de ELISA II.
- 3) Para realizar PCR. En este caso, el suero se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Existe evidencia completa de que el almacenamiento a esta temperatura no produce deterioro del RNA viral y puede prolongarse durante todo el tiempo que sea necesario.^{62,63}

La muestra del líquido de diálisis peritoneal se almacenó a -80°C , para posteriormente realizarse la búsqueda del RNA viral en el caso de los pacientes positivos.

Igualmente el mismo día se les aplicó el cuestionario de la hoja de captación de datos (preguntas 1-16) a los pacientes (Apéndice I).

En el caso de los pacientes del grupo 2 (DP/HD) se realizó el mismo procedimiento de captación y de toma y procesamiento de la muestra que los pacientes del grupo 1.

Los pacientes del grupo 3 (HD) fueron reclutados directamente en su unidad de HD, adonde se acudió y se tomó una muestra de sangre y del líquido de hemodiálisis. Las muestras fueron igualmente divididas y almacenadas. El mismo día se contestó el cuestionario de la hoja de captación de datos (preguntas 1-16, 19-29, 31-33). En éste grupo de pacientes también se analizó el funcionamiento de la unidad de HD, entrevistando al médico encargado de la unidad de acuerdo a la hoja de captación de datos, preguntas 47-53; posteriormente se observó el desempeño de las actividades del personal de la unidad durante el tiempo que habitualmente se toma para realizar un procedimiento (4 horas), desde que los pacientes llegaron a la unidad hasta que se retiraron, de esta forma contestaron las preguntas 38-47 de la hoja de captación de datos.

Objetivo 1

El primer objetivo consistió en conocer la prevalencia de la hepatitis viral C, para lo cual se determinó la presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C mediante análisis de ELISA de segunda generación. Esta prueba se realizó utilizando *kits* fabricados por la compañía *Abbot Laboratories* y siguiendo las instrucciones del productor. La prueba fue hecha en el laboratorio central del INNSZ, en donde está completamente automatizada y se realiza día con día como

escrutinio para la detección del virus en la sangre obtenida por donación altruista y se efectúa en forma inicial en todos los pacientes en diálisis.

Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Como hemos mencionado la PCR es una técnica que se basa en el principio de amplificar fragmentos de DNA en unas cuantas horas. La amplificación del DNA se lleva a cabo en forma geométrica, de manera tal que si partimos de una sola copia de DNA, al término de 20 ciclos tendremos alrededor de un millón de copias⁶⁴

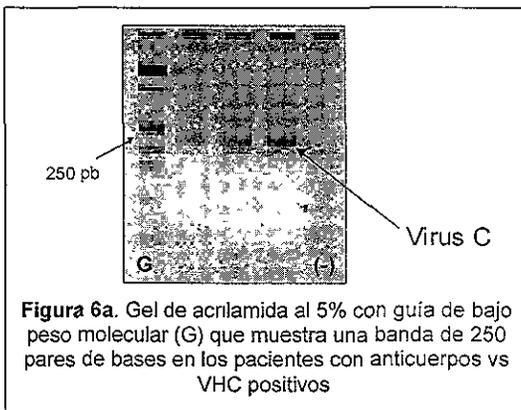
En el estudio se realizó en todas las muestras la búsqueda cualitativa del RNA viral, mediante las reacciones de transcripción reversa y en cadena de la polimerasa (RT-PCR) Por razones de factibilidad se uso una reacción de amplificación únicamente con iniciadores externos.

El RNA viral se aisló del suero humano mediante la técnica de guanidina/fenol con la cual se separan las proteínas de los ácidos nucleares (ver técnica en el Apéndice II)⁶⁵. El RNA obtenido se precipitó en etanol al 70% y se guardó a -20°C hasta su estudio.

La RT-PCR se realizó en forma separada, el RNA aislado fue sometido a transcripción reversa (Apéndice III), cuyo producto fue amplificado mediante PCR (Apéndice IV)¹.

Los iniciadores utilizados para cumplir el objetivo 1 fueron construidos a partir de la secuencia de la región 5' no transcrita del genoma del VHC (nucleótidos 0 a 340), por ser la de mayor homología entre todos los diferentes genotipos del virus⁶. De acuerdo con su diseño, estos iniciadores flanquean una secuencia de 250 pares de bases. El iniciador río arriba (*up stream*) tiene 20 nucleótidos con la secuencia (5' – 3') TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG, se une a los nucleótidos 63 a 82 de la secuencia del genoma, el iniciador río abajo (*down stream*) tiene 26 nucleótidos con la secuencia (5' – 3') CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT, éste iniciador se une a las bases 313 a 288 del genoma viral. Para la realización de la PCR se tomaron 50 µL de cada uno de estos iniciadores, se mezclaron con 400 µL de agua y se dividieron en alícuotas de 50 µL. De esta forma al momento de la realización de la reacción se tomaron ambos iniciadores mezclados en el mismo tubo de acuerdo con la técnica que se puede ver en el Apéndice IV

En resumen, el suero de cada uno de los enfermos estudiados fue sometido a una reacción de extracción de RNA seguida de RT-PCR. El resultado de la reacción se corrió en geles de poliacrilamida. La positividad la determinó con la observación de la banda de amplificación correspondiente (250 pb) (Figura 6a)



La combinación de análisis de anticuerpos mediante ELISA y amplificación del RNA viral con RT-PCR nos permitió conocer el número de sujetos infectados con el virus C de la hepatitis. Con este resultado pudimos conocer la prevalencia en cada uno de los grupos estudiados.

Los pacientes que tuvieron únicamente una de las pruebas positivas se considerarán como infectados. En el caso de anticuerpos positivos con RNA negativo las posibles explicaciones son 1) la viremia puede ser intermitente, 2) recientemente se ha observado que el virus puede replicar en células mononucleares y no estar presente en el plasma⁶⁶ y 3) memoria inmunológica. Para descartar la primera posibilidad se repetiría el análisis de RT-PCR en varias ocasiones con la idea de detectar una viremia intermitente (cada dos meses). Para descartar la segunda posibilidad se llevarían a cabo reacciones de RT-PCR a partir del RNA de células mononucleares periféricas. Si las posibilidades 1 y 2 fueran negativas, entonces sería el caso de memoria inmunológica. El enfermo será siempre negativo al RNA porque el virus ha desaparecido de su organismo

Los pacientes con anticuerpos por ELISA negativos pero amplificación positiva del RNA viral también se consideraron positivos. Las posibles explicaciones son: 1) ventana inmunológica ó 2) los anticuerpos no pueden detectar al virus particular de ese enfermo. En el primer caso se repitió el análisis de ELISA cada dos meses durante el siguiente año hasta encontrar positividad. El segundo caso es tan extremadamente raro con la segunda generación de ELISA que no esperábamos fuera un problema

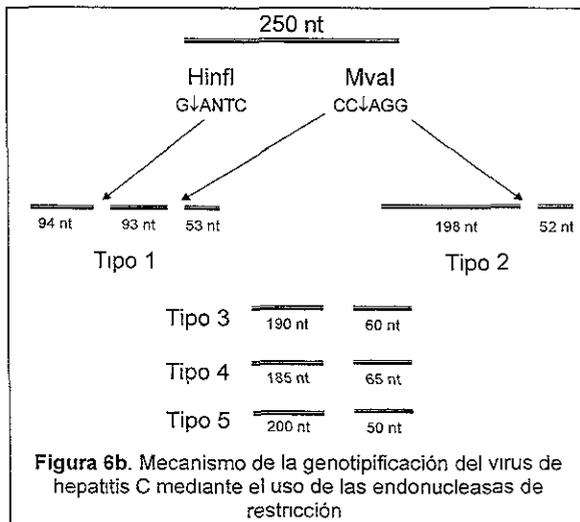
En todas las reacciones se utilizó un control negativo para rechazar la posibilidad de amplificación falsa positiva por contaminación.

Objetivo 2

El segundo objetivo del estudio consistió en conocer el genotipo específico del virus C en pacientes positivos. Según la secuencia conocida del genoma del VHC existen seis isotipos virales (1 al 6), de los cuales los primeros tres se subdividen en tres subtipos (a, b y c). Los isotipos virales pueden distinguirse por diferencias sutiles en la secuencia 5' no transcrita del genoma del VHC. La existencia de isotipos virales del VHC es de interés por que se ha demostrado diferente distribución geográfica de estos en el mundo, y por que algunos estudios sugieren que el isotipo viral puede afectar el curso de la enfermedad⁶⁷. El interés de este objetivo fue saber: 1) si la distribución de los genotipos es similar que en otros países y 2) si la distribución de genotipos tiene alguna asociación con la insuficiencia renal o con el tipo de terapia sustitutiva.

Para conocer el tipo específico del virus utilizamos la estrategia propuesta por Davidson⁶⁸. Esta consiste en tomar ventaja de sutiles diferencias en la secuencia 5' no codificante del genoma del virus, mediante el uso de las enzimas de restricción MvaI, HinfI, BstUI y ScrFI. Primero se utilizaron juntas las enzimas MvaI y HinfI, se expuso el producto de PCR a ambas, junto con un medio apropiado a 37°C durante 10 horas. Posteriormente se corrió la muestra en un gel de acrilamida y se reveló de acuerdo con lo anotado en la técnica del Apéndice V.

La idea es que cada enzima tiene un sitio específico de acción en la región 5' del genoma viral. En algunos genotipos el sitio de restricción no existe y por lo tanto no hay acción de la enzima, lo anterior hace que se observe una diferente distribución de las bandas que permite reconocer a los genotipos virales. Como se observa en la figura 6b, al



someter al producto de RT-PCR de 250 nucleótidos (nt) a la acción de ambas enzimas (HinfI y MvaI), en caso de que se trate de un subtipo 1 existirá sitio de restricción para ambas, de tal forma que el producto de digestión será de tres bandas, una de 94 nt, otra de 93 nt y la tercera de 53 nt, cuando se trata del subtipo 2 entonces no existirá el sitio de restricción para HinfI, por lo que sólo observaremos dos bandas, una de 198 nt y otra de 52 nt.⁶⁶

Posteriormente, con la finalidad de diferenciar los subtipos virales de cada genotipo, se expuso el mismo producto de PCR a la acción de las enzimas BstUI o ScrFI, cada una de ellas por separado. La enzima BstUI se utilizó en el caso de que el genotipo fuera el 1 con MvaI-HinfI, de esta forma el patrón de bandas nos permitió diferenciar al subtipo 1a del 1b. En el caso del genotipo 2 y 3 utilizamos la enzima ScrFI para la identificación de los subtipos 2a y 2b ó 3a y 3b (Figura 6c).

La distribución observada de los genotipos del virus en los diferentes grupos estudiados fue analizada mediante χ^2 con corrección de Yates. Posteriormente, para estudiar la relación entre el genotipo del virus con las variables de interés utilizamos un análisis de regresión logística ordinal con el que se puede determinar si existe alguna variable asociada o predictora del genotipo específico⁶¹.

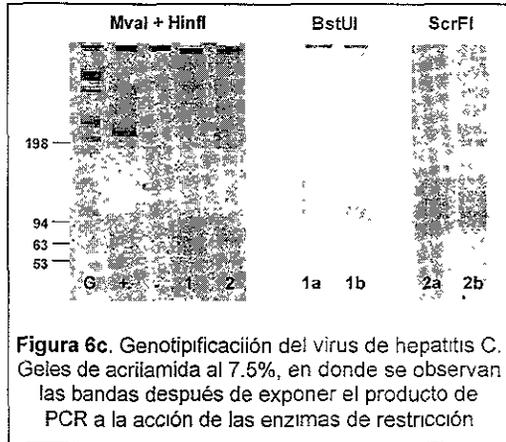


Figura 6c. Genotipificación del virus de hepatitis C. Geles de acrilamida al 7.5%, en donde se observan las bandas después de exponer el producto de PCR a la acción de las enzimas de restricción

En caso de no observar ningún genotipo claramente, el DNA amplificado en la primera reacción sería secuenciado⁶⁹

Objetivo 3

La cuantificación viral en suero se realizó en todos los pacientes positivos. Se llevó a cabo con la utilización de un *kit* proporcionado por *Laboratorios Roche (Amplicor VHC)*, el cual utiliza extracción de RNA, RT-PCR e hibridación, para posteriormente analizar la cantidad de DNA

amplificado mediante colorimetría. Los resultados obtenidos se expresaron como número de copias virales por mL de suero.

Los resultados obtenidos se expresaron como número de copias virales por mL de suero. Inicialmente realizamos un análisis univariado para conocer las diferencias entre los títulos de replicación con las diversas variables de interés como las diversas variables clínicas mencionadas (tipo o tiempo en diálisis, historia de transfusiones, edad, etc.). Este tipo de análisis se llevó a cabo con análisis de varianza de una vía o t de Student en el caso de los resultados con distribución normal, o con análisis de varianza de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney en caso contrario⁷⁰. Las variables significativas fueron posteriormente sujetas a un análisis de regresión múltiple para conocer la asociación independiente de ellas con el título obtenido de virus en suero

Objetivo 4

Se realizó la búsqueda del virus de hepatitis C en el líquido de diálisis peritoneal en el caso de los pacientes positivos al VHC con ELISA y/o PCR que se encontraban en DPCA y en el líquido de hemodiálisis en los que estaban en HD. Como se ha mencionado, es importante conocer si el virus puede ser recuperado en éstos líquidos, para saber si tienen potencial infectante

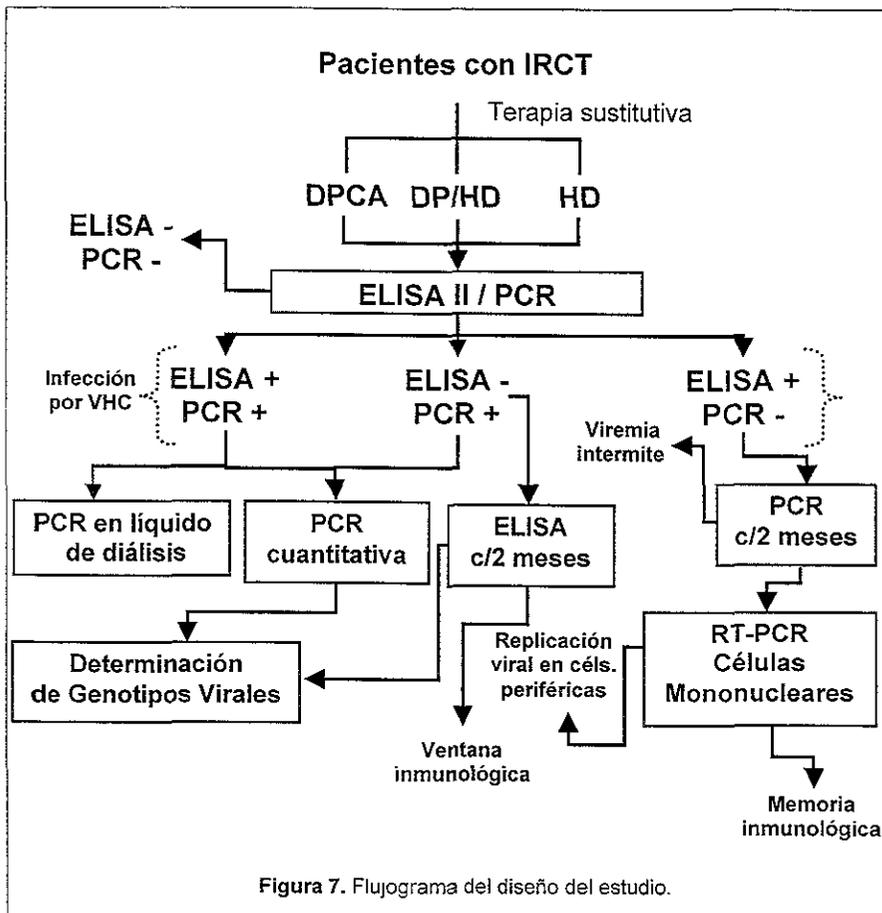
En el caso de los pacientes que se encontraban en DPCA, se extrajo una muestra de líquido de diálisis peritoneal, en su primer drenaje del día, asegurándose siempre que no hayan utilizado heparina en sus baños previos, ya que esta se considera como un inhibidor de la PCR. Posteriormente se siguieron los mismos pasos que el suero para la búsqueda del virus mediante RT-PCR.

En los pacientes en HD, la muestra de líquido se obtuvo directamente del dializador (en la parte de salida que se dirige al drenaje), la muestra se tomó antes de que se le aplicara heparina al sistema. Se siguieron los mismos pasos que la muestra de líquido de dializado. No se modificó ningún parámetro de la hemodiálisis antes de la obtención de la muestra de líquido.

Objetivo 5

Todos los resultados obtenidos en los objetivos 1, 2, 3 y 4 se relacionaron con las variables clínicas de interés que están anotadas en la hoja de captación de datos (Apéndice I). Se realizó

inicialmente un análisis univariado entre cada una de las variables y la positividad del virus, el tipo de terapia sustitutiva, el genotipo y la carga viral. Finalmente se realizó un análisis multivariado de regresión logística para conocer si existen variables que pueden predecir en forma independiente el desarrollo de la infección por VHC, el genotipo o la carga viral.



ASPECTOS ÉTICOS

El presente trabajo se realizó para conocer la prevalencia y los mecanismos de transmisión del VHC en los pacientes con IRCT en terapia sustitutiva. No se realizó ninguna modificación al manejo habitual de los pacientes y no se efectuó ninguna intervención en los pacientes durante el desarrollo del protocolo. Sólo se tomó una muestra de sangre a cada paciente incluido, esta fue de

5 mL. También se extrajo una muestra del líquido de diálisis peritoneal o del líquido de ultrafiltrado de hemodiálisis dependiendo del tipo de terapia sustitutiva que tuviera el paciente. Lo anterior no constituyó un costo adicional para el paciente y se garantizó la confidencialidad de los datos obtenidos

La Ley General de Salud con respecto a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, en su título segundo, capítulo I, artículo 14, IV parte, menciona que toda investigación "contará con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal", excepto, según el artículo 23 del mismo capítulo, "en el caso de investigaciones con riesgo mínimo" La misma Ley considera en su artículo 17, a una investigación con riesgo mínimo a estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran. extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 mL , en dos meses, excepto durante el embarazo ⁷¹

Además, en el caso de los pacientes en hemodiálisis, el médico encargado de la unidad de HD, conoció el protocolo *ad integrum*, con el fin de que conociendo los objetivos del estudio aceptara la evaluación de su unidad.

Finalmente, el protocolo fue registrado, revisado y autorizado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán en el mes de abril de 1997

RECURSOS HUMANOS

El estudio fue realizado por el Alumno de Maestría en todas sus fases.

Al término del protocolo, el alumno cuenta con conocimientos extensos sobre biología molecular, sabe aplicar las técnicas más comunes de la misma y tiene la destreza necesaria para realizar la reacción en cadena de la polimerasa.

RECURSOS MATERIALES Y ECONÓMICOS

Fueron los que existen en el Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del INNSZ, así como en la Unidad de Fisiología Molecular del propio Departamento y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El proyecto fue patrocinado en parte por el Howard Hughes Medical Institute.

LOGÍSTICA

El estudio se realizó de acuerdo con el siguiente programa.

Primer Cuatrimestre (MAR/97 - JUN/97)

Conclusión del Protocolo de Investigación.

Entrevista con los médicos encargados de las unidades de HD a evaluar

Captación y entrevista de enfermos

Evaluación de las unidades de HD.

Toma y recolección de muestras de estudios de laboratorio basales y VHC de escrutinio

Toma de muestras de líquido de diálisis y líquido de ultrafiltrado

Segundo Cuatrimestre (JUL/97 - OCT/97)

Se produjeron los iniciadores y se montaron las condiciones ideales para la realización de las reacciones en forma rutinaria

Se implementó la metodología para el análisis cuantitativo de las muestras de suero de los pacientes positivos.

Tercer Cuatrimestre (NOV/97 - FEB/98)

Se realizó la extracción de RNA viral en el suero de los pacientes

Cuarto Cuatrimestre (MAR/98 - JUN/98)

Se realizó la PCR cualitativa en el suero de los pacientes.

Quinto Cuatrimestre (JUL/98 - OCT/98)

Se realizó el análisis cualitativo de PCR en líquido de diálisis o ultrafiltrado de los pacientes positivos.

Se realizó el análisis cuantitativo de PCR en el suero de los pacientes positivos.

Sexto Cuatrimestre (NOV/98 - FEB/99)

Se efectuó la genotipificación viral, análisis estadístico y se escribió la tesis de maestría.

RESULTADOS

Se evaluaron en total 235 pacientes con IRCT en diálisis, de los cuales 132 conformaron el

	DPCA	DP/HD	HD
Total	132	17	86
Género n(%)			
Masculino	57 (43.1)	4 (23.5)	39 (45.3)
Femenino	75 (56.8)	13 (76.4)	47 (54.6)
Edad (años ± DE)	47.6 ± 12.3	42.3 ± 13.6	44.3 ± 17.6
Causa IRCT n(%)			
DM	45 (34.1)	2 (11.7)	28 (32.5) *
Desconocida	72 (54.5)	3 (17.6)	28 (32.5) *
Rechazo	1 (0.8)	10 (58.8)	6 (6.9) *
Tiempo en diálisis (meses ± DE)	29.6 ± 22.3	39 ± 42.3	14.2 ± 15.6 *

* P<0.05

grupo de DPCA, 17 el de DP/HD y 86 el de HD. Como muestra el cuadro 1, no se observó diferencia en las características generales de los tres grupos. La causa de IRCT fue similar en los todos grupos a excepción de que en los pacientes con DP/HD el 58.8% tuvieron historia de trasplante renal y rechazo. El tiempo en DPCA fue 29.6 ± 22.3 meses, DP/HD 39 ± 42.3 y en HD

	DPCA	DP/HD	HD
Hematócrito (% ± DE)	28.1 ± 4.7	26.7 ± 5.2	25.2 ± 5.7 [‡]
Plaquetas (n ± DE)	270.9 ± 87.0 ^{*‡}	220.3 ± 74.6	231.5 ± 84.1
Sodio (mg/dL ± DE)	137.2 ± 3.8	136.7 ± 3.8	138.7 ± 3.8 [‡]
Potasio (mg/dL ± DE)	4.3 ± 0.6	4.2 ± 0.5	5.0 ± 0.9 ^{*‡}
Glucosa (mg/dL ± DE)	138.2 ± 64.3 ^{*‡}	96.9 ± 29.8	119.2 ± 38.4
Nitrógeno uréico (mg/dL ± DE)	61.0 ± 24.5	46.1 ± 14.6*	60.1 ± 23.5
Creatinina sérica (mg/dL ± DE)	8.6 ± 2.6	10.1 ± 2.3	8.5 ± 3.0
BT (mg/dL ± DE)	0.65 ± 0.2	0.72 ± 0.3	0.84 ± 0.2 [‡]
Fosfatasa alcalina (mg/dL ± DE)	108.6 ± 53.1	91.7 ± 27.2	187.6 ± 208.9
AST (mg/dL ± DE)	22.0 ± 9.9	25.6 ± 15.4	21.3 ± 13.0
ALT (mg/dL ± DE)	19.1 ± 9.5	21.9 ± 15.2	18.4 ± 13.2
Albúmina (mg/dL ± DE)	2.4 ± 0.5	2.9 ± 0.7	3.3 ± 0.8 ^{*‡}

* P<0.05 DPCA vs DP/HD ‡ P<0.05 HD vs DP/HD † P<0.05 DPCA vs HD

14.2 ± 15.6 (P<0.01).

Los exámenes de laboratorio de los tres grupos no mostraron diferencias, a excepción de los resultados en albúmina, fosfatasa alcalina, plaquetas, potasio y glucosa, como se puede observar en el cuadro 2.

Todos los enfermos con VHC en suero (PCR +) también lo fueron en el análisis de ELISA II, a excepción de uno en el que el ELISA II fue positivo siete meses después de la PCR

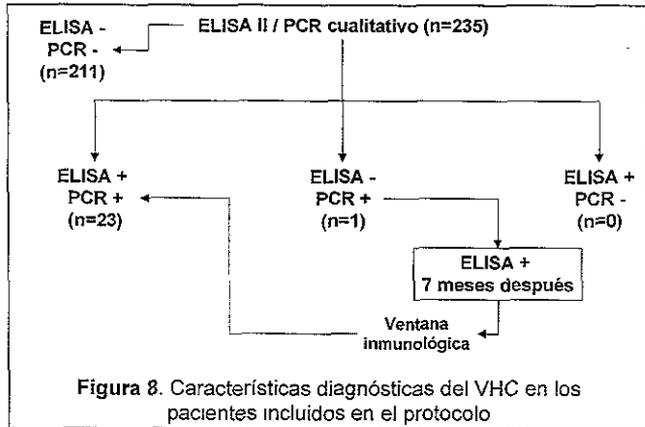


Figura 8. Características diagnósticas del VHC en los pacientes incluidos en el protocolo

Todos lo pacientes sin VHC

en el suero (PCR -) también fueron ELISA II negativos. Como se muestra en la figura 8 no existió ningún caso en el que la PCR fuera negativa y la detección de anticuerpos contra el VHC positiva

Prevalencia de la hepatitis viral C.

La prevalencia general de la infección por VHC fue de 10.2% (24/235) y la prevalencia de la infección por modalidad dialítica fue de 4.55% (6/132) en DPCA, 12.79% (11/86) en HD y 41.18% (7/17) en DP/HD (P<0.001) (Figura 9).

Con la finalidad de conocer si existen algunas características o situaciones que puedan favorecer el desarrollo de la infección, se analizaron diferentes factores de riesgo reconocidos en la literatura (historia de transfusiones, historia de hepatitis, historia de cirugías incluyendo trasplante renal y tiempo en diálisis). La exposición de estos factores por grupo de estudio no mostró diferencia, a excepción de las transfusiones realizadas antes de 1991: 64.7% en los pacientes con DP/HD vs. 11.3% en DPCA y 13.9% en HD (P<0.001) y el tiempo en diálisis: 29.6 ± 22.3 meses en DPCA, 39 ± 42.3 en DP/HD y 14.2 ± 15.6 en HD (P<0.01).

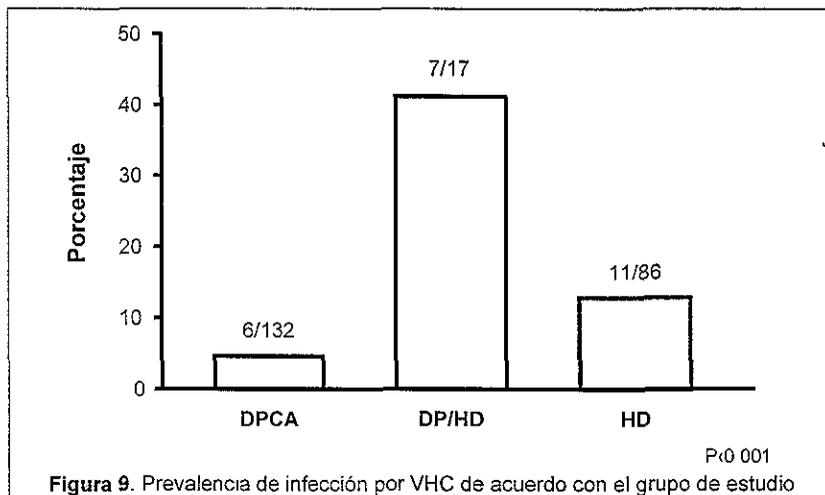


Figura 9. Prevalencia de infección por VHC de acuerdo con el grupo de estudio

Con la finalidad de realizar un adecuado análisis de factores de riesgo dividimos a la población en dos sub-grupos: VHC+ y VHC-. El cuadro 3 muestra los principales parámetros en pacientes VHC+ y VHC- para cada una de las modalidades dialíticas, en ésta tabla se puede observar que no hay diferencias en cuanto a género, edad, historia de trasplante renal y valores de hematócrito y billirrubinas en los tres grupos al comparar pacientes positivos y negativos, a

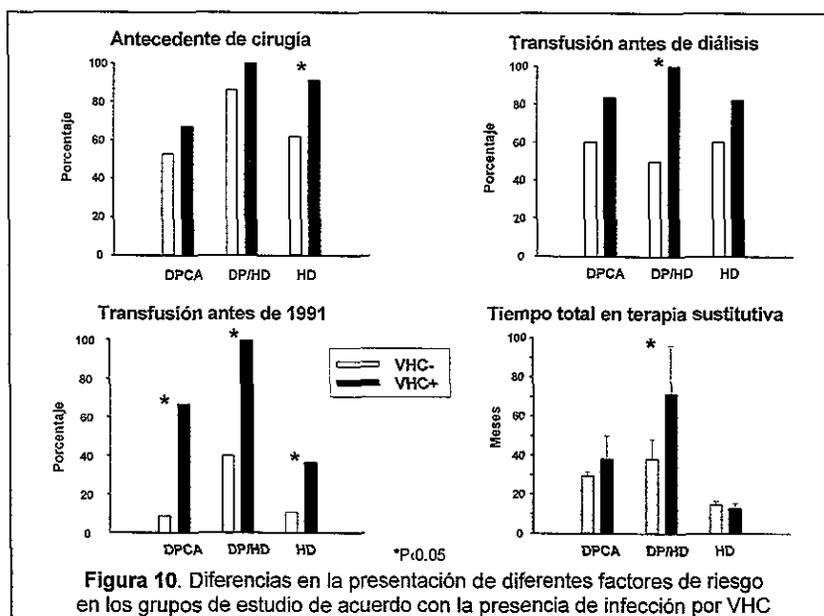
	DPCA		DP/HD		HD	
	VHC +	VHC -	VHC +	VHC -	VHC +	VHC -
n (%)	6 (4.5)	126 (95.4)	7 (41.1)	10 (58.8)	11 (12.8)	75 (87.2)
Género [n (%)]						
Masculino	2 (33.3)	55 (43.6)	2 (28.5)	2 (20)	4 (36.3)	35 (46.6)
Femenino	4 (66.6)	71 (56.3)	5 (71.4)	8 (80)	7 (63.6)	40 (53.3)
Edad(años±DE)	50.3 ± 14.5	47.5 ± 12.2	39.5 ± 10.3	44.3 ± 15.8	41.7 ± 19.5	44.6 ± 17.4
Hepatitis [n (%)]	0	2 (1.5)	1 (14.2)	0	5 (45.5)*	7 (9.3)
TR [n (%)]	5 (83.3)	96 (76.1)	6 (85.7)	6 (60)	5 (45.4)	21 (28)
Hto (%±DE)	30.3 ± 9.6	28.0 ± 4.4	25.3 ± 2.1	27.7 ± 6.6	24.8 ± 5.1	25.2 ± 5.8
BT (mg/dL±DE)	1.0 ± 0.2*	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.2
ALT (U±DE)	35.8 ± 16.7*	18.2 ± 8.4	27.8 ± 18.1	17.8 ± 12	30.2 ± 17*	16.7 ± 11.6
Albúm.(mg/dL±DE)	2.5 ± 0.3	2.4 ± 0.5	2.9 ± 1.0	2.8 ± 0.4	2.8 ± 1.0*	3.4 ± 0.7

* P<0.05

TR: trasplante renal, Hto: hematócrito, BT: billirrubinas totales, ALT: alanino amino transferasa y Albúm: albúmina sérica.

excepción de que los pacientes con VHC+ en todos los grupos tuvieron alteraciones significativas en las pruebas de funcionamiento hepático, el valor de albúmina sérica fue menor en los pacientes infectados en hemodiálisis y la historia de hepatitis fue mayor en los pacientes positivos en HD.

El análisis univariado mostró que los principales factores de riesgo son los antecedentes de cirugía y transfusión, así como el tiempo en diálisis. Por ejemplo, en la figura 10 se puede observar como el antecedente de cirugía es más frecuente en los pacientes positivos, aunque la diferencia es estadísticamente significativa sólo en HD; el antecedente de transfusiones también es más frecuente en los pacientes positivos pero sólo estadísticamente significativo en el caso de los que se encuentran en DP/HD; sin embargo el haber recibido una transfusión antes de 1991 es un factor que claramente es más frecuente en los pacientes positivos en todos los grupos del estudio. Finalmente el tiempo de estancia en diálisis sólo es mayor en el caso de los pacientes positivos que se encuentran en DP/HD



El análisis univariado se completó conociendo la razón de momios de cada uno de los factores que están relacionados con el riesgo de desarrollar infección por VHC. De esta forma,

como se puede ver en el cuadro 4, la historia de transfusión proporciona una razón de momios de 4.7*, el antecedente de cirugía de 5.6*, la historia de hepatitis de 7.4*, el estar en cualquier modalidad que incluya hemodiálisis de 4.4* y la transfusión antes de 1991 de 13.6* (*P<0.001).

Cuadro 4. Análisis univariado de los factores de riesgo relacionados con infección por VHC

	RM	IC 95%		P
Cirugía previa	5.6	1.7	18.1	<0.001
Transfusión previa	4.7	1.4	15.2	<0.001
Transfusión en diálisis	1.4	0.5	3.4	0.4
Transfusión antes de 1991	13.6	5.4	34.0	<0.001
Historia de hepatitis	7.4	2.4	22.6	<0.001
Tiempo en diálisis >30 m	0.4	0.1	1.1	0.09
Tiempo total diálisis >30 m	0.5	0.2	1.3	0.2
Modalidad HD	4.4	1.7	11.3	<0.001

Debido a que estas variables pueden estar interrelacionadas y para conocer cuales tienen asociación independiente para la presencia de infección por VHC, realizamos un análisis multivariado de regresión logística. Los resultados de éste análisis, cuadro 5, muestran que únicamente la transfusión antes de 1991 y la historia de hepatitis tienen asociación independiente y significativa para el desarrollo de la infección por VHC.

Cuadro 5. Análisis multivariado de regresión logística de los factores de riesgo para el desarrollo de infección por VHC

vhc +	Razón de momios	P	IC 95%
Cirugía previa	2.8	0.15	0.6-11.5
Transfusión previa	1.1	0.86	0.2-5.21
Transfusión en diálisis	2.2	0.57	0.1-35.1
Transfusión antes de 1991	6.4	0.00	1.8-22.4
Historia de hepatitis	4.3	0.04	1.0-18.3
Tiempo en diálisis	0.7	0.22	0.4-1.18
Tiempo total en diálisis	1.3	0.21	0.8-2.02
Modalidad de HD	0.9	0.97	0.0-16.1

$\chi^2 = 49.02$
 $P < 0.001$ Pseudo $R^2 = 0.3163$

Llama la atención que las transfusiones antes de 1991 tengan un factor de riesgo en forma independiente. Con la finalidad de conocer si éste factor está ocultando otros, se realizó otro modelo de regresión múltiple, en el que no se incluyeron a las transfusiones antes de 1991. En éste modelo, cuadro 6, se observa que el antecedente de cirugía previa, el tener una modalidad de hemodiálisis y un tiempo prolongado en terapia sustitutiva, son variables que de esta forma se

Cuadro 6. Análisis multivariado de factores de riesgo sin incluir a las transfusiones antes de 1991

vhc +	Razón de momios	P	IC 95%
Cirugía previa	4.4	0.022	1.2 - 15.9
Historia de hepatitis	5.6	0.008	1.5 - 20.0
Tiempo total en diálisis	1.0	0.015	1.0 - 1.03
Modalidad de HD	3.5	0.017	1.2 - 10.2

$\chi^2 = 30.47$
P < 0.001 Pseudo R² = 0.1966

asocian en forma significativa para el desarrollo de la infección por VHC. La historia de hepatitis conserva su riesgo.

Genotipos virales.

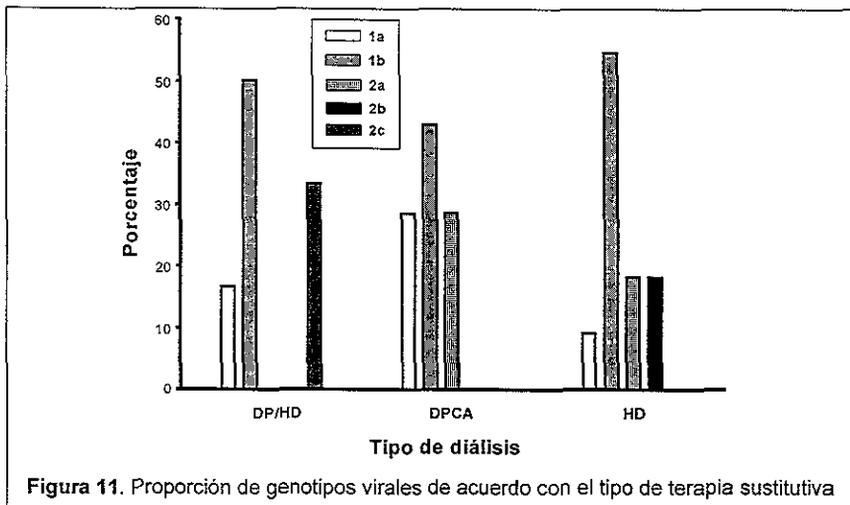
La utilización de las endonucleasas de restricción nos permitió conocer los genotipos virales. Como se puede observar en el cuadro 7, el genotipo más común fue el 1b presente en 12 de los 24 pacientes infectados, después se encontraron el 1a y el 2a cada uno en 16% de los pacientes, finalmente 2b y 2c en dos casos cada uno.

La distribución de los genotipos virales de acuerdo con el tipo de terapia sustitutiva mostró que el tipo 1b fue el

Cuadro 7. Genotipos virales

Genotipo	n (%)
1a	4 (16.6)
1b	12 (50)
2a	4 (16.6)
2b	2 (8.3)
2c	2 (8.3)

más frecuente en todas las modalidades, como se puede ver en la figura 11 el genotipo 1b tiene una proporción mayor al 40% en los tres tipos de diálisis. El genotipo 1a está presente en los tres grupos en proporciones similares, el subtipo 2a sólo se encuentra presente en pacientes que han tenido contacto con hemodiálisis y con DPCA. Por el contrario el 2c sólo se encontró en pacientes que están en DPCA pero que tuvieron alguna vez contacto con hemodiálisis. Finalmente el genotipo 2b sólo se observó en pacientes infectados en hemodiálisis.



Determinación cuantitativa del RNA viral en pacientes positivos.

Para la cuantificación del RNA viral se realizó en primer lugar una evaluación de la concordancia intra-método e intra-operador, procesando la misma muestra dos veces en forma ciega. Los resultados los podemos observar en la figura 12, en donde se aprecia una muy adecuada concordancia ($r^2 = 0.78$).

El promedio total de la carga viral en nuestros enfermos fue de $1,410,989 \pm 3,015,092$ copias por mL de suero. La cuantificación de la carga del VHC en suero mostró valores $\geq 2,000$ copias/mL en 22 de los 24 pacientes con la infección por VHC, lo que indica viremia y replicación viral activa en el 91.6% de los pacientes. En la figura 13 analizamos la cuantificación viral en los grupos de estudio, observamos que la carga viral expresada en número de copias $\times 10^6$ fue mucho menor en los pacientes con DPCA (0.20 ± 0.12) en comparación con DP/HD (1.73 ± 2.67) y HD (1.86 ± 3.92), sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($P=0.09$). Por lo anterior y debido a que la hemodiálisis es reconocida como un método que favorece inmunosupresión, decidimos juntar los resultados de la cuantificación viral en los dos grupos que

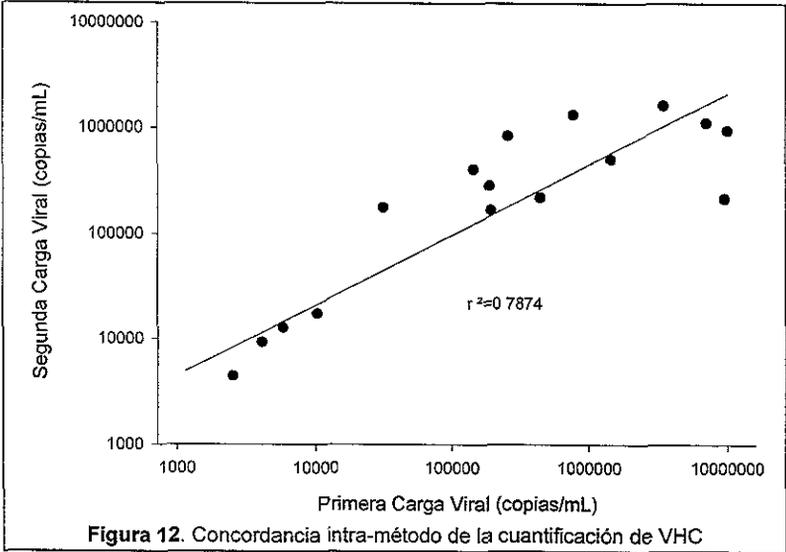
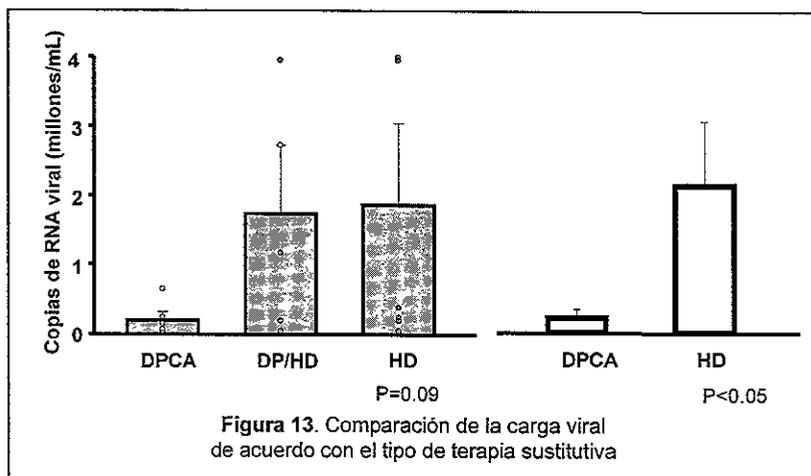


Figura 12. Concordancia intra-método de la cuantificación de VHC

tienen historia de este método (2.04 ± 0.88) y lo comparamos con la carga viral en DPCA (0.20 ± 0.12), lo que sí mostró diferencia estadística ($P < 0.05$) (Figura 13).



Debido a que el genotipo 1b está reconocido como de peor pronóstico para el daño hepático, la evolución y la respuesta al tratamiento de la hepatitis⁶⁷; realizamos un análisis para observar si en nuestros pacientes muestran algún dato de peor evolución. Primero se evaluaron los niveles de alanino-amino transferasa (ALT) para conocer si existían datos sugerentes de mayor actividad hepática en los pacientes infectados con genotipo 1b, sin embargo, el valor medio de esta enzima no es diferente en los pacientes con éste genotipo, al compararlo contra todos los demás genotipos (1b = 29.1 UI/dL \pm 3.8 vs. NO1b = 32.7 UI/dL \pm 5.9, P=NS), tampoco se observaron diferencias en la carga viral (1b = 1,043,382 copias/mL \pm 829,162.9 vs. NO1b = 1,778,597 copias/mL \pm 933,765 5; P=NS).

Búsqueda del RNA viral en líquido de hemodiálisis y diálisis peritoneal.

Tanto en DPCA como en HD el líquido de diálisis fue negativo para la búsqueda del RNA del virus de hepatitis C mediante RT-PCR en todos los casos.

DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primer estudio realizado en México para conocer la situación de la hepatitis viral C en pacientes en diálisis, el análisis se realizó en el sur de la Ciudad de México y estuvo limitado a tres instituciones localizadas en Tlalpan. Los resultados muestran que la prevalencia de la infección en nuestro medio es baja en comparación con la de otros países (prevalencia general 10.2%; en otros países 18.5%), probablemente esto se deba a que la infección se presentó en menor proporción en la modalidad de DPCA y esta es la técnica dialítica más utilizada en México, de hecho en nuestro estudio de los 235 pacientes incluidos 132 (56.1%) se encontraban en DPCA, y estos tuvieron una menor prevalencia de la infección.

Al evaluar las diferentes técnicas dialíticas, observamos que la mayor prevalencia (41.1%) se observó en los enfermos que se encontraban en diálisis peritoneal con historia de hemodiálisis (DP/HD). Lo anterior contrastó con la baja prevalencia en DPCA (4.5%), por lo que inferimos que la alta tasa de infección en el grupo DP/HD es consecuencia de la historia de hemodiálisis en donde se ha verificado en múltiples estudios mayor prevalencia. Lo anterior y en forma similar fue evaluado por Natov *et al*⁷², quien por el contrario encontró una menor prevalencia en los pacientes con DP/HD (1%), sin embargo, en éste estudio sólo el 2% de los pacientes tenían ésta modalidad dialítica, ya que en los Estados Unidos la gran parte de los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal se encuentran en hemodiálisis. En nuestro estudio la modalidad DP/HD se observó en el 7% de los pacientes estudiados (17/235).

En nuestro estudio la prevalencia de la infección por VHC fue mayor en los enfermos que se encontraban en HD con respecto a los que estaban en DPCA (12.8 vs. 4.5%). Esta diferencia está presente a pesar de que el grupo en hemodiálisis tiene un tiempo de evolución en diálisis mucho menor (14.2 ± 15.6 vs. 29.6 ± 22.3 meses), lo que sugiere que si ambas poblaciones tuvieran el mismo tiempo en diálisis las diferencias podrían ser aún más amplias. Siguiendo la misma línea de pensamiento, en el grupo DP/HD existe mayor prevalencia de la infección que con las otras dos técnicas y mayor tiempo de evolución en diálisis (29 ± 42.3 meses) que en los otros dos grupos, lo cual está relacionado con la definición de éste grupo, ya que el hecho de tener una técnica y además historia de haber estado en otra modalidad es representativo de un prolongado

tiempo de evolución en terapia sustitutiva, y por lo tanto existen mayores probabilidades de acumular factores de riesgo

En nuestros resultados, obtuvimos como factores de riesgo con asociación independiente para el desarrollo de infección por VHC a la historia de hepatitis y las transfusiones antes de 1991 cuando no se conocía el VHC y por lo tanto no se podía realizar su búsqueda en la sangre de los donadores sanguíneos. Lo anterior sugiere que en varios casos la infección se adquirió antes de ingresar a diálisis. Es importante mencionar que esto no había sido encontrado en ningún estudio publicado en el que se hubieran analizado factores de riesgo para el desarrollo de la infección por virus de hepatitis C, pero tampoco había sido buscado. La inclusión de esta variable fue muy importante, sin embargo, encuentra algo lógico, es decir, la probabilidad de que una transfusión produjera infección por el virus de hepatitis C antes de que éste pudiera ser detectado es mucho mayor, que en el momento actual, en donde se realiza un escrutinio continuo de los donadores de sangre para la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra el virus.

Debido a lo anterior y a la gran cantidad de pacientes infectados con historia de transfusiones antes de 1991, es probable que ésta variable oculte otras. Precisamente por ello, se realizó otro análisis multivariado en el que no se incluyó a las transfusiones antes de 1991 como variable independiente. En el cuadro 6 se muestra éste análisis en donde se ve que el antecedente de haber tenido hepatitis conserva su riesgo, sin embargo, ésta maniobra analítica permite observar que hay otros factores de riesgo importantes que no fueron mostrados anteriormente, estos son el antecedente de una cirugía (razón de momios de 4.4), el tiempo total en terapia sustitutiva (razón de momios de 1.02, $P < 0.05$) y el haber tenido contacto en alguna ocasión con hemodiálisis por más de un mes (razón de momios de 3.5).

Por lo anterior, también podemos concluir que el riesgo de infección por virus de hepatitis C se incrementa cuando hay un antecedente de cirugía, lo que también confirma que la infección en muchos de los casos se presentó antes de iniciar diálisis. Sin embargo, el contacto con hemodiálisis y no tan importantemente el tiempo total en diálisis son factores que favorecen la infección ya estando en terapia sustitutiva

En la literatura se apoya el hecho de que independientemente del tipo de diálisis el tiempo de evolución es mayor en los pacientes infectados, lo que sustenta el acumulo de factores de riesgo favorece la infección por virus de hepatitis C.^{72,73}

La genotipificación viral muestra que el subtipo más común en éste grupo de pacientes es el 1b, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, y lo encontrado en diferentes series realizadas en los continentes Americano y Europeo, no así en el Asiático^{68,73,74,75,76}. Sin embargo, existen reportes en donde el genotipo 1a en pacientes en diálisis es más frecuente que el 1b⁶⁷, en nuestro estudio éste genotipo ocupó el segundo lugar en frecuencia junto con el 2a (16.6%).

En el análisis de los tipos de terapia sustitutiva se muestra que en todas las modalidades dialíticas, el genotipo 1b es el más frecuente, lo que sugiere que la gran mayoría de las infecciones se adquirieron en forma similar a la población general infectada con VHC. Igualmente el genotipo 1a tiene una distribución homogénea en las tres modalidades dialíticas. El genotipo 2a se observó en DPCA y HD, pero ningún paciente con DP/HD lo presentó, lo cual parece estar relacionado con el número de pacientes y la baja frecuencia con que se aisló éste subtipo.

Por el contrario los subtipos 2b y 2c sólo se encontraron en pacientes que tuvieron contacto con hemodiálisis. El número de pacientes infectados es muy pequeño, pero esta diferencia nos puede hablar de una tendencia. Es probable que en los genotipos virales encontrados en hemodiálisis la transmisión haya sido conjunta.

En la literatura es conocido que el genotipo 1b confiere peor pronóstico a la evolución de la enfermedad hepática^{67,76}, sin embargo, esto no se ha podido verificar en estudios transversales como el nuestro, en donde se compararon los niveles de transaminasas, específicamente alanino-amino transferasa (ALT) de los pacientes con genotipo 1b con el resto.^{72,76} Sin embargo, en estudios en los que se ha evaluado la carga viral en forma prospectiva, en presencia de tratamiento con α -interferon, el genotipo 1b confiere peor pronóstico e incluso peor evolución histológica del hígado.⁷⁷ En nuestro estudio no observamos diferencias en los niveles de ALT, ni en la carga viral cuando comparamos a los pacientes infectados con genotipo 1b con los pacientes infectados con genotipo diferente al 1b, lo cual concuerda con lo observado en la literatura en estudios transversales. A partir de éste punto se podría plantear un estudio longitudinal que evaluará la evolución específicamente de la carga viral

En el presente estudio el promedio de la carga viral en todos los pacientes infectados fue de $1,410,989 \pm 3,015,092$ copias por mL de suero, lo cual es semejante a lo reportado por estudios transversales realizados en enfermos en diálisis ($1,940,000$)⁷³. Sin embargo, de acuerdo también con lo publicado, éste valor parece bajo cuando se compara con los títulos de carga viral en pacientes con infección por VHC no nefrópatas, por ejemplo Hagiwara *et al*⁷⁸ comparó los valores de carga viral por VHC en diferentes grupos de pacientes: donadores asintomáticos $251,188.6 \pm 100$ copias/mL, hepatitis persistente $19,952,623.1 \pm 0.04$, hepatitis crónica activa $79,432,823.4 \pm 6.3$, cirrosis $63,095,734.4 \pm 5$ y carcinoma hepatocelular $79,432,823.4 \pm 5$. A este respecto, recientemente Rampino *et al*⁷⁹ propusieron que los niveles bajos del VHC y la aparente ausencia de hepatopatía en pacientes en HD, en comparación con los no nefrópatas, podría estar en relación con el hecho de que la HD incrementa significativamente la secreción del factor de crecimiento de hepatocitos, en forma tal, que la HD imita la administración de este factor como droga. Se ha mostrado en algunos estudios que la administración exógena del factor de crecimiento de hepatocitos acelera la regeneración hepática y protege al hígado de la toxicidad por algunos agentes^{80,81,82}.

El análisis cuantitativo demostró que la carga viral es menor cuando los enfermos infectados se encuentran en DPCA (Figura 13) Estos datos van en contra del hecho de que la HD puede disminuir la replicación viral en relación con el factor de crecimiento de hepatocitos, aunque no existen estudios que hayan evaluado éste factor en pacientes en DPCA. Tampoco existen en la literatura otros estudios que hayan comparado la carga viral de pacientes infectados de acuerdo con la modalidad dialítica. Es interesante observar como en nuestros resultados, los pacientes en hemodiálisis tiene mayor carga viral a pesar del menor tiempo de evolución. Este hallazgo apoya la hipótesis de que la HD confiere cierto grado de inmunosupresión, lo que explicaría porque la tasa de replicación viral es mayor

La inmunosupresión favorecida por la diálisis ha sido evaluada, debido a que es conocido que los pacientes en hemodiálisis tienen mayor propensión a procesos infecciosos, disminuye su reacción de hipersensibilidad a reacciones cutáneas (PPD) y se retrasa su reacción contra injertos de piel. Sabemos que la hemodiálisis afecta la fagocitosis, disminuye la movilidad de los granulocitos, afecta la quimiotaxis, inhibe la proliferación de células T, reduce la síntesis de IL-2 y

disminuye la actividad natural de la células T asesinas.⁸³ Lo anterior parece ser consecuencia de la exposición de la sangre con la membrana de dializador.⁸⁴ Además, se ha verificado que estas alteraciones se observan en forma más acentuada cuando se utilizan filtros fabricados con cuprofano o materiales relacionados (bioincompatibles).⁸⁴ En nuestro estudio 84 de los 86 enfermos en hemodiálisis (97.6%) estaban utilizando un dializador de polisulfona al momento del estudio (biocompatibles). De los 11 enfermos que se detectaron con infección por VHC en HD, 9 (81.8%) tenían dializador de polisulfona y 2 (18.1%) cuprofano. Sin embargo, el valor de carga viral entre ambos tipos de membrana no fue diferente (polisulfona = 2,198,468 ± 1,435,154 vs, cuprofano = 345,370 ± 91,980; P=0.2). Lo anterior indica que el tipo de membrana no parece estar relacionado con el valor de carga viral en los pacientes en hemodiálisis.

En los pacientes con diálisis peritoneal también se presenta alteración en la respuesta inmune, sin embargo, la afección no predomina en el ámbito sistémico. Se ha comprobado que se afecta la función de los macrófagos y su respuesta en peritoneo por el contacto con la solución de diálisis peritoneal. A nivel sistémico se ha encontrado reducción de la quimiotaxis de monocitos, pero la función linfocitaria no disminuye, incluso en algunos casos se incrementa (células asesinas).⁸⁵ De esta forma se considera que con diálisis peritoneal en el ámbito sistémico no se produce una respuesta de inmunosupresión debido al carácter local del líquido de diálisis peritoneal y a que las células modificadas están siendo continuamente removidas por la misma diálisis.⁸⁶

Para poder establecer si la diferencia encontrada en nuestro estudio de carga viral en ambos tipos de diálisis es consecuencia de alteraciones en la inmunidad condicionadas por el mismo método dialítico, habría que descartar otras causas de inmunosupresión en diálisis. Es bien conocido que la hipoalbuminemia puede ser un marcador de mayor deterioro sistémico y peor pronóstico en los pacientes en diálisis, y por lo tanto los más susceptibles al desarrollo de enfermedades infecciosas son los que están desnutridos.^{86,87,88,89} Por lo que es necesario analizar los niveles de albúmina sérica en nuestros enfermos.

En nuestros resultados encontramos que los pacientes con alguna técnica relacionada con la diálisis peritoneal (DPCA o DP/HD) tuvieron menor concentración de albúmina sérica que los que se encontraban en HD (2.4 ± 0.5 ó 2.9 ± 0.7 vs. 3.3 ± 0.8 ; P<0.05) (cuadro 2). Lo anterior

puede ser explicado por el hecho de que la diálisis peritoneal favorece una importante pérdida proteínica (3-6 g/día). Sin embargo, al comparar los pacientes con infección por VHC en las tres modalidades dialíticas, observamos que el nivel de albúmina sérica sólo es menor en los pacientes infectados que se encuentran en HD con respecto a los no infectados (2.8 ± 1.0 vs. 3.4 ± 0.7 ; $P < 0.05$) (cuadro 3), esta diferencia no se observó en las otras dos modalidades dialíticas. Lo cual indica que el nivel de albúmina podría tener una relación con el desarrollo de la infección, ya que ésta modalidad dialítica es la que mayor prevalencia tienen. Sin embargo, el valor de albúmina sérica en un estudio transversal puede no ser representativo del estado nutricional e inmunológico del enfermo al momento de la infección, por lo que no es prudente realizar una inferencia de prevalencia de la infección con respecto a un valor laboratorial posterior.

Nosotros no encontramos el RNA viral en el líquido de diálisis en los pacientes positivos mediante RT-PCR tanto en DPCA como en HD. Como se ha comentado, para la búsqueda del RNA en el líquido de diálisis se tuvo mucho cuidado de no incluir muestras de pacientes que hubieran estado en contacto con heparina, ya que éste fármaco puede inhibir la PCR.

La presencia del RNA del VHC en el líquido de diálisis peritoneal en la literatura ha sido objeto de algunos reportes cuyos resultados son discrepantes. En dos estudios se buscó el RNA viral en el líquido de ultrafiltrado peritoneal con resultados negativos^{90,91}, sin embargo existen reportes de series cortas en donde se ha encontrado el RNA viral en el líquido de diálisis peritoneal (4 de nueve pacientes)⁹², (4 de cinco pacientes)⁹³. En éste último reporte se tomaron tres diferentes muestras del líquido peritoneal en tres diferentes días, y en sólo un caso las tres muestras fueron positivas. Por lo anterior Castelnovo⁹¹, determinó títulos del virus en el líquido peritoneal de pacientes con carga viral alta en sangre y que en el líquido de diálisis la PCR había sido negativa, y encontró que los títulos son muy bajos ($< 1,000/\text{mL}$), lo que podría explicar por qué la PCR es negativa. Lo anterior posiblemente sea consecuencia de que el virus en el líquido de diálisis peritoneal se diluye en forma importante, lo que excede los límites de sensibilidad de la PCR y favorece que sea encontrado gracias al azar. Sin embargo, a pesar de esto se deben de implementar en forma rutinaria medidas de control de infecciones para el manejo del líquido de diálisis peritoneal de un paciente infectado, ya que a pesar de una baja carga el líquido puede ser potencialmente infectante.

La presencia del virus en el líquido de hemodiálisis también muestra resultados contradictorios, Caramelo *et al*⁹⁰ no lo encontraron al analizar el líquido de hemodiálisis de 12 pacientes infectados y Valtuille *et al*⁹⁴ hallaron el RNA viral en 3 muestras de líquido de hemodiálisis que pertenecían al mismo paciente, sin embargo, esto lo lograron aplicando condiciones extremas de permeabilidad del filtro, aumentando la presión transmembrana hasta 400 mmHg. Lo anterior favorece que la membrana del dializador prácticamente se rompa, por lo que pueden pasar diferentes partículas proteicas entre las que seguramente se encontraban algunas moléculas virales que permiten obtener una PCR positiva. Lo anterior no garantiza que incluso en estas condiciones el líquido de hemodiálisis sea infectante, ya que aunque la PCR sea positiva, el virus puede estar fragmentado. En nuestro estudio, al igual que en el estudio realizado por Caramelo⁹⁰, la búsqueda del virus en el líquido de hemodiálisis se realizó en condiciones habituales, es decir con una presión transmembrana de 0 mmHg. Por lo que en estas condiciones se puede garantizar que no pasa ninguna partícula viral al líquido. Aun así no se deben de perder la utilización de las precauciones universales para la manipulación de los dializadores de los pacientes infectados.

Nuestros resultados en conjunto muestran que la DPCA es la modalidad terapéutica que ofrece menor riesgo de contagio por VHC y que en caso de infección, es el tipo de diálisis en el que la velocidad de replicación viral es menor. Estos datos deberán de considerarse en cada caso en particular al escoger la modalidad dialítica, en especial cuando se piense que llevará tiempo poder realizar un trasplante renal. Finalmente, es muy importante evaluar el estado nutricional del paciente infectado, ya que éste puede tener inferencia en la cantidad de replicación viral y en el pronóstico del paciente infectado.

CONCLUSIÓN

La hepatitis viral C en pacientes con IRCT tiene una prevalencia total de 10.2%. En DPCA es de 4.5%, en HD de 12.7% y en el grupo de pacientes en DPCA con historia de hemodiálisis de 41.1%.

La carga viral es menor en DPCA que en las modalidades relacionadas con la hemodiálisis, lo que sugiere que la DPCA confiere menor riesgo de infección crónica o que la hemodiálisis favorece la replicación viral quizás por condicionar un estado de inmunosupresión relativa.

El genotipo viral más común en los pacientes infectados por virus de hepatitis C en cualquier tipo de diálisis es el 1b.

En el líquido de diálisis no se aisló el VHC, por lo que parece no ser infectante.

Los datos sugieren que en la mayoría de los casos la infección se adquirió antes de iniciar terapia sustitutiva

APÉNDICE I

Hoja de Captación de Datos

- 1 Número: _____
 - 2 Fecha: ____ / ____ / ____
 - 3 Nombre: _____
 - 4 Género: 1-Masculino. 2-Femenino.
 - 5 Edad: ____ años.
 - 6 Estado Civil: 1-Casado, 2-Divorciado, 3-Soltero, 4-Unión libre, 5-Viudo
 - 7 Homosexualidad----- 1-SI 2-NO
 - 8 Cónyuge o pareja ha recibido transfusiones---- 1-SI 2-NO
 - 9 Cónyuge o pareja tiene o ha tenido hepatitis---- 1-SI 2-NO
 - 10 Cirugías previas----- 1-SI 2-NO
 - 11 Transfusiones previas----- 1-SI 2-NO
 - 12 Recibió transfusión antes de 1991----- 1-SI 2-NO
 - 13 Ha tenido hepatitis----- 1-SI 2-NO
 - 14 Causa de la IRCT----- 1-GMN, 2-DM, 3-Uropatía Obstructiva, 4-Desconocida, 5-Hipoplasia, 6-Amiloidosis, 7-LEG, 8-Nefritis intersticial, 9-EPRA, 10-Rechazo
 - 15 Tipo de Terapia Sustitutiva----- 1-DPCA 2-DP/HD 3-HD
 - 16 Tiempo en ese tipo de terapia sustitutiva----- _____meses.
 - 17 Si está en DPCA, ha estado en HD----- 1-SI 2-NO
 - 18 Cuantas veces----- 1-SI 2-NO
 - 19 Tiempo de estancia en HD previa----- _____meses.
 - 20 Hace cuanto estuvo por última vez----- _____meses
 - 21 Unidad de Hemodiálisis----- 1-INNSZ, 2-INCICH, 3-MS
 - 22 Reusa filtros----- 1-SI 2-NO
 - 23 Cuantos reusos de los filtros tienen como máximo en su unidad_____
 - 24 Reusan filtros de pacientes con VHC----- 1-SI 2-NO
 - 25 En la máquina de reuso se lavan junto con filtros de pacientes no contaminados con VHC
----- 1-SI 2-NO
 - 26 Tipo de filtro----- 1-Celulosa, 2-Cuprofano, 3-Polisulfona
 - 27 Marca del filtro----- _____
 - 28 Número de reuso del filtro----- _____meses.
 - 29 Ha recibido transfusiones en diálisis----- 1-SI 2-NO Número _____
 - 30 Laboratorio
- BH: Hb____, Hto____, VGM____, CMHC____, Plaq____ ES. Na____, K____, Cl____, CO2____
- QS: Gluc____, BUN____, Aur____, CrS____.
- PFHs: BT____, BD____, FAlc____, AST____, ALT____, Alb____, TP____, Col____.

31. AgSVHB----- 1-Positivo 2-Negativo.
32. VIH----- 1-Positivo 2-Negativo.
33. Ac-VHC (ELISA II)----- 1-Positivo 2-Negativo. Fecha. _____
34. Ac-VHC(ELISA II)----- 1-Positivo 2-Negativo. Títulos: _____
35. PCR VHC----- 1-Positiva 2-Negativa
36. PCR en Líq. Diálisis o UF----- 1-Positivo 2-Negativo.
37. Subtipo viral: _____
-
38. Uso de bata al conectar y desconectar a los pacientes----- 1-SI 2-NO
39. Uso de guantes al conectar y desconectar a los pacientes----- 1-SI 2-NO
40. Desecho de guantes al terminar de conectar y desconectar al paciente---- 1-SI 2-NO
41. Lavado de manos con agua y jabón durante al menos 30 segundos después de desechar los
guantes
----- 1-SI 2-NO
42. Desecho inmediato de las jeringas----- 1-SI 2-NO
43. Se utiliza una jeringa individual para aplicar heparina al sistema y después se desecha.
----- 1-SI 2-NO
44. Se limpia el bote de la heparina con alcohol antes de insertar la jeringa---- 1-SI 2-NO
45. Se enjuaga la máquina entre paciente y paciente----- 1-SI 2-NO
46. Se limpia la máquina con cloro después de que se retira el paciente----- 1-SI 2-NO
47. Existe sistema de reuso----- 1-SI 2-NO
48. En caso de un paciente VHC+, se reusan los filtros----- 1-SI 2-NO
49. En caso de un paciente VHC+, se comparte la máquina----- 1-SI 2-NO
50. En caso de un paciente VHC+, se dializa en un cuarto aislado----- 1-SI 2-NO
51. Los paquetes globulares que se usan tienen determinación Ac-VHC----- 1-SI 2-NO
52. El personal tiene la vacuna para hepatitis B----- 1-SI 2-NO
53. El personal ha recibido un curso sobre el manejo de las precauciones universales.
----- 1-SI 2-NO

APÉNDICE II

EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL DEL PLASMA HUMANO

Debe trabajarse en todo momento con guantes y protección facial.

El plasma debe separarse de la sangre inmediatamente después de la obtención de la muestra.

- 3 mL de sangre en tubo de vidrio
- 3,000 r.p.m , 15 minutos
- Salvar sobrenadante en tubos Eppendorph de 1.5 mL
- Almacenar a -80°C

Para extracción del RNA viral (9 muestras)

- 500 μL de buffer de extracción* (495 μL + 5 μL de β -mercaptoetanol)
- 200 μL de plasma
- 90 μL de acetato de sodio, 2M, pH 4.0
- 500 μL de fenol saturado con tris
- 100 μL de cloroformo alcohol:isoamílico (24:1)
- Mezclar en *vortex* todo
- Centrifugar a 12,000 r.p.m durante 5 min.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (parte superior ~500 μL)
- Agregar volumen 1:1 de fenol saturado con tris (~250 μL) – cloroformo:alcohol:isoamii (~250 μL) (25:24:1)
- Mezclar en *vortex*
- Centrifugar 5 minutos a 12,000 r.p.m.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (parte superior ~400 μL)
- Agregar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, pH 5.2 (~40 μL)
- Agregar 2 volúmenes de isopropanol (~800 μL)
- Mezclar en *vortex*
- Incubar a -20°C durante 16 horas o -80°C durante 1 hora
- Centrifugar a 14,000 r.p.m , 30 min. 4°C
- Lavar con etanol al 70% (tirar el líquido y agregar el etanol)
- Centrifugar a 14,000 r.p.m., 5 min 4°C
- Secar en el Speed vac durante 5 min, hasta que no haya etanol
- Resuspender en 40 μL de agua-DEPC grado PCR. Usar 10 μL en los positivos.
- Guardar a -80°C

*Buffer de Extracción

isotiocianato de guanidina 4M

Citrato de sodio 25 mmol/L

Sarcosil 0.5%

β_2 -mercaptoetanol 1%

pH 7.0

APÉNDICE III

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Importante: Usar siempre guantes
Asegurarse de usar tubos estériles

Tomar 11 L de RNA en tubos de PCR

Calentar a 65°C durante 10 minutos - Programa 65° del ciclador térmico

- Preparar mix general:

Buffer de TR	4 μ L	} 9 μ L (1 muestra)	58 μ L	} 130.5 μ L (14 muestras de 9 μ L)
DTT	2 μ L		29 μ L	
dNTP's	1 μ L		14.5 μ L	
Primer antisense (211)	1 μ L		14.5 μ L	
MMLV-TR	1 μ L		14.5 μ L	

- Preparar mix controles:

Buffer de TR	4 μ L	} 9 μ L (1 muestra)	58 μ L	} 130.5 μ L (14 muestras de 9 μ L)
DTT	2 μ L		29 μ L	
dNTP's	1 μ L		14.5 μ L	
Primer antisense (211)	1 μ L		14.5 μ L	
H ₂ O BM	1 μ L		14.5 μ L	

- Agregar 9 μ L del mix a cada muestra. Volumen total de 20 μ L
- En caso de positivos: 1 control por cada muestra. Negativos con control de cDNA en la PCR
- Calentar las muestras a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente 95°C durante 5 min. Al concluir 4°C por tiempo indefinido - Programa TR del ciclador térmico
- Agregar 20 μ L de H₂O-BM, para llegar a un volumen final de 40 μ L
- Guardar a -20°C

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE IV

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Reacciones de 25 μL

- Hacer el mix:

H ₂ O BM	9.45 μL								
Buffer PCR _{10x}	2.5 μL	}	15 μL (1 muestra)	137 μL	}	217.5 μL (14 muestras de 15 μL)	156 μL	}	+ 10 $\mu\text{L C -}$ 247.4 μL (16 muestras de 15 mL) C + y C -
MgCl ₂	1.0 μL			36.2 μL			41.2 μL		
Buffer MM _{50x}	0.5 μL			14.5 μL			16.5 μL		
dNTP's	0.5 μL			7.25 μL			8.2 μL		
Primers	1.0 μL			7.25 μL			8.2 μL		
Taq DNA pol	0.05 μL			14.5 μL			16.5 μL		
				0.82 μL					

- Agregar 15 μL a cada tubo
- Fuera pipetas de PCR**
- Agregar 10 μL de la solución sometida de TR (cDNA o template) Siempre correr un control (-)
- Agitar cada muestra
- Agregar 20 μL de Aceite mineral para PCR – Centrifugar durante 30 segundos
- Programa HCV-AB
- Al finalizar, guardar las muestras a -20°C

APÉNDICE V
GEL DE ACRILAMIDA

Tubo de 15 mL por cada gel, agregar:

- Acrilamida 1.5 mL
- TBE 5x 2.0 mL
- Agua no BM 6.4 mL
- APS 100 μ L
- Temed 10 μ L

- Vortexear la mezcla y agregarla en la caja del gel
- Utilizar la caja con peines gruesos (10)
- Esperar a que polimerice aproximadamente 60 minutos
- Aplicar las muestras junto con buffer de DNA (gel loading) 3 μ L por cada 10 μ L de muestra
- Correrlo a 100 volts – hasta el electrodo

- Exponer el gel a bromuro de etidio 10 μ L en 100 mL de TBE 1x (5 a 20 minutos)
- Lavarlo en agua (7 a 30 minutos)
- Fotografía 1/8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Hu K-Q, Yu C-H, and Vierling J M. One-step RNA polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus RNA. *Hepatology*. 1993;18:270.
- ² Kondo Y, Tsukada K, Takeuchi T, Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Itoh T, Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. High carrier rate after hepatitis B virus infection in the elderly. *Hepatology*. 1993;18:768.
- ³ Zhang Y-Y, Hansson B G, Kuo L S, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology*. 1993;17:538.
- ⁴ Blum H E, Liang T J, Galun E, Wands J R. Persistence of hepatitis B viral DNA after serological recovery from hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 1991;14:56.
- ⁵ Zeldis J B, Lee J H, Mamish D, Finegold D J, Sircar R, Ling Q, Knudsen P J, Kuramoto I K, Mimms L T. Direct method for detecting small quantities of hepatitis B virus DNA in serum and plasma using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1989;84:1503.
- ⁶ Bukh J, Purcell R H, Miller R H. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:187.
- ⁷ Cristiano K, Bisceglie A M D, Hoofnagle J H, Feinstone S M. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Hepatology*. 1991;14:51.
- ⁸ Castelnovo C, Lunghi G, DeVecchi A, Grancini A, Como G, Graziani G, Scalomogna A, Ponticelli C. Comparison of three different tests for assessment of hepatitis C virus in dialysis patients. *Perit Dial Int*. 1995;15:241.
- ⁹ Chauveau P, Courouce AM, Lemarec N. Antibodies to hepatitis C virus by second generation test in hemodialyzed patients. *Kidney Int*. 1993;43:S149.
- ¹⁰ Innocenti M, Mazzoni A, Paillo P. Comparison of anti-hepatitis C virus detection with ELISA assay and RIBA 4 in dialysis patients: Our experience. *Nephron*. 1992;61:315.
- ¹¹ DeMedina M, Ortiz C, Krenc C, Leete J, Vallari D, Hill M, LaRue S, Jimenez M, Anderson W, Schiff E. Improved detection of antibodies to hepatitis C virus in dialysis patients using a second-generation enzyme immunoassay. *Am J Kidney Dis*. 1992;20:589.
- ¹² Kuhns M, McNamara A, de Medina M, Jeffers L J, Reddy K R, Silva M, Ortiz-Interian C, Jimenez M, Schiff E R, Perez G. Detection of hepatitis C virus RNA in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4:1491.
- ¹³ Yoshika K, Ishikara T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alfa therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology*. 1992;16:293.
- ¹⁴ Lemon SV, Brown EA. Hepatitis C virus. In Principles and practice of Infectious Diseases. 1995. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Churchill Livingstone. New York.1474.
- ¹⁵ Oshita M, Kasahara A, Mita E, Naito M, Fusamoto H, Kamada T. Increased serum hepatitis C virus RNA levels among alcoholic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1994;1115.
- ¹⁶ Davis G L, Lau Johnson Y-N, Urdea M S, Neuwlad P D, Wilber J C, Lindsay K, Perrillo R P, Albrecht J. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification

method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology*. 1994;19:1337.

¹⁷ Mita E, Hayashi N, Kanazawa Y, Hagiwara H, Ueda K, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Hepatitis C virus genotype and RNA titer in the progression of type C chronic liver disease. *J Hepatol*. 1994;21:468.

¹⁸ Brunetto M R, Giann M M, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A, Serra A, Saracco G, Verme G, Will H, Bonino F. Wild-type and e antigens-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:4186.

¹⁹ Dusheiko G, Brown D, Yap P-L, Simmonds P. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*. 1994;19:13.

²⁰ Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis*. 1993;168:1343.

²¹ Dussel B, Clicleportiche C, Contalovhe J. Detection of hepatitis C infection by polymerase chain reaction among hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1993;22:574.

²² Hardy NM. Antibody to hepatitis C virus increases with time on hemodialysis. *Clin Nephrol*. 1992;38:44.

²³ Fabrizi F, Lunghi G, Guarnori I, Raffaele L, Erba G, Pagano A, Locatelli F. IgM antibody response to hepatitis C virus in end-stage-renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:314.

²⁴ Medin C, Allander T, Roll M. Seroconversion to hepatitis C virus in dialysis patients: A retrospective and prospective study. *Nephron*. 1993;65:40.

²⁵ Okamoto H, Kurai K, Okada SJ. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome heaving poor homology to reported isolates: Comparative study of four distinct genotypes. *Virology*. 1992;188:331.

²⁶ Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for the diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*. 1991;14:381.

²⁷ Okamoto H, Sugiyama Y, Akahane Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol*. 1992;673.

²⁸ Hayashi N, Sugimoto H, Hayashi K, Shikata T. Molecular cloning and heterogeneity of the human hepatitis C virus (HCV) genome. *J Hepatol*. 1993;17 (Suppl 3):S94.

²⁹ Simonds P, *et al*. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993;31:1493.

³⁰ Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 25:1527-38.

³¹ Seaworth WW, Garrett LE, Hamilton JD. Non-A, non-B hepatitis and chronic dialysis: Another dilemma. *Am J Nephrol*. 1984;4:235.

³² Shusterman N, Singer I. Infectious hepatitis in dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1987;9:447.

³³ Galbraith RM, Dienstag JL, Purcell RH. Non-A, non-B hepatitis associated with chronic liver disease in a haemodialysis unit. *Lancet*. 1979;1:951.

-
- ³⁴ Mazzone A, Innocenti M, Consaga M. Retrospective study on the prevalence of B and non-A, non-B hepatitis in a dialysis unit: 17-year follow-up. *Nephron*. 1992;61:316.
- ³⁵ Jefer LJ, Perez GO, DeMedina M. Hepatitis C infection in two urban hemodialysis units. *Kidney Int*. 1980;38:320.
- ³⁶ Lin HH, Huang CC, Sheen IS, Lin DY. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in the hemodialysis unit. *Am J Nephrol*. 1991;11:192.
- ³⁷ Almorh G, Kormo B, Hed J. Antibody responses to hepatitis C virus and its modes of transmission in dialysis patients. *Nephron*. 1991;59:232.
- ³⁸ Hayashi J, Nakashima K, Kajiyama W, Noguchi A, Morofuji M, Maeda Y, Kashiwagi S. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Am J Epidemiol*. 1991;134:651.
- ³⁹ Simon N, Courouce AM, Lemarrec N, Trepo C, Ducamp S. A twelve year natural history of hepatitis C virus infection in hemodialysed patients. *Kidney Int*. 1994;46:504.
- ⁴⁰ Kuo G, Redeker A G, Purcell R H, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989;244:362-364.
- ⁴¹ Choo Q-L, Overby L R, Bradley D W, Houghton M. Isolation of a c-DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244:359.
- ⁴² Rivanera D, Iilli D, Lorino G, Pirozzi V, Cannulla V, Dicuonzo G, Mancini C. Detection of antibodies to hepatitis C virus in dialysis patients. *Eur J Epidemiol*. 1993;9:55.
- ⁴³ DaPorto A, Adami A, Susanna F. Hepatitis C virus in dialysis units: A multicenter study. *Nephron*. 1992;61:309.
- ⁴⁴ Conway M, Casterall AP, Brown EA. Prevalence of antibodies to hepatitis C in dialysis patients and transplant recipients with possible routes of transmission. *Nephrol Dial Transplant*. 1992;7:1226.
- ⁴⁵ Niu MT, Coleman PJ, Alter MJ. Multicenter study of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients and hemodialysis center staff members. *Am J Kidney Dis*. 1993;22:568.
- ⁴⁶ Fabrizi F, Raffaele L, Bacchini G, Guarnori I, Pontoriero G, Erba G, Locatelli F. Antibodies to hepatitis C virus and transaminase concentration in chronic haemodialysis patients: a study with second-generation routes other than transfusion may occur and diagnosis may be delayed in this group of patients probably due to a poor immunological response. *Nephrol Dial Transplant*. 1993;8:744.
- ⁴⁷ Vandelli L, DePalma M, Vecchi C, Lusvarghi E. Behavior of antibody profile against hepatitis C virus in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron*. 1992;61:260.
- ⁴⁸ Tokars J, Alter MJ, Favero MS, Moyer LA, Miller E, Bland LA. National surveillance of hemodialysis associated diseases in the United States, 1992. *ASAIO J*. 1994;40:1020.
- ⁴⁹ Pereira BJ, Levey AS. Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int*. 1997;51:981.
- ⁵⁰ Spanish Multicentre Study Group. Prevalence of hepatitis C virus in dialysis patients in Spain. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:78.

-
- ⁵¹ McIntyre PG, McCrudden EA, Dow BC, Cameron SO, McMillian MA, Allison ME, Briggs JD. Hepatitis C virus infection in renal dialysis patients in Glasgow. *Nephrol Dial Transplant*. 1994;9:291.
- ⁵² Cantu P, Mangano S, Masini M, Limido A, Crovetto G, DeFilippo C. Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in a dialysis unit. *Nephron*. 1992;61:337.
- ⁵³ Huang CC, Wu MS, Lin DY, Liaw YF. The prevalence of hepatitis C virus antibodies on patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 1992;12:31
- ⁵⁴ Barril G, Traver JA. Prevalence of hepatitis C virus in dialysis patients in Spain. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(Suppl 6):78.
- ⁵⁵ Dussol B, Berthezene P, Brunet P, Roubicek C, Berland Y. Hepatitis C virus infection among chronic dialysis patients in the south of France: a collaborative study. *Am J Kidney Dis*. 1995;25:399.
- ⁵⁶ Gilli P, Soffritti S, DePaoli-Vitali E, Bedani PL. Prevention of hepatitis C virus in dialysis units. *Nephron*. 1995;70:301.
- ⁵⁷ Yuasa T, Ishikawa G, Manabe S, Sekiguchi S, Takeuchi K, Miyamura T. The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through micro porous regenerated cellulose fiber. *J Gen Virol* 1991;72:2021
- ⁵⁸ Nolph KD. 1990. Clinical results with peritoneal dialysis. Registry experiences. In Peritoneal dialysis. Twardowski ZJ, Nolph KD, and Khanua R, editors. Churchill Livingstone, New York 127-144.
- ⁵⁹ Alberú J, Lisker-Melman M, González F, Vargas-Vorácková F, Sixtos S, Ramírez T, DeLeo C, Castelán N, Bordes-Aznar J, Correa-Rotter R. Prevalence of hepatitis B and C in patients registered on the cadaver kidney transplant at waiting list in Mexico. *Transplantation Proc*. 1996;28:3298.
- ⁶⁰ Fabrzi F, Lunghi G, Guarnori I, Raffaele L, Erba G, Pagano A, Locatelli F. Hepatitis C virus genotypes in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:679.
- ⁶¹ Glantz S A and Slinker B K. 1990. Regression with a qualitative dependent variable. In Primer of applied regression and analysis of variance. Glantz S A and Slinker B K, editors. McGraw Hill, New York. 512.
- ⁶² Cuypers HTM, Bresters D, Winkel IN. Storage conditions of blood samples and primer selection affect the yield of cDNA polymerase chain reaction products of hepatitis C virus. *J Clin Micro*. 1992;30:3220.
- ⁶³ Busch MP, Wilber JC, Johnson P, Tobler L, Evans CS. Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion*. 1992;32:420.
- ⁶⁴ Bobadilla NA, Gamba G. Biología molecular en medicina, V. Reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Invest Clín*. 1996;48:401.
- ⁶⁵ Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. In *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 7.3-7.6.
- ⁶⁶ Oesterreicher C, Pfeffel F, Muller C. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney Int*. 1995;48:1967.

-
- ⁶⁷ Amorosso P, Rapicetta M, Tosti ME, Mele A, Spada E, Buonocore S, Lettieri G, Pierrri P, Chionne P, Ciccaglione AR, Saggioca L. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *J Hepatol*. 1998;28:939-44
- ⁶⁸ Davidson F, Simmonds P, Teo D, Yap PI. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol*. 1995;76:1197.
- ⁶⁹ Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463.
- ⁷⁰ Zar J H. 1984. Biostatistical analysis. Prentice Hall Book Company, New York.
- ⁷¹ Ley General de Salud. 1993. Editorial Porrúa. México. pp. 417-9
- ⁷² Natov SN, Lau JY, Bouthot BA, Murthy BV, Ruthazer R, Schmid CH, Levey AS, Pereira BJ. Serologic and virologic profiles of hepatitis C infection in renal transplant candidates. New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. *Am J Kidney Dis*. 1998;31:920-7.
- ⁷³ Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Cole MJ, Gerosa S, Vinson S, Mousa M, Gitnick G. Quantitative assessment of HCV load in chronic hemodialysis patients. a cross-sectional survey. *Nephron* 1998;80:428-33
- ⁷⁴ Schneeberger PM, Keur I, van der Vliet W, van Hoek K, Boswijk H, van Loon AM, van Dijk WC, Kauffmann RH, Quint W, van Doorn LJ. Hepatitis C virus infections in dialysis centers in The Netherlands: a national survey by serological and molecular methods. *J Clin Microbiol* 1998;36:1711-5
- ⁷⁵ Chan TM, Lau JY, Wu PC, Lai CL, Lok AS, Cheng IK. Hepatitis C genotypes in patients on renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:731-4.
- ⁷⁶ Goessens C, Jadoul M, Waion C, Burtonboy G, Cornu C. Hepatitis C virus genotypes in hemodialyzed patients. a multicenter study. *Clin Nephrol* 1997;47:367-71.
- ⁷⁷ Missale G, Cariani E, Lamonaca V, Ravaggi A, Rossini A, Bertoni R, Houghton M, Matsuura Y, Miyamura T, Fiaccadori F, Ferrari C. Effects of interferon treatment on the antiviral T-cell response hepatitis C virus genotype 1b- and genotype 2c- infected patients. *Hepatology*. 1997;26:792-7.
- ⁷⁸ Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Quantitation of hepatitis C virus RNA serum of asymptomatic blood donors and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology*. 1993;17:545-50.
- ⁷⁹ Rampino T, Arbustini E, Gregorini M, Gualini P, Libetta C, Maggio M, Ranghino A, Silini E, Soccio G, Canton AD. Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis C virus: Role of hepatocyte growth factor. *Kidney Int*. 1999;56:2286-91.
- ⁸⁰ Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y, Matsumoto K, Nakamura T. Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotropic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect in vivo. *Hepatology*. 1992;16:1227-35
- ⁸¹ Shiota G, Wang CT, Nakamura T, Schmidt EV. Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology*. 1994;19:962-72.
- ⁸² Okano J, Shiota G, Kawasaki H. Protective action of hepatocyte growth factor for acute liver injury caused by D-galactosamine in transgenic mice. *Hepatology* 1997;26:1241-9.

-
- ⁸³ Ruiz P, Gomez F, Schirbner AD. Impaired function of macrophage in end-stage renal disease. *N Engl J Med.* 1990;322:717.
- ⁸⁴ Castiglione A, Pagliaro R, Romagnoni M. Flow cytometric analysis of leukocytes eluted from haemodialysers. *Nephrol Dial Transplant.* 1991;6:31.
- ⁸⁵ Coles GA, Lewis SL, Williams JD. Host defence and effects of solutions on peritoneal cells. In: The textbook of peritoneal dialysis. Gokal R and Nolph KD. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1994. Pp:503-28
- ⁸⁶ Lewis S, Holmes C. Host defense mechanisms in the peritoneal cavity of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 1991;11:14.
- ⁸⁷ Qureshi AR, Alvestrand A, Danielsson A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Lindholm B, Bergstrom J. Factors predicting malnutrition in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Kidney Int.* 1998;53:773-82.
- ⁸⁸ Yeun JY, Kaysen GA. Factors influencing serum albumin in dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;32:S118-25.
- ⁸⁹ Wolfson M, Strong CJ, Minturn D. Nutritional status and lymphocyte function in maintenance hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr.* 1984;39:547.
- ⁹⁰ Caramelo C, Navas S, Alberola ML, Bermejillo T, Reyero A, Carreno V. Evidence against transmission of hepatitis C virus through hemodialysis ultrafiltrate and peritoneal fluid. *Nephron.* 1994;66:470-3.
- ⁹¹ Castelnovo C, Sampietro M, De Veechi A, Corbetta N, Cantu M, Orlandi A, Lunghi G, Ponticelli C. Diffusion of HCV through peritoneal membrane in HCV positive patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12:978-80
- ⁹² Gladziwa U, Schlipkoter U, Lorbeer B, Cholmakow K, Roggendorf M, Sieberth HG. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in patients on peritoneal dialysis – a multicenter study. *Clin Nephrol.* 1993;40:46-52.
- ⁹³ Kruatzig S, Tillmann H, Wrenger E, Manns M, Koch KM, Brunkhorst R. Hepatitis C virus (HCV) in peritoneal dialysis patients. *Clin Nephrol.* 1994;41:120.
- ⁹⁴ Valtuille R, Fernandez JL, Berridi J, Moretto H, del Pino N, Rendo P, Lef L. Evidence of hepatitis C virus passage across dialysis membrane. *Nephron.* 1998;80:194-6.