



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

UMAE HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA

“Dr. Daniel Méndez Hernández”

Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología.

CURSO DE ESPECIALIZACIÓN MÉDICA EN PATOLOGÍA CLÍNICA

**“CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA INFECCIÓN
OCULTA POR EL VIRUS C DE LA HEPATITIS EN LA
POBLACION QUE ACUDE AL BANCO CENTRAL DE SANGRE
DEL CMN LA RAZA”**

O

TESIS DE POSGRADO

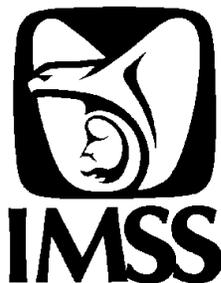
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALIDAD MÉDICA EN PATOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:

DR. OSCAR ANTONIO ARROYO ARROYO

ASESORA: **Dra. Gloria Ma. Calderón Rodríguez.**



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2011



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.

RESUMEN

“CARACTERISTICAS MOLECULARES DE LA INFECCION OCULTA POR EL VIRUS C DE LA HEPATITIS EN LA POBLACION QUE ACUDE AL BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CMN LA RAZA”

ANTECEDENTES: La infección oculta del virus de Hepatitis C (VHC) es una nueva entidad recientemente caracterizada. La infección oculta puede presentarse en dos situaciones clínicas diferentes: en pacientes con funciones hepáticas anormales y con anticuerpos para VHC y RNA-VHC negativo en suero y en pacientes con los valores normales en las funciones hepáticas, positivo a anticuerpos de VHC y sin el RNA del VHC en suero. La Organización Mundial de la Salud estima que por lo menos 170 millones de personas de la población mundial padecen infección crónica del VHC. Actualmente se desconoce la prevalencia de la infección oculta del virus de hepatitis C. (VHC oculta).

OBJETIVOS DEL ESTUDIO: General. Conocer las características moleculares de la infección oculta por el virus de la hepatitis C en la población candidata que acude al Banco Central de Sangre del CMN La Raza. **Particulares.** A) Obtención de muestras sanguíneas de la población que acude al Banco Central de Sangre del CMN La Raza; B) Realizar por PCR anidada punto final a partir de plasma y leucocitos la detección del VHC oculta.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se analizaron un total de 500 personas del banco de sangre del CMN La Raza, a las que se les pidió su autorización para participar en el protocolo, posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica, de las cuales se extrajeron el plasma y paquete celular. Se obtuvo el RNA y posteriormente mediante la síntesis del cDNA se realizaron pruebas cualitativas con PCR nested de punto final para detección del virus de la hepatitis C en cada muestra utilizando los iniciadores KY78, KY80, FIP y RIP. Se realizó un análisis estadístico de los resultados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION: Debido a que en la actualidad se desconoce el número de pacientes infectados por el virus C de la hepatitis oculta, este estudio nos ayudará para su detección en población abierta mediante técnicas de biología molecular.

INDICE

Antecedentes Científicos.....	1
Planteamiento del Problema.....	10
Justificación.....	11
Objetivos.....	11
Metodología.....	12
Tipo de Estudio	12
Criterios de Selección.....	12
Tamaño de la Muestra	12
Resultados	15
Discusión.....	21
Bibliografía.....	28

INTRODUCCION

La hepatitis C es una enfermedad hepática causada por el virus de la hepatitis C (VHC). Identificado inicialmente como virus no A no B, el virus de la hepatitis C fue descubierto en 1989 y a partir de ese momento ha sido reconocido como causa importante de la enfermedad crónica del hígado^{1,2}.

En el año 2004 Castillo y cols³, reportaron un estudio con 100 sujetos entre 22 y 66 años de edad con pruebas de función hepática alteradas (ALT, AST, GTP) por lo menos durante un año y serología para el VHC y RNA del VHC en suero negativos, encontrando 57% positivos para la infección oculta del virus C; determinándose mediante la prueba de transcriptasa reversa (RT) en PCR e hibridación in situ en los hepatocitos y en monocitos de sangre periférica, encontrando 40 (70%) positivos de los 57 pacientes con RNA del VHC intrahepático. Una de las limitantes de este estudio es que solo incluía a sujetos seronegativos con persistencia anormal de los niveles de las enzimas hepáticas, sin evaluar individuos con alto riesgo de infección por el VHC, independientemente del RNA del VHC, anti-VHC, o alteración de enzimas hepáticas (ALT / GGT) como por ejemplo usuarios de drogas inyectables, politransfundidos y pacientes que habían resuelto la infección ya sea espontáneamente o como resultado del tratamiento, sin embargo estos estudios iniciaron la pauta para determinar una nueva patología dentro de las hepatitis, la infección oculta por el virus de la hepatitis C. Posteriormente, Castillo y cols.⁴ analizaron a 18 pacientes los cuales pertenecían al estudio anterior; cuyo objetivo fue estudiar la replicación del VHC en los monocitos de sangre periférica; estos pacientes tenían como características pruebas de función hepática alteradas de etiología desconocida y que ya contaran con el diagnóstico de infección por el VHC oculta (confirmada por RT-PCR en hepatocito y con RNA viral negativo en suero); ninguno de ellos documentaba factores de riesgo para la enfermedad (transfusiones, toxicomanías, conducta sexual, tatuajes o perforaciones). El 61% resultaron positivos para la presencia del RNA de cadena negativa, detectada por PCR y que, posteriormente, se confirmó mediante hibridación in situ en monocitos de sangre periférica; concluyendo que el VHC se replica en los monocitos de sangre periférica de pacientes con infección por el VHC oculta determinando que estos pacientes (aunque no tienen virus detectable en circulación) son potencialmente infecciosos⁴.

En el 2007, Bartolomé y cols.⁵ demostraron que una proporción significativa de pacientes con infección por VHC oculta tienen bajos niveles de RNA del VHC en suero, que sólo son detectables después de la ultracentrifugación. En 106 sujetos (74 hombres) encontraron 58% positivos para infección de VHC oculta mediante el ultracentrifugado del suero y al comparar la edad,

sexo, duración de la enfermedad así como los niveles de alanina aminotransferasa y gamma-glutamyl transpeptidasa no se observaron diferencias entre pacientes con y sin niveles detectables de RNA del VHC en el suero después de la ultracentrifugación. Con respecto al daño histológico, tampoco se encontraron diferencias estadísticas con esteatosis, inflamación hepática y fibrosis en los pacientes con y sin niveles detectables del RNA del VHC en suero.

En 2009, De Marco y cols., evaluaron la prevalencia del VHC oculta, en 276 sujetos (111 hombres y 165 mujeres), aparentemente libres de enfermedad hepática, con pruebas de funcionamiento hepático normales y pruebas serológicas negativas para el VHC, encontrándose una prevalencia del 3,3% positivo para el VHC oculta. Halfon y cols.³⁵ evaluaron la técnica de PCR en tiempo real ultrasensible, en una muestra de 70 sujetos en los que se incluían pacientes con pruebas de función hepática alteradas, pacientes con vasculitis sistémica y con enfermedad del tejido conectivo; la replicación del VHC se evaluó en células polimorfonucleares de sangre periférica, encontrándose 14 pacientes positivos (20%) mediante esta prueba diagnóstica. Uno de los límites de este estudio es la ausencia del análisis de muestras hepáticas. Sin embargo, la prueba de RNA del VHC en polimorfonucleares de sangre periférica ha demostrado ser confiable para la identificación de pacientes con infección por el VHC oculta cuando la biopsia hepática no está disponible^{6,7}.

Uno de los factores de riesgo importantes en la infección oculta por el virus de la hepatitis C se observa en los pacientes sometidos a hemodiálisis, con ausencia de serología positiva pero RNA positivo para el VHC^{8,9}, en la India, Pankaj y cols.¹⁰, participaron en un estudio prospectivo durante un año con sujetos con enfermedad renal terminal y hemodiálisis, en donde los criterios de inclusión fueron con sujetos con enzimas hepáticas alteradas por más de un año, anticuerpos para el VHC negativos y PCR en suero negativo, encontrando 90% positivos para la infección por el VHC oculta. Recomendando practicarse en la población en hemodiálisis una prueba para detectar el RNA del VHC oculta.

Uno de los primeros estudios para la detección de pacientes en hemodiálisis con la infección por el virus de la hepatitis C de la hepatitis la realizó Barril y cols. en el 2008¹¹, quienes estudiaron en 10 unidades de hemodiálisis una población de 109 pacientes con criterios de al menos presentar 6 meses con niveles anormales de ALT y GTP, serología negativa para marcadores de VHB, VHC y VIH; excluyeron sujetos con alguna enfermedad hepática (por ejemplo enfermedades autoinmunes, hepatitis toxica, desordenes metabólicos, etc.), obteniéndose resultados positivos para RNA-VHC

genómico en 49 pacientes (45%) de los cuales se observó que un 53% presentaban replicación del VHC y un 70% de éstos pacientes eran positivos para el VHC en células PMNs. También se observó un riesgo 3 veces mayor de morir si presentaban positividad para la infección del VHC oculta en mayores de 60 años¹².

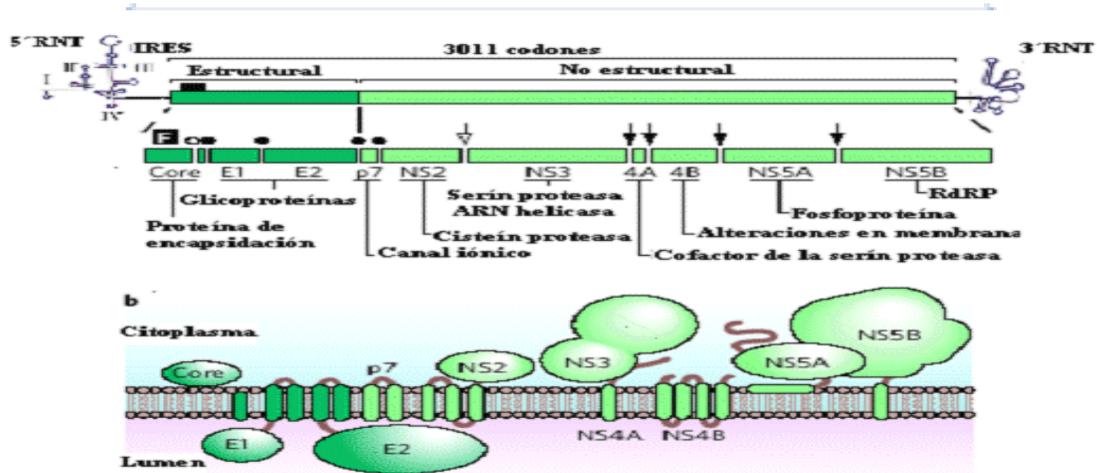
El estudio actual de la infección por el virus C de la hepatitis, es una nueva forma de abordar el tema de este problema de salud a nivel mundial, considerando que actualmente existen muchos factores de riesgo relacionados con esta nueva forma del virus, que repercuten tanto a nivel socioeconómico como en la salud de los individuos. A nivel del Instituto Mexicano del Seguro Social, no solo es importante la detección del virus en bancos de sangre, sino también en todas aquellas personas en alto riesgo como hemofílicos, hemodializados, politransfundidos, y pacientes pre-trasplante.

AGENTE INFECCIOSO

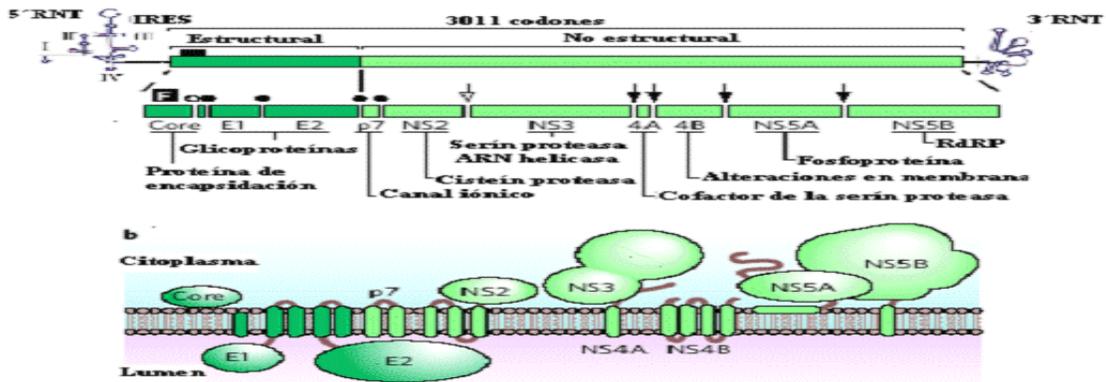
El VHC es un virus de RNA de una sola cadena de polaridad positiva, perteneciente a la familia de los Flavivirus, miembro del genero Hepacivirus. Está compuesto por una envoltura lipoproteica que rodea una cápside icosaédrica de 60nm. Su genoma monocatenario de polaridad positiva está compuesto por un solo genoma con 9,600 nucleótidos capaces de sintetizar las lipoproteínas virales que están compuestas por aproximadamente 3,000 aminoácidos^{13,14,15}. El genoma codifica para una poliproteína que sirve para configurar por lo menos 10 proteínas virales maduras, tres estructurales (Core, E1y E2) que son liberadas de la poliproteína después del anclaje al retículo endoplásmico de la célula huésped y 7 proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) que son ensambladas por la proteasa NS2-3 y NS3-4^{14,15}.

Hepatitis C virus RNA

9600 nt bases



p22 gp35 gp70 p7 p23 p70 p8 p27 p56/58 p68



La replicación de este virus ocurre a través de una RNA polimerasa que comete frecuentes errores de transcripción, lo que origina una serie de mutaciones debido a una diferencia de alrededor del 30% produciendo los (6 o 7 dependiendo de la bibliografía) subtipos y una diversidad de sub o cuasiespecies cuando la diferencia es menor al 10%^{15,16,17}. Se describen por lo menos 6 genotipos y más de 100 subtipos del VHC, los genotipos se designaron con números arábigos en el orden de su descubrimiento y los subtipos se denominaron con letras^{15,16,17}. El genotipo no parece correlacionarse con la elevación de las transaminasas hepáticas ni con la gravedad de la enfermedad, pero sí con la respuesta al tratamiento^{16,17}.

Genotipos y Cuasiespecies		
Término	Definición	Similitud Nucleótidos
Genotipo	Heterogeneidad entre diferentes virus	60% – 85%
Subtipo	Virus estrechamente relacionados dentro de cada genotipo	77% – 80%
Cuasiespecies	Complejo de variantes genéticas dentro de un individuo	91% – 99%

The map illustrates the global distribution of Hepatitis C virus (HCV) genotypes and subtypes. Genotype 1 is the most prevalent, with subtypes 1a and 1b found in North America, Europe, and Australia. Genotype 2a is found in East Asia. Genotype 3a is found in South America, Europe, and Africa. Genotype 4 is found in West and Central Africa. Genotype 5a is found in East Africa. Genotype 6a is found in Southeast Asia and Oceania.

FISIOPATOGENIA

HEPATITIS C AGUDA

La hepatitis C aguda dura entre 3 a 6 meses y se observa después de la exposición inicial; el RNA viral se detecta precozmente (11 días) en la circulación y se observa una elevación de la alanina transaminasa y aspartato transaminasa (ALT y AST) en un plazo variable entre 15 y 150 días (promedio 50 días)¹⁸. La mayoría de los pacientes infectados (70-80%) permanecen asintomáticos. El cuadro clínico de una hepatitis viral aguda se presenta en menos del 30% de los casos y se caracteriza por astenia, adinamia, anorexia, ocasionalmente dolor en hipocondrio derecho e ictericia. La duración del cuadro es de 2 a 12 semanas. Los anticuerpos se detectan en el 90% de los pacientes durante los 3 meses de la infección. En el 15 – 25% de los casos, esta infección es autolimitada¹⁹.

HEPATITIS C CRÓNICA

Aproximadamente el 80% de los pacientes infectados por el VHC progresan hacia una etapa crónica, asintomática y de lenta evolución. Estos pacientes presentan una viremia persistente, la cual es a veces intermitente. La alteración de laboratorio más característica es la ALT y AST que fluctúa el

valor máximo normal y hasta mayores 10 veces^{19,20}. Un 30% de los pacientes presenta valores normales. Sin embargo, prácticamente todos estos pacientes tienen evidencias histológicas de hepatitis crónica por lo que es un error clasificarlos como "portadores sanos" del VHC²⁰.

El ritmo de progresión es muy variable, en general el tiempo transcurrido entre el momento de adquisición de la infección y el desarrollo de cirrosis es de décadas aunque este período puede ser considerablemente menor si concomitantemente hay comorbilidades como el alcoholismo o infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Es aceptado que existe mala correlación entre el nivel de transaminasas y la severidad de los cambios histológicos lo que pone en evidencia la necesidad de evaluar a todos los pacientes infectados con diversos marcadores con el propósito de definir el grado de afectación y su pronóstico²⁰.

DIAGNÓSTICO

La FDA (Food and Drug Administration) autorizó los primeros exámenes para la detección de anticuerpos contra el VHC (anti- VHC) en 1990²¹.

Los exámenes para diagnóstico del VHC se pueden dividir en dos grandes categorías: pruebas serológicas indirectas que detectan anticuerpos del VHC mediante las prueba de EIA/ELISA de tercera generación ó cuarta generación; y pruebas directas que detectan, cuantifican o caracterizan componentes virales como el RNA o la región del core del VHC mediante pruebas moleculares (PCR)²². Así mismo también se realizan determinaciones de PCR en tiempo real denominadas carga viral que se refiere a la medición de la cantidad del RNA del VHC presente en el suero de un paciente infectado. Existen varios métodos para la cuantificación de ácidos nucleicos, estos difieren en sensibilidad, rango de cuantificación, precisión y reproducibilidad²¹.

INFECCION OCULTA POR EL VIRUS C DE LA HEPATITIS (HEPATITIS C OCULTA).

En 2004 el equipo de la Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales dirigido por el Dr. Vicente Carreño en España, definió una nueva forma de hepatitis C: la infección por el virus C de la hepatitis (VHC oculta)²³. Este tipo de infección se caracteriza por la detección del genoma viral, preferentemente en tejido hepático o células polimorfonucleares de sangre periférica, en pacientes con elevación o no de transaminasas, con suero o plasma anti-VHC negativo por ELISA y PCR^{23,3}.

Los pacientes con infección por el VHC oculta presentan anti VHC y RNA viral negativos en suero, confirmándose principalmente el diagnóstico por PCR obtenido del botón celular de células

polimorfonucleares o de hepatocitos, siendo no necesariamente el diagnóstico mediante biopsia hepática^{4,7}. En el 70% de los pacientes en los que se detecta infección por el VHC oculta en hígado, puede detectarse el RNA viral en células polimorfonucleares de sangre periférica como ya se mencionó anteriormente por PCR, a pesar de la ausencia de marcadores del VHC en el suero^{24,4}, ya que estas células operan como reservorios naturales del virus. Desafortunadamente todavía este tipo de técnicas no se realizan en la mayoría de los laboratorios.

En la infección oculta del VHC, el estándar de oro es la detección de RNA del VHC en los hepatocitos. Sin embargo, la infección oculta de este virus puede ser identificada hasta en un 87% de los casos, mediante la detección del RNA del VHC en células polimorfonucleares^{4,5}.

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

En EEUU de acuerdo a un estudio del CDC, el uso de drogas por vía parenteral o por el uso de cocaína intranasal asociada al uso de instrumentos compartidos y material contaminado para el consumo de la droga son vías de infección, y se considera la primera causa de infección en adultos (80%), también se observa un alto riesgo a la infección en pacientes que presentaron transfusiones antes de 1992, por trasplante de órganos a partir de un donador infectado, por exposición ocupacional, por hemodiálisis, por exposición intrafamiliar, por exposición al nacimiento de una madre infectada, por riesgo sexual y en algunos casos no se conoce la causa^{25,19}.

En México no se conocen muchos estudios acerca de los mecanismos de transmisión del VHC, siendo aparentemente los principales las intervenciones quirúrgicas y la transfusión sanguínea antes de 1993, múltiples parejas y sexo sin protección y de manera secundaria el uso de perforaciones y tatuajes, endoscopías, y tratamientos odontológicos, el uso de drogas por vía parenteral o nasal y la exposición ocupacional^{26,27}.

EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud estima alrededor de 170 millones de personas infectadas por el VHC en el mundo, considerándose una epidemia de alcance mundial, ya que es la infección más frecuentemente relacionada con productos sanguíneos. Asimismo es la primera indicación de trasplante hepático a nivel mundial^{25,28}.



< 1.0%



1.0%-1.9%



2.0%-2.9%



>2.9%



No incluido en región OMS



El VHC tiene una distribución universal, su prevalencia varía entre el 1- 25%; la prevalencia más alta de infección por el VHC en el mundo es en Egipto cuyas prevalencias van del 17 al 26%, en donde las altas tasas de infección se observan en todas las edades. En Europa la prevalencia varía de un 0.63 a 3.2% con niveles más altos en los países del este. En EEUU se estima una prevalencia de 1.6% mientras que en América del Sur la prevalencia es inferior a 1.9%. Lo que contribuye con alrededor de 12,000 muertes por año^{25,28}.

En México, la mayoría de los estudios sobre prevalencias por infección del VHC se han estudiado en población donadora de sangre como muestran los siguientes autores: Ladrón De Guevara del 0.84%²⁹, Carreto y cols en Irapuato³⁰ 1.14%, en Veracruz Valerio-Ureña y cols. Encontraron una prevalencia del 1.1%³¹ y Benitez Arvizu y cols. en el banco central de sangre del CMN La Raza del IMSS solo un 0.19%³².

En México el único estudio de prevalencia en población abierta es el de la Encuesta Nacional de Salud realizada por el Instituto Nacional de Salud Pública (2005)³³, en donde se obtuvo una muestra de 21,271 sueros en mayores de 20 años, encontrándose una prevalencia por serología del VHC del 1.4%, (IC_{95%}:1.1-1.6), determinándose en estas muestras positivas mediante NAAT el RNA viral, que presentó un 35.7% de positividad.

En la actualidad, el riesgo de contraer infección por el VHC a través de una transfusión sanguínea es del 0,001% aproximadamente en lugares como en USA o en países desarrollados, gracias a las pruebas diagnósticas de prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT).^{34,35,36}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se ha demostrado que el virus de la Hepatitis C presenta mecanismos de permanencia en el huésped, que evaden las pruebas diagnósticas rutinarias y complementarias de laboratorio, sin causar enfermedad clínica evidente. Este estado es conocido como infección oculta por el virus C de la hepatitis. La prevalencia de la infección oculta por el virus C de la hepatitis es desconocida. La infección por el VHC ha sido ampliamente estudiada, por lo que los factores de riesgo para esta enfermedad así como los grupos de población más vulnerables son ampliamente conocidos. Debido a esto los candidatos a donación de sangre deben ser evaluados y diagnosticados, ya que se encuentran en una situación de volverse medios infecciosos para los receptores de sangre. Por lo tanto debido a que no existen estudios sobre la prevalencia de la infección oculta por el VHC en nuestro país es importante que se conozca en este tipo de situación.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuáles son las características moleculares del virus C de la hepatitis oculta en la población que acude al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional La Raza?

JUSTIFICACIÓN

La importancia de atender con urgencia el tema de las hepatitis C, está en el gran número de habitantes que tienen esta enfermedad y se desconocen; actualmente la detección aún es casi nula en los servicios de salud del país, ya que ésta enfermedad es 90% asintomática y tarda hasta 15 años en dar síntomas.

Si bien en la actualidad el riesgo de transmisión de infecciones por la vía transfusional es menor que en los decenios anteriores, el concepto general de riesgo potencial aún persiste. A pesar de los avances en los procedimientos de selección para donadores, el riesgo de transmisión a través de transfusión de infecciones virales, bacterianas y por protozoarios, así como de las enfermedades de reciente aparición sigue existiendo.

Así mismo, la mayor parte de la carga económica de la hepatitis C se relaciona con el desarrollo de enfermedad hepática. Las consecuencias a largo plazo, como cirrosis y cáncer de hígado, serán costosas para los no tratados, ya que los costos de complicaciones hepáticas futuras son los siguientes: la magnitud de éste problema nos permite observar que el tratamiento de un paciente con cirrosis descompensada tiene un costo aproximado anual de \$147,400 pesos, con cáncer el costo llega a \$202,400 pesos y un trasplante de hígado cuesta aproximadamente \$1,381,600 pesos el primer año y \$202,000 pesos los años subsecuentes.

OBJETIVOS

General. Conocer las características moleculares de la infección oculta por el virus de la hepatitis C en la población candidata que acude al Banco Central de Sangre del CMN La Raza.

Particulares:

- a. Obtener 100 muestras sanguíneas de la población que acude al Banco Central de Sangre del CMN La Raza.
- b. Realizar cuestionario epidemiológico
- c. Obtener análisis de niveles de enzimas hepáticas
- d. Realizar la detección del VHC oculta por PCR anidada punto final (RT_PCR) a partir de plasma y leucocitos.
- e. Realizar el análisis estadístico de los resultados.

METODOLOGIA

CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO

Transversal descriptivo.

UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

Se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), durante el periodo de mayo del 2011 a agosto del 2011.

TIPO DE DISEÑO

Piloto

POBLACION DE ESTUDIO

Sujetos que candidatos a donación de sangre en el Banco Central de Sangre del CMN La Raza siendo o no derechohabientes del IMSS.

TAMAÑO MUESTRAL

Se obtuvieron el número de 100 muestras de la población que acudió a donar sangre en el Banco Central de Sangre del CMN La Raza y aceptaron previa firma del consentimiento informado. Se obtuvieron las muestras en el mes de junio del 2011.

CRITERIOS DE INCLUSION

- Sujetos que acudan al Banco Central de Sangre del CMN La Raza.
- Mayores de 18 años.
- Que firmen el consentimiento informado.
- Que acepten proporcionar una muestra sanguínea para la lectura del RNA viral.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Que no firmen la carta de consentimiento informado.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- Sujetos sin consentimiento informado.

IDENTIFICACION Y RECOLECCIÓN DE DATOS

Las técnicas moleculares para la detección de ácidos nucleicos del VHC mediante el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR cualitativo) se realizaron en la Unidad de Investigación, perteneciente al Hospital de Infectología Centro Médico “La Raza”. La recolección de las muestras se realizó en Banco de Sangre del Centro Médico “La Raza” del IMSS previa aplicación de un cuestionario epidemiológico y entrega y firma de carta de consentimiento informado. Se obtuvieron 100 muestras de sangre periférica de población atendida en el Banco de Sangre por punción venosa utilizando 1 tubo rojo para realizar prueba rápida de HCV LAFOON (Standard Diagnostics INC. Laboratorios Lafoon), ELISA de tercera generación (quimioluminiscencia, Architect) y niveles de enzimas hepáticas (AST y ALT) y 4 tubos libres de DNAsas y RNAsas con solución EDTA, colocándose inmediatamente a 4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4 ° C, recolectándose el plasma y suero en alícuotas de 1200 µL en criotubos que se almacenaron a -80° C en un ultracongelador REVCO. La obtención del paquete leucocitario se realizó mediante 3 lavados (3500 rpm /15 min, 2X 3500 rpm / 10 minutos) con MgCl₂ al 5mM en tubos Falcon de 50 ml. El botón celular formado se resuspendió con 900 µL de PBS (solución buffer NaCl- KCl, Na₂ HPO₄, KH₂ PO₄) en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron por 1 minuto decantando el sobrenadante, el paso anterior se repitió una vez más, por último el botón se resuspendió en 500 µl de Trizol y se almacenó a – 80 ° C.

Prueba rápida de HCV LAFOON (Standard Diagnostics INC. Laboratorios Lafoon)

Se tomaron 10 µL del suero del sujeto en estudio y se colocaron en una placa, se agregaron 4 gotas de reactivo anti HCV, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. la presencia de una banda se interpretó como negativa, y la observación de dos bandas como positiva.

ELISA de tercera generación (quimioluminiscencia, Architect)

Las pruebas se realizaron en los laboratorios QUEST.

Aislamiento de RNA viral a partir de plasma y botón celular.

Para el aislamiento de RNA se utilizó el kit “QIAmp Viral RNA Mini” de la marca QIAGEN, utilizando columnas de acuerdo al protocolo referido. Para el aislamiento de RNA viral a partir de células polimorfonucleares en trizol se utilizó el kit “Rneasy” de la marca QIAGEN. El RNA obtenido de ambos aislamientos se almacenó a – 80 ° C hasta su uso posterior.

Síntesis de cDNA

A partir del RNA viral extraído se realizó la reacción de reversa de la transcripción, utilizando 16 uL de RNA , desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Invitrogene), amortiguador de la reversa transcriptasa, random primers (Promega), inhibidor de RNasas (Invitrogene) y enzima inversa transcriptasa (Promega). Posteriormente se procedió a la síntesis del cDNA bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 70 °C por 5 min, seguido de 37 °C durante 60 min.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR-Anidada Punto Final)

Para la realización de la PCR cualitativa, se procedió a la amplificación de un fragmento de la región 5'UTR del genoma del VHC, la cual se realizó montando una primera PCR (1er Round) y posteriormente una prueba de PCR anidada (2º Round), basándose en la temperatura media de desnaturalización (Tm) de los iniciadores, la concentración de MgCl₂ requerida y la respuesta de la polimerasa. Se utilizó en el 1er round los iniciadores KY80-5'-GCAGAAGCGTCTAGCCATGG-3' y KY78'-5'-CTCGCAAGCACCTATCAGGC-3', y para el 2º round los iniciadores FIP 5'-TCTAGCCATGGCGTTAGTA-3' y RIP 5'-CAGTACCACAAGGCCTTTC-3'. Las mezclas de la amplificación se realizaron colocando buffer de PCR sin Magnesio 10X (Promega), MgCl₂ (Promega), dNTPs (invitrogene), primers y taq polimerasa (Promega). El protocolo de amplificación fue de un ciclo de 94°C por 5min, 40 ciclos de 94°C 15 seg, 55°C 30 seg, 72°C 30 seg y por último un ciclo de extensión de 72°C por 5 min; estas condiciones son iguales para el 1er y 2º round.

Electroforesis

Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio como revelador, se sometieron a un acorrimiento electroforético de 70 volts durante 60 min, posteriormente se revelaron con luz ultravioleta La presencia de una banda con un PM de 216pb indicó que la muestra era positiva.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Como punto de inicio se realizó la validación final e integración de la información obtenida mediante el cuestionario epidemiológico. Posteriormente se procedió a la limpieza de la base de datos y al análisis exploratorio de la misma realizando los siguientes análisis:

Univariado: Se estimaron frecuencias simples, medidas de tendencia central y de dispersión. Así como, prevalencias con intervalos de confianza al 95% para prevalencia

RESULTADOS

Las características demográficas, conductuales y socioeconómicas son presentadas en la Tabla 1. Incluimos 100 sujetos de estudio de los cuales 52 son hombres y 48 mujeres, con un rango de edad de los 19 años a los 61, siendo la moda 28 y el promedio 36.99 años (desviación estándar σ 10.37). El 47% está casado, el 47% presentó un nivel técnico o de bachillerato seguidos por profesionistas y personas que terminaron la secundaria presentando en ambos casos 21%. Se encontraron diferentes factores de riesgo en la población de estudio, entre ellos el 5% presenta antecedentes de acupuntura, 6% presenta perforaciones, 8% tatuajes, 9% consume marihuana, 4% cocaína inhalada, 3% se transfundieron, 39% se sometieron a cirugías y 73% acudieron al dentista. El 13% presentó más de 6 parejas sexuales en la vida, 8% de estas fueron extramaritales, 21% de las mujeres eran homosexuales, encontramos además que las parejas sexuales presentaron factores de riesgo como que el 2% de ellas se les han aplicado transfusiones, 7% presentaron perforaciones, 8% tatuajes, 5% presentaron hepatitis, 2% cirrosis y de éstos 14% de ellos ignoraron si presentaban cirrosis y el 15% ignoró si presentaban hepatitis. Encontramos de acuerdo al nivel socioeconómico que el 48% presentó un nivel medio bajo, el 31% un nivel medio y 12% un nivel medio alto.

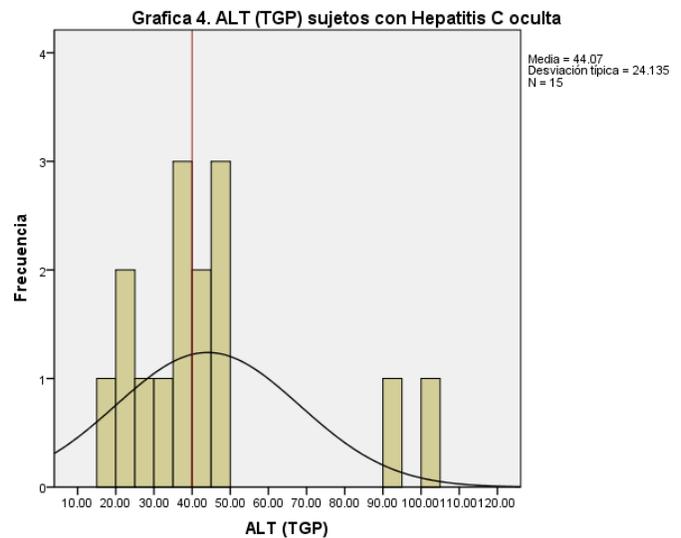
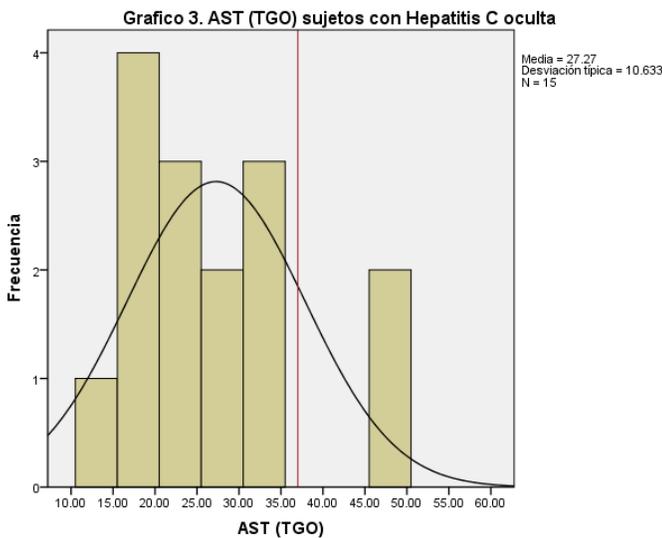
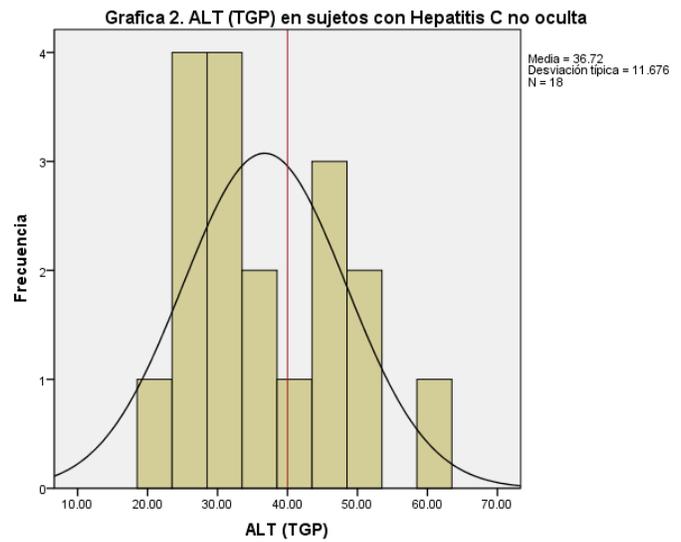
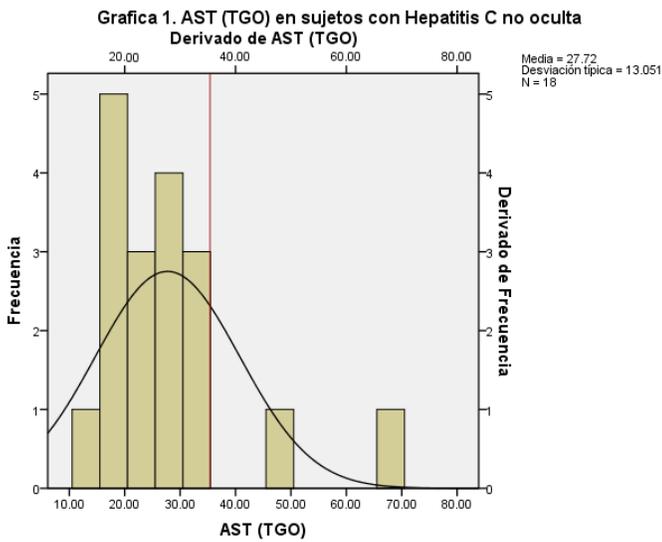
TABLA 1. Características demográficas y conductuales de la población.

Características (n = 100)	Numero	(%)
Demográficas		
Genero		
Femenino	48	48%
Masculino	52	52%
Edades		
19-24	13	13%
25-29	17	17%
30-34	16	16%
35-39	15	15%
40-44	12	12%
45-49	11	11%
50-54	12	12%
55-61	4	4%
Edo. Civil		
SOLTERO	29	29%
CASADO	47	47%
UNION LIBRE	17	17%
DIVORCIADO	5	5%
VIUDO	2	2%
Escolaridad		
PRIMARIA	10	10%
SECUNDARIA	21	21%
TECNICA O PREPARATORIA	47	47%
PROFESIONAL	21	21%
POSGRADO	1	1%
Ocupacion u Oficio		
HOGAR	17	17%
EMPLEADO	35	35%
OBRERO	4	4%
COMERCIANTE	14	14%
PROFESIONISTA	11	11%
JUBILADO	1	1%
DESEMPLEADO	7	7%
OTROS	4	4%
TRABAJADOR DE LA SALUD	7	7%
Conductual		
Acupuntura		
Si	5	5%
No	95	95%
Perforaciones		
Si	6	6%
No	94	94%
Tatuajes		
Si	8	8%
No	92	92%
Consumo de marihuana		
Si	9	9%
No	91	91%
Consumo de cocaína inhalada		
Si	4	4%
No	96	96%
No. de parejas sexuales en la vida		
0-1	45	45%
2-5	41	41%
6-10	11	11%
11-20	3	3%
Tipo de Relaciones		
Pareja	92	92%
Extramartital	8	8%
Preferencia sexual		
Masculinos heterosexuales	58	58%
Femeninos heterosexuales	33	33%
Femeninos homosexuales	9	9%
Parejas con factores de riesgo		
Transfusiones	2	2%
Perforaciones	7	7%
Tatuajes	8	8%
Cirrosis		
Si	2	2%
No sabe	14	14%
Hepatitis C		
Si	5	5%
No sabe	15	15%
Migraciones		
EEUU	4	4%
Francia	1	1%
Indice Socioeconomico AMAI		
E	0	0%
D+	8	8%
D	48	48%
C+	31	31%
C	12	12%
A/B	1	1%
Antecedentes Medicos		
Transfusiones	3	3%
Donaciones	60	60%
Cirugias	39	39%
Dentista	73	73%
Endoscopias	9	9%
Enf. Transmision sexual		
Sifilis	1	1%
Gonorrea	1	1%

Tabla 2. Resultados obtenidos de pruebas realizadas.						
No. DE FOLIO	AST (TGO) mg/dl	ALT (TGP) mg/dl	PRUEBA RÁPIDA	ELISA	HC	HCO
1	13	26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	21	39	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	44	71	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	48	94	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
5	18	25	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
6	17	32	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	22	31	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
8	31	55	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	17	21	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	13	21	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	20	31	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
12	28	52	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
13	29	35	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
14	17	24	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
15	47	61	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
16	27	35	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
17	19	44	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
18	21	34	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	25	30	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20	44	79	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
21	32	58	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	14	30	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	23	62	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	20	34	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	20	39	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
26	16	15	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
27	19	27	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	39	42	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
29	40	79	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
30	22	31	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
31	23	24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
32	22	32	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
33	31	53	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	25	37	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
35	24	53	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	29	36	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
37	27	45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
38	47	139	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
39	36	83	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
40	18	29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
41	27	46	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
42	32	48	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
43	18	29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
44	24	53	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
45	33	49	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

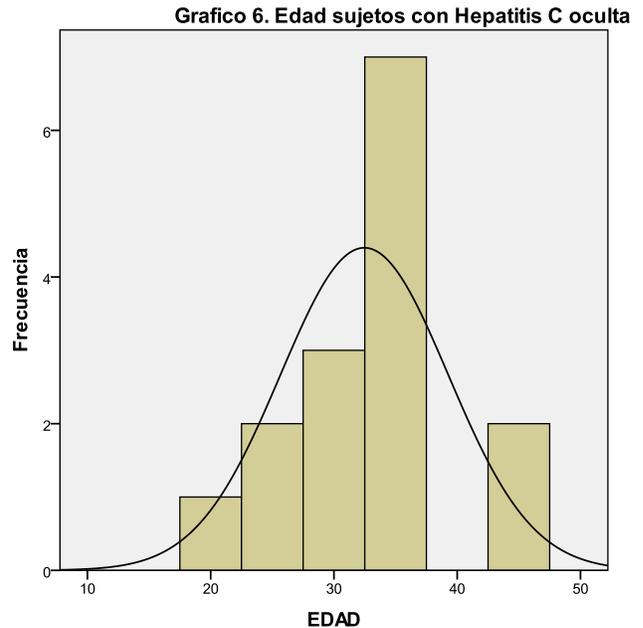
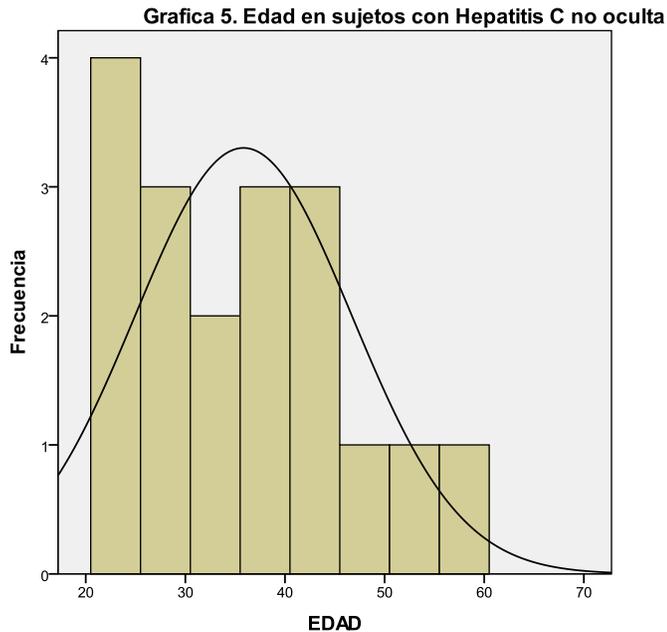
Tabla 2. Resultados obtenidos de pruebas realizadas. (continuación)						
No. DE FOLIO	AST (TGO) mg/dl	ALT (TGP) mg/dl	PRUEBA RÁPIDA	ELISA	HC	HCO
46	18	39	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
47	32	45	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
48	49	104	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
49	28	38	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
50	33	49	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
51	25	45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
52	33	43	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
53	32	46	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
54	32	41	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
55	23	35	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
56	69	47	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
57	13	24	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
58	33	33	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
59	32	38	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
60	18	36	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
61	21	21	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
62	21	25	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
63	18	24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
64	13	19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
65	24	33	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
66	51	86	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
67	18	24	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
68	27	26	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
69	28	35	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
70	25	28	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
71	10	16	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
72	13	22	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
73	16	23	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
74	17	21	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
75	19	31	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
76	39	32	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
77	23	28	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
78	18	26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
79	28	43	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
80	20	25	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
81	32	26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
82	28	45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
83	23	37	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
84	22	30	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
85	32	47	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
86	23	37	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
87	55	78	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
88	23	29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
89	30	46	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
90	28	49	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
91	12	22	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
92	23	32	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
93	130	160	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
94	22	30	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
95	101	148	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
96	14	20	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
97	28	29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
98	36	60	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
99	20	36	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
100	78	96	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

La tabla 2 muestra todos resultados obtenidos para los 100 sujetos en estudio .No se encontró una relación entre la elevación de las enzimas hepáticas AST (gráfica 1 y 2) ni la ALT (gráfica 3 y 4) y la presencia de la enfermedad tanto de Hepatitis C oculta como de Hepatitis C no oculta, se observa que en la gráfica 1 se encuentra 1 sujeto fuera del límite máximo de referencia para AST (37mg/dl) y en la gráfica 2 se encuentran 6 sujetos por encima del límite máximo de referencia para ALT (40mg/dl), en cambio en la gráfica 3 y 4 encontramos 2 y 7 sujetos se encuentran por encima de los límites máximos respectivamente.



Se observa que la edad de afectación de la infección oculta por el VHC, tiene una prevalencia mayor en personas que son menores 35 años, en cambio la Hepatitis C no oculta tiene un rango mayor de edad tendiendo a continuar en personas mayores de 35 años (Gráficas 5 y 6).

Encontramos que ningún paciente positivo tanto para infección oculta por el VHC y Hepatitis C no oculta dieron positivos en una de las otras pruebas que realizamos (prueba rápida en suero, ELISA tercera generación).



En la tabla 3 apreciamos que los factores de riesgo como tatuajes, consumo de marihuana, cocaína inhalada, preferencia sexual, migraciones, las parejas sexuales con transfusiones, y los antecedentes médicos (transfusiones, cirugías, endoscopias, visitas al dentista) no son estadísticamente significativos ($P > 0.05$) sin embargo, el antecedente de transfusiones tiene un OR de 2.35 (IC 95% 0.2-27.45 lo cual lo invalida estadísticamente debido a que el intervalo cruza la unidad) probablemente al aumentar el tamaño de muestra se podrá ver que se vuelve estadísticamente significativo, los factores como género, acupuntura, perforaciones, parejas sexuales con transfusiones y perforaciones presentan significancia estadística ($P < 0.05$) sin embargo el OR no es significativo a excepción de las parejas sexuales con transfusiones que tiene un OR de 4.75 sin embargo el IC 95% cruza por la unidad. A diferencia de lo anterior, en la tabla 4 podemos notar que los factores como género, tatuajes, consumo de marihuana, cocaína inhalada, tipo de relaciones, preferencia sexual, migraciones, antecedentes de transfusión, visitas al dentista y endoscopias

presentan una $P > 0.05$ entre estas variables podemos destacar el género y tipo de relaciones que presentan un OR de 3.31 (IC 95% 1.03-10.56) y 2.02 (IC 95% 0.36-11.13) respectivamente, entre las variables con $P < 0.05$ encontramos antecedente de perforaciones, parejas sexuales con perforaciones tatuajes y cirugías, en las cuales encontramos un OR de 5.06 (IC 95% 1.001-25.45) en parejas sexuales con perforaciones.

TABLA 3. Características demográficas y conductuales de la población con HC

Características (n = 100)	Numero	(%)	P (% HCO)	OR	IC 95%
Demográficas					
Genero					
Femenino	8	8%	<u>0.05</u> 44%	1.12	0.4-3.15
Masculino	10	10%	<u>0.82</u> 56%	1.12	0.4-3.15
Edades					
19-24	3	3%	17%		
25-29	4	4%	22%		
30-34	2	2%	11%		
35-39	3	3%	17%		
40-44	2	2%	11%		
45-49	2	2%	11%		
50-54	1	1%	6%		
55-61	1	1%	6%		
Edo. Civil					
SOLTERO	5	5%	<u>28%</u>		
CASADO	9	9%	50%		
UNION LIBRE	2	2%	11%		
DIVORCIADO	1	1%	6%		
VIUDO	1	1%	6%		
Escolaridad					
PRIMARIA	0	0%	<u>0%</u>		
SECUNDARIA	4	4%	22%		
TECNICA O PREPARATORIA	9	9%	50%		
PROFESIONAL	5	5%	28%		
POSGRADO	0	0%	0%		
Ocupacion u Oficio					
HOGAR	2	2%	<u>11%</u>		
EMPLEADO	6	6%	33%		
OBRERO	0	0%	0%		
COMERCIANTE	4	4%	22%		
PROFESIONISTA	4	4%	22%		
JUBILADO	0	0%	0%		
DESEMPLEADO	0	0%	0%		
OTROS	1	1%	6%		
TRABAJADOR DE LA SALUD	1	1%	6%		
Conductual					
Acupuntura					
Si	1	1%	<u>6%</u>	1.14	0.12-10.91
Perforaciones					
Si	0	0%	<u>0%</u>	1.14	0.12-10.53
Tatuajes					
Si	1	1%	<u>6%</u>	0.63	0.07-5.46
Consumo de marihuana					
Si	1	1%	<u>6%</u>	0.54	0.06-4.64
Consumo de cocaína inhalada					
Si	0	0%	<u>0%</u>	1.95	0.18-20.12
No. de parejas sexuales en la vida					
0-1	9	9%	50%		
2-5	5	5%	28%		
6-10	3	3%	17%		
11-20	1	1%	6%		
Tipo de Relaciones					
Extramarital	2	2%	<u>11%</u>	2.02	0.36-11.13
Preferencia sexual					
Heterosexual	16	16%	89%	0.74	0.14-3.93
Femeninos homosexuales	2	2%	11%	0.74	0.14-3.93
Parejas con factores de riesgo					
Transfusiones					
	1	1%	<u>6%</u>	4.75	0.28-79.99
Perforaciones					
	1	1%	<u>6%</u>	0.74	0.8-6.6
Tatuajes					
	0	0%	<u>0%</u>	0.79	0.91-6.97
Cirrosis					
Si	0	0%	0%		
No sabe	5	5%	28%		
Hepatitis C					
Si	0	0%	0%		
No sabe	7	7%	39%		
Migraciones					
EEUU	1	1%	<u>6%</u>	1.44	0.12-10.91
Indice Socioeconomico AMAI					
E	0	0%	0%		
D+	0	0%	0%		
D	11	11%	61%		
C+	5	5%	28%		
C	2	2%	11%		
A/B	0	0%	0%		
Antecedentes Medicos					
Transfusiones					
	1	1%	<u>6%</u>	2.35	0.2-27.45
Donaciones					
	10	10%	<u>56%</u>	0.29	
Cirugias					
	6	6%	<u>33%</u>	0.74	0.25-2.17
Dentista					
	14	14%	<u>78%</u>	1.36	0.4-4.58
Endoscopias					
	2	2%	<u>11%</u>	1.33	0.25-7.05

TABLA 4. Características demográficas y conductuales de la población con HCO

Características (n = 100)	Numero	(%)	P (% HCO)	OR	IC 95%
Demográficas					
Genero			4.4		
Femenino	10	10%	67%	3.31	1.03-10.56
Masculino	5	5%	33%	0.30	0.94 -0.96
Edades					
19-24	3	3%	20%		
25-29	1	1%	7%		
30-34	6	6%	40%		
35-39	3	3%	20%		
40-44	2	2%	13%		
Edo. Civil					
SOLTERO	3	3%	20%		
CASADO	7	7%	47%		
UNION LIBRE	4	4%	27%		
DIVORCIADO	1	1%	7%		
Escolaridad					
PRIMARIA	2	2%	13%		
SECUNDARIA	3	3%	20%		
TECNICA O PREPARATORIA	9	9%	60%		
PROFESIONAL	1	1%	7%		
POSGRADO	0	0%	0%		
Ocupacion u Oficio					
HOGAR	5	5%	33%		
EMPLEADO	3	3%	20%		
OBRERO	0	0%	0%		
COMERCIANTE	3	3%	20%		
PROFESIONISTA	3	3%	20%		
JUBILADO	0	0%	0%		
DESEMPLEADO	0	0%	0%		
OTROS	0	0%	0%		
TRABAJADOR DE LA SALUD	1	1%	7%		
Conductual					
Acupuntura					
Si		0%	0%		
Perforaciones			0.01		
Si	1	1%	7%	1.14	0.12-10.53
Tatuajes			0.43		
Si	1	1%	7%	0.79	0.09-6.97
Consumo de marihuana			0.40		
Si	2	2%	13%	1.71	0.32-9.17
Consumo de cocaína inhalada			0.32		
Si	1	1%	7%	1.95	0.18-20.12
No. de parejas sexuales en la vida					
0-1	7	7%	47%		
2-5	6	6%	40%		
6-10	1	1%	7%		
11-20	1	1%	7%		
Tipo de Relaciones			0.68		
Extramarital	2	2%	13%	2.02	0.36-11.13
Preferencia sexual			1.74		
Heterosexual	15	15%	100%	0.83	0.76-0.91
Parejas con factores de riesgo					
Transfusiones	0	0%	0%		
			5%		
Perforaciones	3	3%	20%	5.06	1.00-25.45
			4%		
Tatuajes	1	1%	7%	0.79	0.91-6.97
Cirrosis					
Si	1	1%	7%		
No sabe	3	3%	20%		
Hepatitis C					
Si	2	2%	13%		
No sabe	3	3%	20%		
Migraciones			0.1		
Francia	1	1%	7%	1.44	0.15-13.91
Indice Socioeconomico AMAI					
E	0	0%	0%		
D+	3	3%	20%		
D	7	7%	47%		
C+	4	4%	27%		
C	0	0%	0%		
A/B	1	1%	7%		
Antecedentes Medicos					
Transfusiones	0	0%	0%	0.01	1.08-1.28%
Donaciones	9	9%	60%		
			0.007		
Cirugias	6	6%	40%	1.05	0.34-3.22
			3.46		
Dentista	8	8%	53%	0.35	0.11-1.09
			0.11		
Endoscopias	1	1%	0%	0.68	0.08-5.93

Diagnóstico molecular de la infección oculta por el virus de la hepatitis C. Se procedió a realizar la purificación de las células polimorfonucleares por la técnica descrita anteriormente, la purificación del RNA viral de los paquetes celulares así como del plasma, la síntesis del cDNA, la amplificación y por último la electroforesis de 100 de los sujetos en estudio. Los resultados obtenidos fueron 15% de infección oculta por el VHC y 18% por el VHC.

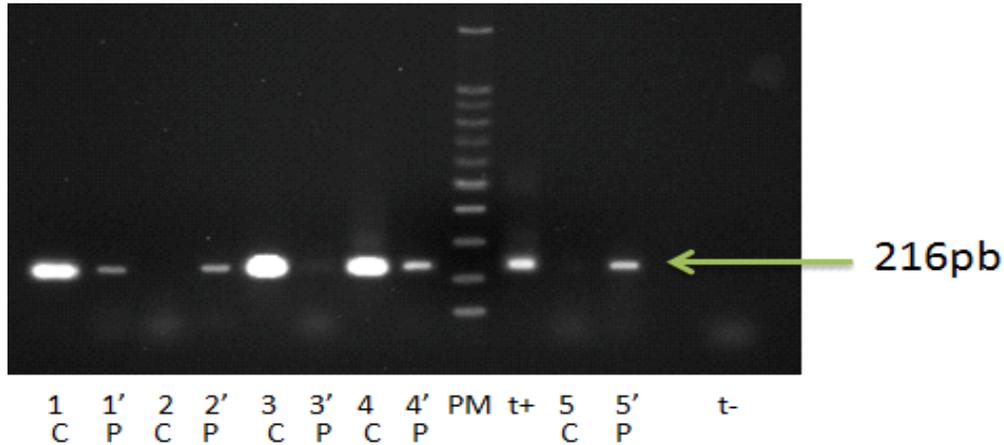


Figura 1. Electroforesis del producto de amplificación de la región 5'UTR del VHC en sujetos positivos a hepatitis C.

C. DNA obtenido del RNA extraído de polimorfonucleares

P. DNA obtenido del RNA extraído de plasma

PM. 100 Kb

t+. Testigo positivo

t-. Testigo negativo

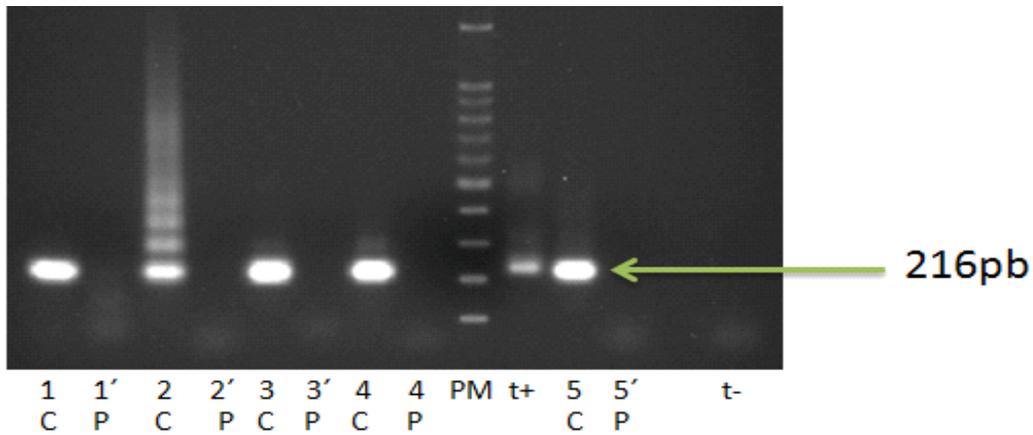


Figura 2. Electroforesis del producto de amplificación de la región 5' UTR del VHC en sujetos positivos a la infección oculta por el virus de la hepatitis C.

C. DNA obtenido del RNA extraído de polimorfonucleares

P. DNA obtenido del RNA extraído de plasma

PM. 100 Kb

t+. Testigo positivo

t-. Testigo negativo

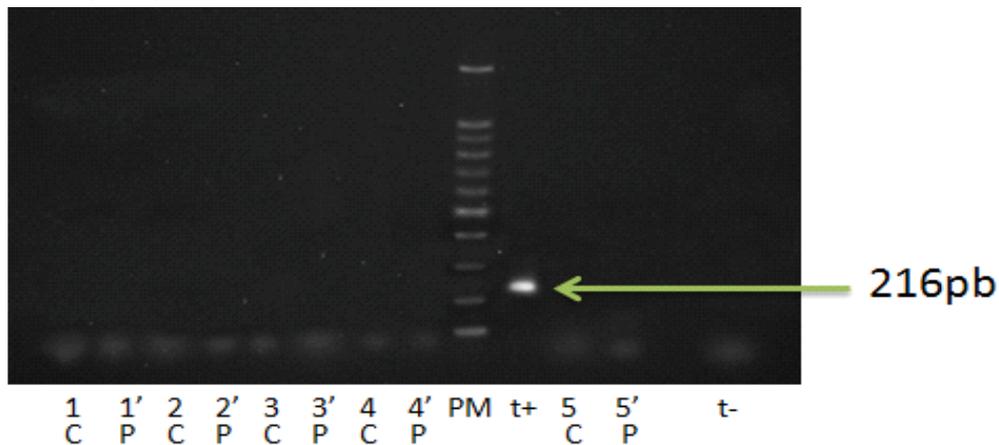


Figura 3. Electroforesis del producto de amplificación de la región 5' UTR del VHC en sujetos negativos a hepatitis C.

C. DNA obtenido del RNA extraído de polimorfonucleares

P. DNA obtenido del RNA extraído de plasma

PM. 100 Kb

t+. Testigo positivo

t-. Testigo negativo

Como se observó en la figura 1, las muestras de los sujetos en estudio presentaron una banda de 216pb correspondientes al producto de la región 5' UTR del VHC; en algunos sujetos (1, 3 y 4) se observó la banda tanto en la células como en plasma, mientras que en 2 y en 5 solo se presentó en plasma. Cuando solo se obtiene un amplificado del RNA extraído de las células polimorfonucleares se considera al sujeto como infectado por el virus de la Hepatitis C oculta (figura 2). Si no se presenta ninguna banda de 216pb es un sujeto negativo (figura 3).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró una alta prevalencia de infección oculta por el virus de la hepatitis C (15%) en los sujetos pre donadores del Banco Central de Sangre del CMN La Raza, IMSS. Siendo muy importante este estudio ya que es el primero que se realiza en México en este tipo de población. Es importante observar este alto porcentaje en estos sujetos considerándose que probablemente se debe a que el 80% de los casos pasan asintomáticos, debido a que no se realizan pruebas bioquímicas de rutina en estos sujetos como PFHs, etc. y no se considera realizar una prueba con tan alta sensibilidad, especificidad y costo, como las de biología molecular. Debido a que en México carecemos de estudios para conocer la prevalencia de la infección oculta por el virus de la hepatitis C, esta situación es muy importante ya que aunque existen estudios a nivel mundial que ciertos factores de riesgo como pacientes politransfundidos o en hemodiálisis presentan altos porcentajes de esta patología aún no se han realizado estudios en población normal o donadores. Otro punto importante es que se desconoce si la población mexicana se encuentra menos o más expuesta a estos riesgos que la población de otros países.

De los datos obtenidos en este estudio observamos una tendencia a presentar una mayor prevalencia a la infección oculta por el VHC en las personas menores a 35 años las cuales, esto puede deberse a las conductas de riesgo que en años recientes se han puesto de moda como perforaciones, tatuajes, y mayor cantidad de parejas sexuales, por lo que podemos suponer que la Hepatitis C oculta debe de estar asociada a alguna de estas tendencias, Sin embargo, se requiere de un estudio con un mayor número de sujetos de estudio para ver una significancia estadística de los factores aquí estudiados.

Aunque las enzimas hepáticas no son consideradas como un indicador de enfermedad por el virus de la hepatitis C, se corroboraron en todos los sujetos, observándose valores normales para AST en más del 86% de los sujetos infectados con HCV oculta o no y en el 64% para ALT. El incremento de estos valores concuerda con la ingesta de alcohol como factor de riesgo en estos sujetos. Es importante notar que en estos sujetos los valores superiores se incrementaron entre un 1.5 a un 2.5 veces el valor máximo de referencia, en comparación con los valores basales encontrados en la población aparentemente sana.

Los sujetos positivos para la infección oculta por el VHC fueron verificados en la base de datos del banco de sangre central del CMN La Raza, mediante la prueba de NAAT (CHIRION). Es igualmente importante mencionar que si bien esperábamos que no se detectara a ningún sujeto infectado con la

infección oculta por el VHC, en 5 sujetos positivos, los motivos de rechazo fueron: más de una pareja sexual en los últimos 12 meses, hematocrito y/o hemoglobina elevadas, hematocrito y/o hemoglobina bajas y antecedente de cáncer, en cambio para los sujetos con el VHC no oculta fueron: hematocrito y/o hemoglobina bajas y caries de cuarto grado. Es importante realizar el estándar de oro a los sujetos positivos para realizar la comparación de especificidad y sensibilidad de la metodología utilizada mediante la prueba de NAAT (Roche, COBAS AMPLICOR). Sería importante si existe el caso, revisar las bolsas de sangre de pacientes positivos para el infección oculta por el VHC para realizar un círculo epidemiológico y ver el estado actual de infección del paciente y seguirlo para poder conocer si se vuelve positivo en algún momento entre el periodo de incubación conocido el VHC o posteriormente. Así como detectar adecuadamente a los sujetos infectados por el virus de hepatitis C principalmente en los casos de infección oculta ya que aumentan importantemente el riesgo de hepatitis post-tranfusión.

Los resultados obtenidos nos permitieron evaluar ciertos factores de riesgo importantes, sin embargo la falta de significancia estadística observada en este estudio se debe al tamaño de muestra (100 sujetos) por lo que se deberá realizar un estudio con un mayor número de población; Aun así la alta prevalencia (15%) de infección oculta por el VHC encontrada, supone un campo para realizar mayores estudios.

BIBLIOGRAFIA

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-362.
2. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 2009 Nov;51(5):939-48. Epub 2009 Sep 10.
3. Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, de Lucas S, Salas C, Jiménez-Heffernan JA, Pérez-Mota A, Graus J, López-Alcorocho JM, Carreño V. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis.* 2004 Jan 1;189 (1):7-14.
4. Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, de Lucas S, Ortiz-Movilla N, J M López-Alcorocho JM, Pardo M, Carreño V. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut* 2005;54:682–685.
5. Bartolomé J, López-Alcorocho JM, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Quiroga JA, Palacios R, Carreño V. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *Journal of Virology* 2007;81(14):7710–7715.
6. De Marco L, Gillio-Tos A, Fiano V, Ronco G, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Merletti F, Richiardi L, Sacerdote C. Occult VHC Infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS One.* 2009;4(12):1-5.
7. Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Barril G, Carreño V. Diagnosis of occult hepatitis C without the need for a liver biopsy. *J Med Virol.* 2010 Sep;82(9):1554-9
8. Halfon P, Bourlière M, Ouzan D, Sène D, Saadoun D, Khiri H, Péñaranda G, Martineau A, Oulès V, Cacoub PP. Occult Hepatitis C Virus Infection Revisited with Ultrasensitive Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol* 2008;46(6):2107-2109.
9. Fowell AJ, Sheron N, Rosenberg WM. Renal hepatitis C in the absence of detectable serum or hepatic virus. *Liver Int* 2008; 28: 889–91.
10. Thongsawat S, ManeekRNA N, Kuniholm MH, Pantip C, Thungsuputi A, Lumlertkul D, Bannachak D, Nelson KE. Occult hepatitis C virus infection during an outbreak in a hemodialysis unit in Thailand. *J Med Virol.* 2008 May;80(5):808-15.
11. Pankaj J. Occult hepatitis C virus infection is more common than hepatitis B infection in maintenance hemodialysis patients. *World J Gastroenterol* 2008;14(14): 2288-2289.
12. Barril G, Castillo I, Arenas MD. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;19: 2288-2292.

13. Poenisch M, Bartenschlager R. New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. *Semin Liver Dis.* 2010 Nov;30(4):333-47.
14. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, Bartenschlager R. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.* 2010 Dec 16;6(12):e1001233.
15. Sharma, S. D. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J. Med. Res.* 2010. 131:17-34.
16. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy D, Okamoto H, Pawlotsky J, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver L, Thiel H, Viazov S, Weiner A, Widell A (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes". *Hepatology* 42 (4): 962–73.
17. Argentini C, Genovese D, Dettori S, Rapicetta M. VHC genetic variability: from quasispecies evolution to genotype classification. *Future Microbiol Review.* 2009 Apr;4(3):359-73.
18. Seeff LB. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int.* 2009 Jan;29 Suppl 1:89-99. Review.
19. Chen S, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus Infection. *Int. J. Med. Sci.* 2006;3(2):47-52.
20. Pawlotsky J. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology* 2004;12 (2):96-102.
21. Goncales Lopes NS and Goncales Lopes F. Laboratory testing for hepatitis C. *Braz J Infect Dis* . 2007, vol.11, suppl.1, pp. 22-24.
22. Williams IT, Bell BP, Kuhnert W, Alter MJ. Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006. Arch Intern Med. 2011 Feb 14;171(3):242-8.
23. Carreño V. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. World J Gastroenterol. 2006 Nov 21;12(43):6922-5.
24. Pham T. Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14(18): 2789-2793.

25. Santos-López G, Sosa-Jurado F, Vallejo-Ruiz V, Meléndez-Mena D, Reyes-Leyva J. J Infect. Prevalence of hepatitis C virus in the Mexican population: a systematic review..2008 Apr;56(4):281-90.
26. Chiquete E, Sánchez LV, Panduro A. Routes of infection and clinical outcome of Mexican women reactive to anti-hepatitis C virus antibodies. Hepatol. Res. 2006 Oct;36(2):100-106.
27. World Health Organization. Global distribution of hepatitis A, B and C. 2009. Weekly Epidemiological Report EB126/15,1-6.
28. Ladrón-de Guevara L, Gómez N, Vázquez-Cantarell M, García-Méndez S, Di Silvio M. Prevalence of and risk factors for hepatitis C in blood donors. Rev Gastroenterol Mex 2002;67(1):12-17.
29. Carreto-Velez MA, Carrada-Bravo T y Martínez-Magdaleno A. Seroprevalencia de VHB, VHC y VIH en donadores de sangre en Irapuato, México. Salud Pública de México 2003;45(5):690-93.
30. Valerio-Ureña J, Vásquez-Fernández F, Pérez-Sosa JA, Cortazar-Benitez LF, Chávez-Tapia NC, Ruvalcaba-Rojas OA, Torres-Medina V, Ocejo-Rodríguez AU. Prevalencia de marcadores serológicos de VHB y VHC en donadores de sangre de la ciudad de Veracruz. Gac Méd Méx 2009;145(3):183-187.
31. Benítez-Arvizu G, Cortez-Gómez R, Novelo-Garza BA, Malagón-Martínez A, Guerra-Márquez A, Alvarado-Maldonado M del C, Rodríguez-Bartolo M, Argüelles-Pimentel RM, Sánchez-Barrera RG. Prevalence of hepatitis C virus in the blood bank at Centro Médico Nacional, La Raza. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2006 May-Jun;44(3):227-33.
32. Valdespino J. Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente? Salud Pública de México 2007;49(3):395-403.
33. Luban NL, Colvin CA, Mohan P, Alter HJ. The epidemiology of transfusion-associated hepatitis C in a children's hospital. Transfusion. 2007 Apr;47(4):615-20.
34. Zou S, Dorsey KA, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, Dodd RY, Stramer SL. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. Transfusion 2010. 50(7):1495-1504.
35. Manual para el Control de las Enfermedades Transmisibles. Organización Panamericana de la salud. 18ava Edición 2010.