

Jorge Arribas García

Valoración del antígeno del core
como alternativa en el cribado
rutinario y de urgencia del virus de
la hepatitis C

Departamento
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud
Pública

Director/es
Benito Ruesca, Rafael

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial –
SinObraDerivada (by-nc-nd): No se
permite un uso comercial de la obra
original ni la generación de obras
derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

**VALORACIÓN DEL ANTÍGENO DEL
CORE COMO ALTERNATIVA EN EL
CRIBADO RUTINARIO Y DE
URGENCIA DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS C**

Autor

Jorge Arribas García

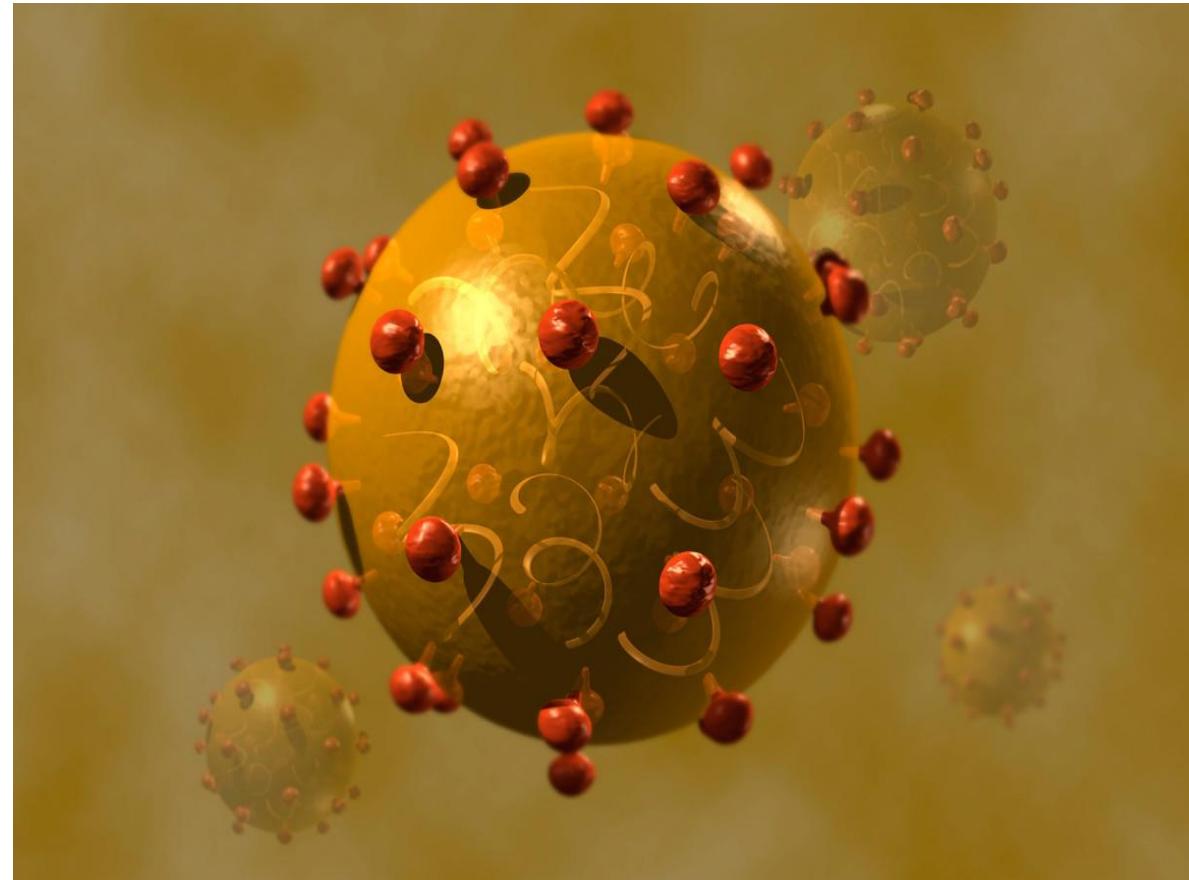
Director/es

Benito Ruesca, Rafael

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

2015



VALORACIÓN DEL ANTÍGENO DEL CORE COMO ALTERNATIVA EN EL CRIBADO RUTINARIO Y DE URGENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C



Universidad
Zaragoza

MEMORIA

presentada para optar al título de Doctor por la
Universidad de Zaragoza por

Jorge Arribas García

bajo la supervisión del

Prof. Rafael Benito Ruesca

Departamento de Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública.

Zaragoza, Seotiembre 2015



Universidad de Zaragoza

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

**TESIS
DOCTORAL**

**VALORACIÓN DEL ANTÍGENO DEL
CORE COMO ALTERNATIVA EN EL
CRIBADO RUTINARIO Y DE URGENCIA
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

Memoria presentada por Jorge Arribas García para optar al
Grado de Doctor

Dirigida por el profesor D. Rafael Benito Ruesca

Zaragoza, Septiembre de 2015.



D. RAFAEL BENITO RUESCA, Prof. Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza y Director de la Tesis Doctoral de D. Jorge Arribas García, titulada “VALORACIÓN DEL ANTÍGENO DEL CORE COMO ALTERNATIVA EN EL CRIBADO RUTINARIO Y DE URGENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C”.

INFORMA QUE:

El doctorando ha realizado un trabajo de Tesis Doctoral para la obtención del Grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Zaragoza.

Dicho trabajo ha sido supervisado por mí y considero que reúne las condiciones necesarias para su lectura, ya que trata de un tema de gran actualidad, sobre el que se ha documentado ampliamente, ha utilizado una metodología adecuada y ha obtenido conclusiones de interés práctico.

Zaragoza, 25 de agosto de 2015

Fdo: Prof. Rafael Benito Ruesca

Agradecimientos

Parece mentira que ya hayan pasado cuatro años desde aquel día en el que pisé Zaragoza por primera vez. Ciudad desconocida con gente desconocida en un medio laboral desconocido. Entonces no podía ni soñar todo lo bueno que me ha pasado a lo largo de todo este tiempo. A continuación quiero agradecer a los protagonistas de esta increíble película, la película que culmina con la presentación de este trabajo, mi película.

En primer lugar, a mi director, mi jefe de servicio y mi amigo, el Dr. Rafael Benito. Gracias en primer lugar por confiar en mí para la realización de este trabajo. Durante este camino que ha durado cuatro años, me has enseñado, me has estimulado a querer aprender más, has sido el primero en demostrar que con esfuerzo se pueden superar las dificultades y has tenido un tesón y una paciencia que probablemente ni yo mismo hubiera tenido. Durante este periodo espero haber sabido transmitirte mi gratitud porque la palabra gracias se queda corta.

Igualmente a la Dra. M^a Carmen Rubio, jefa de servicio durante gran parte de mi periplo como residente. Gracias por su cercanía y gran apoyo durante todo el tiempo que hemos coincidido en el laboratorio y por haberme dado la oportunidad de compatibilizar mi etapa como residente con la realización de esta tesis.

A la Dra. Pilar Abad, Dra. Sonia Algarate, Dr. Javier Castillo, Dra. Rocío Cebollada, Dra. Estrella Durán, Dra. Concepción García, Dra. Joaquina Gil, Dra. María José Gude, Dra. María José Lavilla, Dra. Mercedes Oca, Dra. Soledad Salvo, Dra. Elena Sánchez, Dra. Cristina Seral y a la Dra. Asunción Vitoria. Todos me habéis enseñado, me habéis intentado entender (algo que no es baladí) y sobre todo me habéis transmitido el entusiasmo por la microbiología que ahora hago mío.

A mis compañeros residentes. A todos mis “R-mayores”, María José, Pilar y Rocío, a quienes debo agradecer por partida doble ya que tuve la

oportunidad de aprender de ellas una vez finalizada su residencia. A Ana y por supuesto y muy especialmente a María, en cierto modo tú me enseñaste a dar mis primeros pasos en la microbiología y conseguiste que todo fuera más fácil. Me enorgullece creer que para lo bueno y para lo malo, soy tu “sucesor”. Por supuesto a Fabiola quien siempre ha sabido darme buenos consejos, a Alba que es tan diferente y a la vez tan parecida a mí, a Jessica por todos esos grandes momentos en el “copro”, y a María Jesús, siempre tan atenta conmigo. Os estoy profundamente agradecido a todas y espero que en el futuro podamos seguir compartiendo momentos tan buenos.

A todos los auxiliares, técnicos, enfermeras y administrativos del Servicio de Microbiología, y especialmente a las chicas de la sero que siempre han estado dispuestas a colaborar con la realización de las técnicas y a ayudarme cuando lo he necesitado. No me atrevo a nombrarlos a todos porque muchos habéis pasado por el laboratorio estos cuatro años y no quisiera dejarme a nadie, en cualquier caso, a los que estais y a los que estuvisteis, muchas gracias por haberme enseñado y ayudado en lo que he necesitado.

A nuestras “compañeras de las tardes”, en especial a Amanda, que me han acompañado y hecho pasar buenos momentos.

Al Dr. Andrés Canut siempre con el buen humor como filosofía de vida, y todo su equipazo de Vitoria, en especial al Dr. José Luis Barrios y la Dra. Concepción Lekaroz con los que pude coincidir más tiempo. Con todos vosotros tuve la oportunidad de compartir un tiempo muy especial en Vitoria. Gracias por haberme enseñado y acogido como uno más.

A la Dra. Alicia Rodriguez así como a su equipo de la facultad de Farmacia, Dra. Arantxa Isla, Dra. María Ángeles Solinis y como no, al Dr. Eduardo Asín. Han colaborado desde mi época universitaria hasta este momento en mi formación y no me aventuraría a decir que nuestros caminos no volverán a cruzarse. Hasta ese momento, gracias.

A mis compañeros farmacéuticos. Empezando por los de la “casa grande”, en especial a mis “co-R”, así como a mi familia en el clínico, Eva y Gentian, compañeros inseparables durante este tiempo. Juntos empezamos esta aventura donde nadie conocía a nadie en una ciudad desconocida para casi todos, juntos seguimos y “juntos” la seguiremos.

A mis amigos de siempre, por estar en la distancia y por tener momentos para mí. En especial para Ion, que me acompañó aquel lejano día de Abril a Madrid para apoyarme durante mi elección de plaza.

Y sobre todo, a las personas a las que dedico este trabajo. A mis padres, que a pesar de los muchos pesares nunca perdieron la fe en mí. Gracias por inculcarme los valores que ahora rigen mi vida, no hubiera podido culminar nada de lo que he conseguido hasta ahora sin vuestro apoyo constante. A mi hermano Diego y a mi hermana Inés, capaces de sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles. A Javi y Amagoia, que me tratan como a un hermano. A Eider, Jon y Eneko, que me animan mis escapadas a Vitoria. Dedicatoria especial a Olga, como no podría ser de otra forma. Hace ya algún tiempo me marcaste el camino, profesional y personal que aún hoy sigo y que de alguna manera hace que te recuerde cada día.

Por último y desde luego no por ello menos importante a Raquel. No sé qué habría sido de mí estos cuatro años sin tu ayuda, sin tu cariño, sin los momentos que hemos vivido juntos y sin esa sonrisa que me regalas todas las mañanas. Cuando llegué aquí no podía ni imaginar la posibilidad de llegar a compartir mi vida con alguien siquiera parecido a ti, estando a tu lado cualquier paso a lo desconocido es algo sencillo.

Espero que no se me haya quedado nada en el tintero porque estos cuatro años han sido muy intensos. Hay un sabor amargo en mí por cerrar una etapa preciosa en mi vida, pero estoy convencido de que la próxima me deparará momentos igualmente bonitos y espero poder compartirlo con la gente aquí citada.

Este trabajo es una contribución de todos vosotros. MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

Índice

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 VIRUS DE LA HEPATITIS C	3
1.1.1 TAXONOMÍA.....	4
1.1.2 REPLICACIÓN Y PATOGENICIDAD	5
1.1.3 ESTRUCTURA GENÓMICA.....	11
1.1.3.1 Regiones no codificantes.....	13
1.1.3.2 Región estructural	13
1.1.3.3 Región no estructural	15
1.1.3.4 Heterogeneidad genómica del VHC	15
1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y MECANISMOS DE TRASMISIÓN	20
1.2.1 TRANSMISIÓN PARENTERAL	24
1.2.2 TRANSMISIÓN NO PARENTERAL	27
1.3 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO	28
1.3.1 DIAGNÓSTICO INMUNOSEROLÓGICO	30
1.3.2 ENSAYOS CONFIRMATORIOS	33
1.3.3 ANTICUERPOS IgM ANTI-VHC	34
1.3.4 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE VHC.....	35
1.3.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	37
1.3.5.1 Pruebas cualitativas.....	39
1.3.5.2 Pruebas cuantitativas	39
1.3.5.3 PCR en tiempo real	40
1.3.5.4 Métodos para la determinación de genotipos.....	42
1.3.5.5 Técnicas para estimación de la complejidad de la población viral	43
1.3.6 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE LESIÓN HEPÁTICA.....	43
1.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN	48
1.4.1 HEPATITIS AGUDA C.....	48

1.4.2 HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C, CIRROSIS HEPÁTICA Y HEPATOCARCINOMA	51
1.5 TRATAMIENTO	55
1.5.1 OBJETIVOS DEL TRATAMIENTO	57
1.5.2 FACTORES PREDICTIVOS DE RVS PRE-TRATAMIENTO.....	58
1.5.2.1 Polimorfismos dependientes del paciente.....	58
1.5.2.2 Polimorfismos dependientes del virus infectante.....	61
1.5.3 FACTORES PREDICTIVOS DE RVS DURANTE EL TRATAMIENTO	66
1.5.4 FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C	68
1.5.4.1 Terapia convencional	69
1.5.4.2 Agentes Antivirales de Acción Directa (AAD)	74
I) Inhibidores de la proteasa	79
II) Inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósido (NI).....	87
III) Inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido (NNI)	88
IV) Inhibidores de NS5A.....	90
1.5.5 PAUTAS DE TRATAMIENTO CON AAD AUTORIZADOS.....	92
1.5.5.1 Pacientes con Genotipo 1.....	93
1.5.5.2 Pacientes con Genotipo 2.....	95
1.5.5.3 Pacientes con Genotipo 3.....	96
1.5.5.4 Pacientes con Genotipo 4.....	97
1.5.5.5 Pacientes con Genotipo 5 o 6.....	98
1.5.6 MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON CURACIÓN VIROLÓGICA	103
1.6 HEPATITIS C Y TRASPLANTE HEPÁTICO.....	104
2.-OBJETIVOS	109
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	111
3.1 PACIENTES.....	112
3.2 TÉCNICAS.....	114
3.2.1 DETECCIÓN CUANTITATIVA DE ANTÍGENO DEL CORE DEL VHC.....	114
3.2.1.1 Fundamento y procedimiento.....	115
3.2.1.2 Reactivos	115
3.2.1.3 Muestras.....	116
3.2.1.4 Controles de calidad.....	116

3.2.1.5 Interpretación de los resultados	116
3.2.2 DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL ARN DEL VHC.....	117
3.2.2.1 Fundamento	117
3.2.2.2 Reactivos	123
3.2.2.3 Muestras.....	126
3.2.2.4 Técnica.....	127
3.2.2.5 Resultados	131
3.2.3 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO VHC.....	135
3.2.3.1 Fundamento	136
3.2.3.2 Muestras.....	137
3.2.3.3 Reactivos	137
3.2.3.4 Procedimiento de ensayo.....	138
3.2.4 DETERMINACIÓN DE ANTI-VHC.....	143
3.2.4.1 Fundamento y procedimiento.....	144
3.2.4.2 Reactivos	145
3.2.4.3 Muestras.....	146
3.2.4.4 Controles de calidad	146
3.2.4.5 Interpretación de los resultados	146
3.2.5 PRUEBA DE CONFIRMACIÓN: LINE IMMUNOBLOT ASSAY.....	147
3.2.5.1 Fundamento	147
3.2.5.2 Reactivos	148
3.2.5.3 Muestras.....	1489
3.2.5.4 Técnica.....	149
3.2.5.5 Control de calidad	150
3.2.5.6 Interpretación de los resultados	150
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	151
4.- RESULTADOS.....	153
GRUPO 1- CONJUNTO DE PACIENTES ESTUDIADOS	154
1.1 AG VHC + ANTI-VHC +	156
1.2 AG VHC - ANTI-VHC -	158
1.3 AG VHC + ANTI-VHC -.....	159
1.4 AG VHC - ANTI-VHC +.....	161
1.5 AG VHC VS PCR	167
1.6 RESULTADOS EN ZONA GRIS	172
GRUPO 2- PACIENTES HEMODIALIZADOS.....	177
2.1 AG VHC + ANTI-VHC +.....	178

2.2	AG VHC - ANTI-VHC -	179
2.3	AG VHC + ANTI-VHC -.....	180
2.4	AG VHC - ANTI-VHC +.....	181
2.5	AG VHC <i>vs</i> PCR	184
GRUPO 3- PACIENTES INCLUIDOS EN UN PROGRAMA DE TRASPLANTES		187
3.1	AG VHC + ANTI-VHC +.....	189
3.2	AG VHC - ANTI-VHC -	190
3.3	AG VHC + ANTI-VHC -.....	191
3.4	AG VHC - ANTI-VHC +.....	192
3.5	AG VHC <i>vs</i> PCR	195
5.-DISCUSIÓN		198
6.-CONCLUSIONES		248
7.-BIBLIOGRAFÍA.....		250

Índice de Tablas y figuras

<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>1</u>	
TABLA I.1	MORTALIDAD COMPARADA DE VHC VS SINIESTROS DE TRÁFICO Y VS VIH	2
FIGURA I.1	ESTRUCTURA GENERAL DEL VHC	4
FIGURA I.2	CICLO VITAL VHC.....	9
FIGURA I.3	ESTRUCTURA GENÉTICA VHC	12
TABLA I.2	NOMENCLATURA VHC	17
TABLA I.3	COMPARACIÓN DE LAS NOMENCLATURAS ANTIGUA Y MODERNA DE LOS DIFERENTES GENOTIPOS VHC	18
TABLA I.4	ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA DE VHC EN POBLACIÓN ADULTA EN ESPAÑA Y GENOTIPOS MÁS FRECUENTES.....	19
FIGURA I.4	DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LOS GENOTIPOS VHC.....	20
FIGURA I.5	EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA VHC POR EDADES EN ESPAÑA EN 2010	21
TABLA I.5	EVOLUCIÓN DE FACTORES DE RIESGO EN EL CONTAGIO DE VHC EN ESPAÑA DURANTE EL PERÍODO 1996-2001	22
FIGURA I.6	INCIDENCIA VHC EN ESPAÑA	23
FIGURA I.7	RANKING GLOBAL POR N° ABSOLUTO DE PERSONAS CON HEPATITIS C CRÓNICA	24
FIGURA I.8	EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE CONSUMO DE DROGAS Y PERSONAS COINFECTADAS VIH/ VHC.....	25
FIGURA I.9	PORCENTAJE DE PERSONAS INFECTADAS <i>DE NOVO</i> POR EDADES Y TIPO DE TÉCNICA DE CRIBADO EN ESTADOS UNIDOS 2005-2011.....	38
TABLA I.6	DISPOSITIVOS COMERCIALES DISPONIBLES DE PCR EN TIEMPO REAL PARA DETECCIÓN DE ARN VHC	41
FIGURA I.10	CLASIFICACIÓN DE LA FIBROSIS	44
FIGURA I.11	EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN Y PRINCIPALES FACTORES DE MAL PRONÓSTICO	48
FIGURA I.12	ALGORITMO PARA EL TRATAMIENTO VHC PREVIO A LA APARICIÓN DE LOS AAD	50
TABLA I.7	RESPUESTAS AL TRATAMIENTO FRENTE A VHC	67
TABLA I.8	FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO	68
TABLA I.9	RESÚMEN DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS FAMILIAS DE ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA (AAD)	75

TABLA I.10	FAMILIAS DE ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA (AAD)	78
TABLA I.11	RESULTADOS DEL ENSAYO SILEN-C-1.....	86
TABLA I.12	RESULTADOS DEL ENSAYO SILEN-C-2.....	86
FIGURA I.13	SITIOS DE UNIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LA POLIMERASA NAN.....	89
FIGURA I.14	CONTRAINDICACIONES A TRATAMIENTOS BASADOS EN INTERFERÓN	94
FIGURA I.15	TRASPLANTES HEPÁTICOS EN ARAGÓN	105

MATERIAL Y MÉTODOS.....111

TABLA M.1	POBLACIONES EVALUADAS	114
FIGURA M.1	DISPOSITIVO ARCHITECT® 2000iSR	115
TABLA M.2	POSIBLES AVISOS ANALIZADOR COBAS® TAQMAN® DE ROCHE EN LA DETERMINACIÓN DE ARN VHC	133
TABLA M.3	INTERPRETACIÓN RESULTADOS COBAS® TAQMAN® DE ROCHE EN LA DETERMINACIÓN DE ARN VHC	134
FIGURA M.2	PASOS DE REACCIÓN PARA GENOTIPADO DEL VHC	136
FIGURA M.3	PATRÓN DE BANDAS EN EL GENOTIPADO DEL VHC	137
TABLA M.4	CARACTERÍSTICAS DE CMIA	144
FIGURA M.4	PATRÓN DE BANDAS EN EL ENSAYO CONFIRMATORIO AUTO-LIA™	149
TABLA M.5	LECTURA DE RESULTADOS LIA	150

RESULTADOS.....152

Grupo 1 – Conjunto de pacientes estudiados

TABLA R.1.1	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y ANTI-VHC	153
TABLA R.1.2	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y PCR	153
TABLA R.1.3	DESGLOSE DE RESULTADOS, VALORES DE AG VHC Y LIA	155
TABLA R.1.4	PACIENTES CON VALORES DE AG VHC EN ZONA GRIS	156
TABLA R.1.5	PACIENTES CON RESULTADOS AG VHC + / ANTI - VHC + / LIA IND	157
TABLA R.1.6	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC - / ANTI-VHC - SEGÚN RESULTADO LIA	157
TABLA R.1.7	PACIENTES CON PATRÓN AG VHC ZGR / ANTI-VHC – CATALOGADOS DEFINITIVAMENTE COMO NEGATIVOS	158
TABLA R.1.8	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC + / ANTI-VHC - SEGÚN RESULTADO LIA	158

TABLA R.1.9	PACIENTES CON PATRÓN AG VHC + / ANTI-VHC -	158
TABLA R.1.10	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC - / ANTI-VHC + SEGÚN RESULTADO LIA	160
TABLA R.1.11	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR -	161
TABLA R.1.12	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA IND	163
TABLA R.1.13	DISTRIBUCIÓN DE LAS BANDAS LIA VHC Y SUS INTENSIDADES EN PACIENTES CON PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA IND	164
TABLA R.1.14	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA +	165
TABLA R.1.15	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA -	166
TABLA R.1.16	DESGLOSE DE RESULTADOS DE AG VHC FRENTE A PCR	167
TABLA R.1.17	MUESTRAS CON RESULTADOS DISCORDANTES AG VHC / PCR	168
GRÁFICA R.1	CORRELACIÓN AG VHC Y CARGA VIRAL	169
TABLA R.1.18	RESULTADOS DE AG VHC EN FUNCIÓN DE GENOTIPO VHC	170
TABLA R.1.19	RESULTADOS DE ANTIGENEMIA EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO VHC EN PACIENTES CON BAJA CV	170
TABLA R.1.20	DISTRIBUCIÓN DE CARGAS VIRALES POR GENOTIPO	171
TABLA R.1.21	DESGLOSE DE RESULTADOS DE AG VHC EN ZONA GRIS FRENTE A ANTI-VHC	172
TABLA R.1.22	DESGLOSE DE RESULTADOS DE AG VHC EN ZONA GRIS FRENTE A PCR	172
TABLA R.1.23	PACIENTES CON RESULTADO DE AG VHC EN ZONA GRIS	173
TABLA R.1.24	RESÚMEN RESULTADOS GRUPO ESTUDIO Nº1	174

Grupo 2 – Pacientes sometidos a hemodiálisis

TABLA R.2.1	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y ANTI-VHC	175
TABLA R.2.2	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y PCR	177
TABLA R.2.3	DESGLOSE DE RESULTADOS, VALORES DE AG VHC Y LIA	177
TABLA R.2.4	DIFERENTES ANÁLISIS A LOS QUE HA SIDO SOMETIDO EL PACIENTE MANA.....	178
TABLA R.2.5	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC - / ANTI-VHC - SEGÚN RESULTADO LIA	178
TABLA R.2.6	PACIENTES CON PATRÓN AG VHC ZGR / ANTI-VHC -.....	179
TABLA R.2.7	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC + / ANTI-VHC - SEGÚN RESULTADO LIA	179
TABLA R.2.8	PACIENTES CON PATRÓN AG VHC + / ANTI-VHC -	179
TABLA R.2.9	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC - / ANTI-VHC + SEGÚN RESULTADO LIA	180
TABLA R.2.10	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA IND	181

TABLA R.2.11	DISTRIBUCIÓN DE LAS BANDAS LIA VHC Y SUS INTENSIDADES EN PACIENTES CON PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA IND	181
TABLA R.2.12	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA +	182
TABLA R.2.13	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA -	182
TABLA R.2.14	DESGLOSE DE RESULTADOS DE AG VHC FRENTE A PCR	183
TABLA R.2.15	PACIENTES EN HEMODIÁLISIS CON DETERMINACIÓN PARALELA DE AG VHC Y PCR	183
TABLA R.2.16	RESÚMEN DE RESULTADOS GRUPO ESTUDIO Nº2	185

Grupo 3 – Pacientes Implicados en el programa de trasplantes

TABLA R.3.1	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y ANTI-VHC EN PACIENTES INCLUIDOS EN EL PROGRAMA DE TRASPLANTES.....	186
TABLA R.3.2	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y ANTI-VHC CANDIDATOS A DONANTES DE ÓRGANOS	187
TABLA R.3.3	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE AG VHC Y PCR EN PACIENTES INCLUIDOS EN EL PROGRAMA DE TRASPLANTES.....	188
TABLA R.3.4	DESGLOSE DE RESULTADOS, VALORES DE AG VHC Y LIA	188
TABLA R.3.5	PACIENTES CON VALORES DE AG VHC EN ZONA GRIS	189
TABLA R.3.6	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC - / ANTI-VHC - SEGÚN RESULTADO LIA	189
TABLA R.3.7	PATRONES DE RESULTADOS OBSERVADOS EN LA PACIENTE KK	190
TABLA R.3.8	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC + / ANTI-VHC - SEGÚN RESULTADO LIA	191
TABLA R.3.9	PACIENTES CON PATRÓN AG VHC + / ANTI-VHC -	191
TABLA R.3.10	DESGLOSE DE RESULTADOS AG VHC - / ANTI-VHC + SEGÚN RESULTADO LIA	192
TABLA R.3.11	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC +	192
TABLA R.3.12	PACIENTES CON PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA IND	193
TABLA R.3.13	PACIENTES CON EL PATRÓN AG VHC - / ANTI-VHC + / PCR ND / LIA +	194
TABLA R.3.14	DESGLOSE DE RESULTADOS DE AG VHC FRENTE A PCR	195
TABLA R.3.17	RESÚMEN DE RESULTADOS GRUPO ESTUDIO Nº2	196

1.- Introducción

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) supone un importante problema de salud pública. Según datos recientes de la organización mundial de la salud (1), más de 185 millones de personas están infectadas en el mundo, de los cuales 350.000 mueren cada año. En España, según datos de la misma organización, la prevalencia oscila entre el 1,2 - 1,9%, lo que supone que unas 700.000 personas padecen la infección y se estima que un 70% de ellas sufren hepatitis C crónica (HCC). Al cabo de años, la infección crónica por el VHC se asocia a una mayor incidencia de cirrosis hepática y hepatocarcinoma, suponiendo la causa de un 30% de los trasplantes hepáticos realizados en España y convirtiendo al virus de la Hepatitis C en la principal causa de muerte por infección en España (2, 3, 8, 76) y superior incluso a las producidas por accidentes de tráfico (Tabla 1).

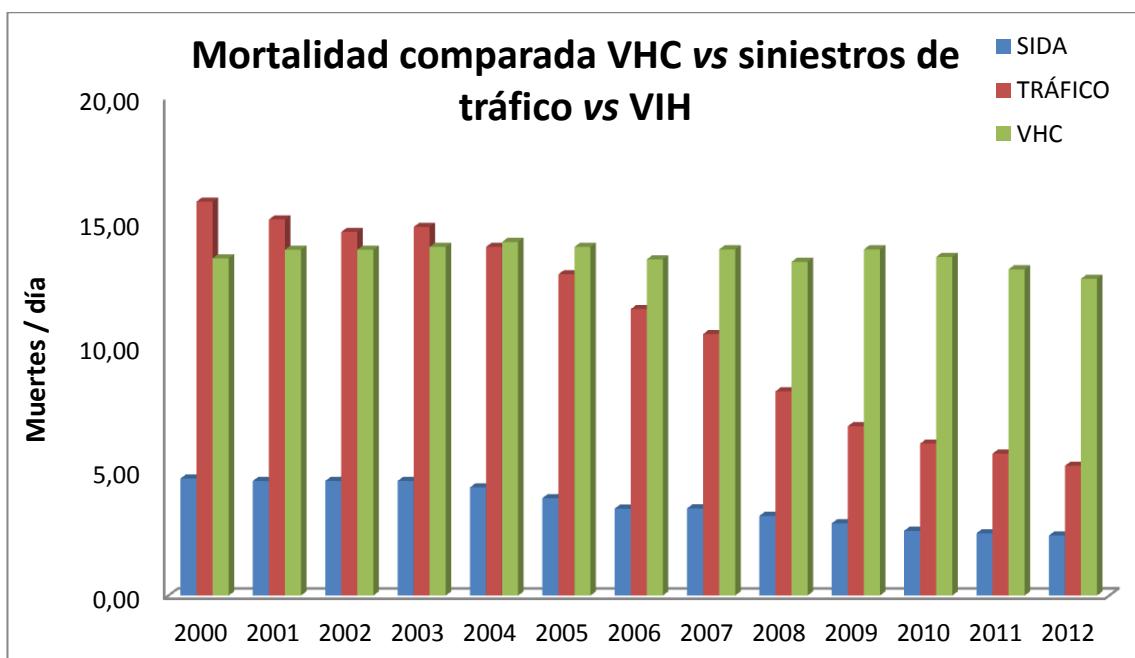


Tabla I.1

Dado que en la actualidad no existe una vacuna eficaz frente al VHC, el tratamiento de la HCC hasta la fecha se ha basado en la combinación del

interferón pegilado (PegIFN) y ribavirina (RBV). No obstante, dada su menor eficacia en ciertos grupos de pacientes, coinfecados VIH-VHC, pacientes con genotipo 1 y 4, y al desarrollo frecuente de efectos adversos en los pacientes en tratamiento, se han desarrollado nuevos antivirales frente al VHC denominados DAA (*direct acting antiviral*). Dentro de estos nuevos fármacos ya han sido autorizados para su comercialización en Europa los inhibidores de la proteasa: boceprevir, telaprevir, simeprevir y paritaprevir y los inhibidores de la ARN polimerasa NS5A: daclatasvir, ledipasvir y ombitasvir y de la ARN polimerasa NS5B análogos de nucleósido: sofosbuvir y no análogos de nucleósido: dasabuvir (1, 4, 4b, 5, 5b, 6).

1.1 VIRUS DE LA HEPATITIS C

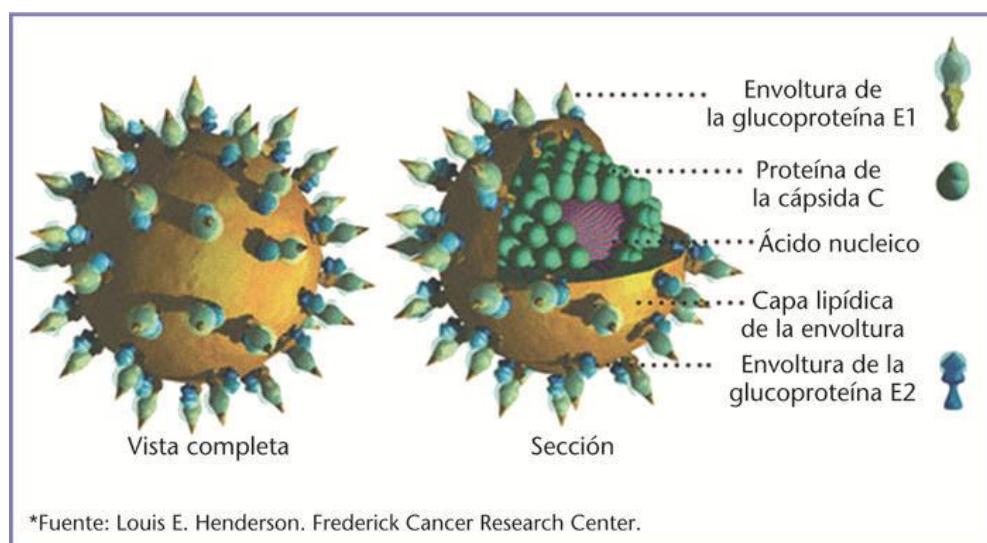
Al principio de la década de 1970 se introdujo el nombre de hepatitis ““no-A, no-B”” para las hepatitis transmisibles al hombre y al chimpancé que no presentaban marcadores serológicos de la hepatitis A ni B (7). Aunque la mayoría de ellas estaban relacionadas con las transfusiones sanguíneas, en 1979 se demostró que también podían transmitirse por otros mecanismos. Su diagnóstico, por aquel entonces, se basaba en la exclusión de los otros tipos de hepatitis viral (8).

Era conocido que cerca del 10% de los pacientes que recibían una transfusión sanguínea desarrollaban un tipo de hepatitis, que la mayoría de veces era asintomática durante la fase aguda y que sólo era detectable en aquellas ocasiones en las que se hacía un análisis de rutina de transaminasas. Pero un 70% de estos pacientes evolucionaban a la cronicidad y, al cabo de algunos años, la histología hepática mostraba importantes lesiones de hepatopatía crónica y cirrosis.

Mediante estudios físico-químicos lo primero que se confirmó fue que el virión debía tener entre 30 y 50 nm y poseer una envuelta lipídica. En un

principio se fracasó en el intento de identificación del virus y en la detección de anticuerpos específicos (9,10).

A mediados de 1988, en el laboratorio de Michael Houghton de la corporación Chiron, en colaboración con el laboratorio de Daniel Bradley de los Centros de Control y Prevención de las Enfermedades (CDC), se identificó un antígeno codificado por el virus asociado con la hepatitis ““no-A, no-B”” postrasfusional y a su agente se lo denominó virus de la hepatitis C (VHC) (9). Poco tiempo después se convirtió en el primer virus descubierto mediante clonaje molecular del genoma viral completo (11), sin el uso directo de métodos bifásicos o biológicos. Esto se consiguió mediante la extracción del ARN del virus procedente del plasma de un chimpancé infectado por VHC inoculado con un concentrado de Factor XIII contaminado. Fue durante ese periodo, cuando surgieron otros descubrimientos importantes, como el reconocimiento de la capacidad de este virus de producir infecciones latentes y su fuerte asociación con hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular.



*Fuente: Louis E. Henderson. Frederick Cancer Research Center.

Figura I.1-Estructura general del VHC (11b)

1.1.1 Taxonomía

El VHC es un virus ARN de cadena simple con polaridad positiva con un genoma de 9400 nucleótidos aproximadamente. El virión, que tiene forma esférica, se compone de cápside icosaédrica, dotado de envoltura y tiene,

aproximadamente, 50 nm de diámetro (12, 12b, 13). Su estructura, organización genómica y ciclo de replicación son similares a los de la familia *Flaviviridae* (14, 15), si bien lo suficientemente distintos como para ser clasificados dentro de un género nuevo, el de los *Hepacivirus* (16). Los géneros relacionados incluyen al género *Flavivirus* (con especies como los virus de la fiebre amarilla y del dengue) y al género *Pestivirus* (con especies como los virus de la diarrea viral bovina y de la fiebre porcina clásica). Los virus GB (17, 18) (incluido el virus GB C, que a menudo es denominado como “virus de la hepatitis G”) también se encuentran en la familia *Flaviviridae*, si bien aún no se han asignado a un género en particular y no parecen ser causa de daño hepático en humanos. De estos virus, el virus GB B tiene el nivel más elevado de relación con el VHC.

1.1.2 Replicación y patogenicidad

A pesar de que el VHC fue clonado y secuenciado completamente en 1991, no fue hasta 2005 cuando se logró desarrollar cultivos celulares eficientes y eso fue lo que ha retrasado la aparición de una descripción precisa de su mecanismo de replicación celular hasta este último lustro. Estos cultivos han sido realizados a partir de diversas líneas celulares siendo las más frecuentes las “células Hugh 7.5” (células de hepatoma humano) (19). El reciente desarrollo de estos nuevos sistemas de cultivo celular de VHC (19b) ha proporcionado no solo las armas necesarias para identificar y validar los antivirales de acción directa más prometedores, también ha supuesto un instrumento indispensable para la caracterización de numerosos factores celulares que colaboran en la propagación del VHC.

Como parásitos intracelulares obligados, los virus tienen una fuerte dependencia de las funciones de sus células huésped a la hora de propagarse. Evidentemente esto no es diferente en el VHC, quien utiliza múltiples factores presentes en la célula hospedadora para penetrar en ella, replicar su genoma y ensamblar el virus resultante de la replicación. En principio, todos estos factores de dependencia del VHC son potenciales dianas terapéuticas dado

que bloqueando su actividad se inhibirá la propagación del virus. Por ello, los avances en el cultivo celular de este virus han supuesto un importante avance en el diseño de nuevos fármacos para combatir su infección gracias a la posibilidad de poder estudiar su ciclo vital.

El VHC es un virus no lítico, es decir, infecta las células diana (hepatocitos), prolifera en su interior y es liberado al espacio extracelular sin alterar la integridad celular. Durante su ciclo vital, el VHC utiliza moléculas propias de la célula hospedadora (denominados factores de entrada o en Inglés *Host factors*), así como diversos mecanismos biológicos celulares tales como las vías de endocitosis y secreción. El tropismo del virus por el tejido hepático se fundamenta en los numerosos factores del hospedador que los hepatocitos presentan en su superficie y que están ausentes en otras células. Del mismo modo se han observado importantes diferencias entre los *Host factors* humanos y los de otros animales, lo cual justificaría el que el VHC únicamente infecte humanos y chimpancés.

El ciclo vital del VHC puede dividirse en 4 etapas:

1.-Entrada del virus en el hepatocito

A través del torrente sanguíneo el VHC llega al hígado donde tiene la capacidad de atravesar el endotelio fenestrado y de esta forma entrar en contacto con la superficie basolateral de los hepatocitos, unas células hepáticas parenquimatosas altamente especializadas.

La entrada del VHC al hepatocito es un complejo proceso que requiere de numerosas proteínas de la célula hospedadora, dentro de éstas se encuentran los 4 denominados “factores de entrada” que son indispensables para la admisión del VHC en el interior de la célula: Receptor neutralizador tipo B1 (SCARB1), tetraspanina CD81 y dos moléculas estrechamente conectadas la claudina-1 (CLDN1) y la ocludina (OCLN) (20-24). Mientras que SCARB1 y CD81 se unen a la glicoproteína E2 del VHC (20,21), se duda de la interacción entre ésta con CLDN1 y OCLN. Sin embargo, recientes estudios genéticos subrayan la necesidad de que todos y cada uno

de estos 4 factores de entrada se expresen para que una célula sea susceptible de ser infectada (23).

Estudios cinéticos y de imagen sugieren que la entrada del VHC se lleva a cabo mediante un mecanismo estrictamente controlado en el espacio y el tiempo. Por ejemplo, los factores de entrada serían utilizados de una forma escalonada (22, 25-27) dado que se encontrarían en diferentes compartimentos de la membrana (28, 29). No obstante, no se han encontrado evidencias experimentales directas de este modelo de entrada multifásico. De cualquier manera, tal y como han indicado los modelos de ratones transgénicos con factores de entrada humanos, los factores CD81, SCARB1, CLDN1 Y OCLN son indispensables para la entrada del VHC tanto *in vitro* como *in vivo* (30-32).

Junto con los factores de entrada esenciales, la presencia de otras moléculas de la célula hospedadora permite la invasión celular. Dentro de dichas moléculas se encuentran factores de fijación como los glucosaminoglucanos, el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) (33, 34), el receptor tirosina quinasa, el receptor de Niemann-Pick C1 y el receptor de transferrina (35,36).

Tras la unión a la superficie celular y la interacción con los factores de entrada, el virus es introducido por endocitosis mediada por clatrina. Dentro del endosoma primario, rodeado por un pH ácido, la cubierta del VHC se fusiona con la membrana endosomal. Una vez en el citosol, la cápside compuesta por la proteína del core se desestructura y libera el ARN viral finalizando de este modo la etapa de invasión.

2.-Translación del genoma y procesamiento de las poliproteínas

La segunda etapa del ciclo vital del VHC sucede en el citoplasma del hepatocito, donde la cadena de ARN de polaridad positiva es traducida en el retículo endoplásmico por los ribosomas celulares generando una poliproteína. Ésta poliproteína es entonces procesada por la célula hospedadora y por las proteasas virales produciendo las 10 proteínas

estructurales (E1, E2, core) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).

3.-Replicación genómica

En un tercer paso, la polimerasa dependiente de ARN viral NS5B amplifica el genoma viral originando una cadena ARN de polaridad negativa intermedia. La replicación de ésta se lleva a cabo en compartimentos citosólicos especializados conocidos como red membranosa o vesículas de replicación y que derivan del retículo endoplásmico (37-40). Los *Host factors* han participado previamente en la formación de dichas vesículas donde, en colaboración con múltiples proteínas virales (incluidas no estructurales como NS3, NS4A, NS4B, NS5A Y NS5B), dan lugar al ensamblaje del complejo de replicación del VHC (41). Entre los factores de replicación implicados en este proceso, destacan ciclofilina A (CypA), fosfatidilinositol 4-quinasa III α (PI4KIII α) y micro-ARN-122 (miR-122).

4.-Ensamblaje de la cubierta y liberación desde la célula hospedadora.

Una vez se hayan sintetizadas tanto la cadena replicada del ARN viral como las proteínas estructurales E1, E2 y core, los cuatro componentes son ensamblados en viriones nacientes. Inicialmente, el ARN es empaquetado en unos orgánulos lipídicos de almacenamiento citosólico tipo cápside. A continuación las cápsides de VHC abandonan el retículo endoplásmico, llevándose consigo parte de éste, a modo de cubierta y, junto con ella, dímeros E1E2 embebidos en lo que finalmente se convierte en una bicapa lipídica para el virus. Por último, el VHC utiliza la vía de secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para abandonar el hepatocito, de esta forma los viriones VHC circulan a través del torrente sanguíneo formando un complejo con dichas lipoproteínas.

Numerosos *host factors* realizan funciones esenciales durante el ensamblaje y liberación del virus. Dos enzimas celulares modificadoras de lípidos denominadas diacilglicerol aciltransferasa (DGAT1) y la fosfolipasa A2 citosólica (PLA2GA4) contribuyen a la generación de progenie infecciosa del VHC (42,43). Mientras DGAT1 interactúa directamente con la proteína

del core posibilitando su entrada en la cápside lipídica, PLA2GA4 procede mediante la adhesión de gricerofosfolípidos con ácido araquidónico en la posición sn2, afectando de esta manera a la fluidez de la membrana y generando una curvatura en ella que conduce a la producción del virus. En el retículo endoplásmico glucosidasas del hepatocito pliegan y maduran las glicoproteínas de la cubierta del VHC. Finalmente, apolipoproteínas como la apolipoproteína E (apoE) y proteínas involucradas en la producción de VLDL como la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTTP) mantienen la producción de partículas víricas.

Con la liberación de las lipoviropartículas VHC infecciosas al torrente sanguíneo el ciclo vital se habrá completado. Cabe mencionar, que además de la infección de los hepatocitos por viriones libres, el VHC puede (al menos *in vitro*) pasar directamente de una célula a otra requiriendo únicamente algunos de los factores de entrada previamente mencionados.

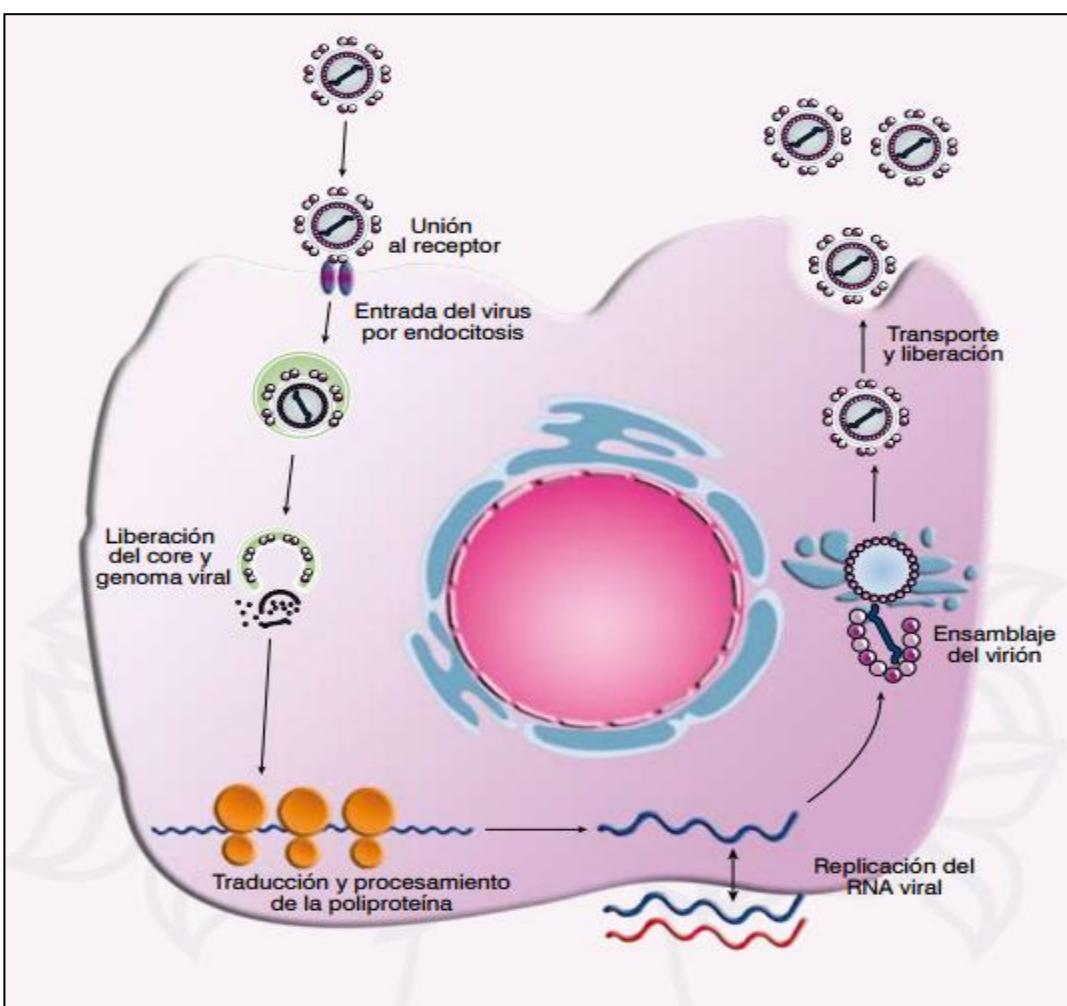


Figura I.2-Ciclo vital VHC (19)

En definitiva el virus no daña el hepatocito por sí mismo. En realidad, los mecanismos mediante los cuales el virus de la hepatitis C causa el daño hepático crónico y progresivo no están completamente dilucidados. Se ha observado una falta de correlación entre los niveles intrahepáticos del ARN del VHC y el grado de inflamación en el material de biopsias de pacientes con hepatitis crónica por virus C, lo que sugiere que el daño está mediado principalmente por mecanismos inmunes.

Durante la infección aguda, se produce un pico sérico de transaminasas que se ha correlacionado con la activación de la respuesta inmune celular, quien se ha identificado como la responsable del daño histológico a nivel hepático. Tras su activación, las células T secretan citoquinas y otras sustancias que afectarán al hígado de diversa manera. Varias de estas citoquinas actúan como mediadoras en la inflamación causada por la hepatitis C y se han relacionado con la muerte de los hepatocitos en situaciones de colestasis o fibrosis aunque, paradójicamente, también participan en la regeneración posterior a este daño hepático. Aunque no existe consenso al respecto, numerosos estudios indican que el desequilibrio en la producción de las citoquinas Th1 y Th2 juegan un papel crucial en la progresión de la hepatitis C crónica. La justificación de esta teoría es que la expresión de citoquinas Th1, como por ejemplo la IL-2 o el TNF se relacionan con cuadros más agresivos a nivel hepático, mientras que la expresión de las citoquinas Th-2 como la IL-10 se han relacionado con cuadros más leves (43b).

Del mismo modo, se han descrito diversos factores, también ajenos al virus, que se han relacionado con la progresión de la enfermedad (también abordado en el apartado 1.4 “Historia natural de la infección”):

1. Histológicos: a mayor actividad inflamatoria en la biopsia de inicio, mayor progresión a cirrosis.
2. Niveles de transaminasas persistentemente normales: se acompañan con menor progresión a fibrosis y cirrosis.
3. Consumo de alcohol: se asocia al aumento de la progresión a fibrosis, hepatocarcinoma y mortalidad global.

4. Consumo de tabaco: aumenta la progresión a fibrosis y carcinoma hepático.
5. Metabolismo del hierro: la sobrecarga de hierro en el tejido hepático secundaria a la presencia de inflamación y posiblemente a alteraciones del metabolismo de hierro producidas por el virus, lo cual ocurre en el 30-40% de los pacientes con hepatitis C crónica, se asocia a desarrollo más acelerado de fibrosis.
6. Coinfección con hepatitis B: se acompaña de niveles más elevados de transaminasas y desarrollo más rápido de fibrosis y cirrosis, y especialmente mayor riesgo de hepatocarcinoma.
7. Coinfección con VIH: debido a la alteración inmunológica en estos enfermos, se observa una progresión sensiblemente más rápida a cirrosis, fallo hepático y hepatocarcinoma.

Por otro lado, existen otros factores considerados como predictivos en el buen pronóstico de la infección, entre ellos la edad menor de 40 años en el momento de la infección (los niños eliminan espontáneamente el virus entre un 75-100% de los casos), sexo femenino, descendencia afroamericana y la aparición de ictericia en la fase aguda de la infección (síntoma de una respuesta inmune más efectiva que elimina los hepatocitos infectados) (44).

1.1.3 Estructura genómica

El VHC es un virus de ARN de cadena simple y polaridad positiva, de unos 9.500 nucleótidos incluyendo una cola de poliA en el extremo 3', que nunca pasa en su ciclo celular por fase de ADN. Es un virus con envuelta glicopéptídica. Su genoma contiene un único marco de lectura abierta (*open reading frame*, ORF) que ocupa casi todo el genoma y codifica para una poliproteína precursora, flanqueada por dos regiones no codificantes altamente conservadas (NC) en ambos extremos: 5' y 3' (45). A partir de dicha poliproteína se forman las proteínas víricas individuales, estructurales y no estructurales, estando regulado este proceso tanto por proteínas virales como celulares.

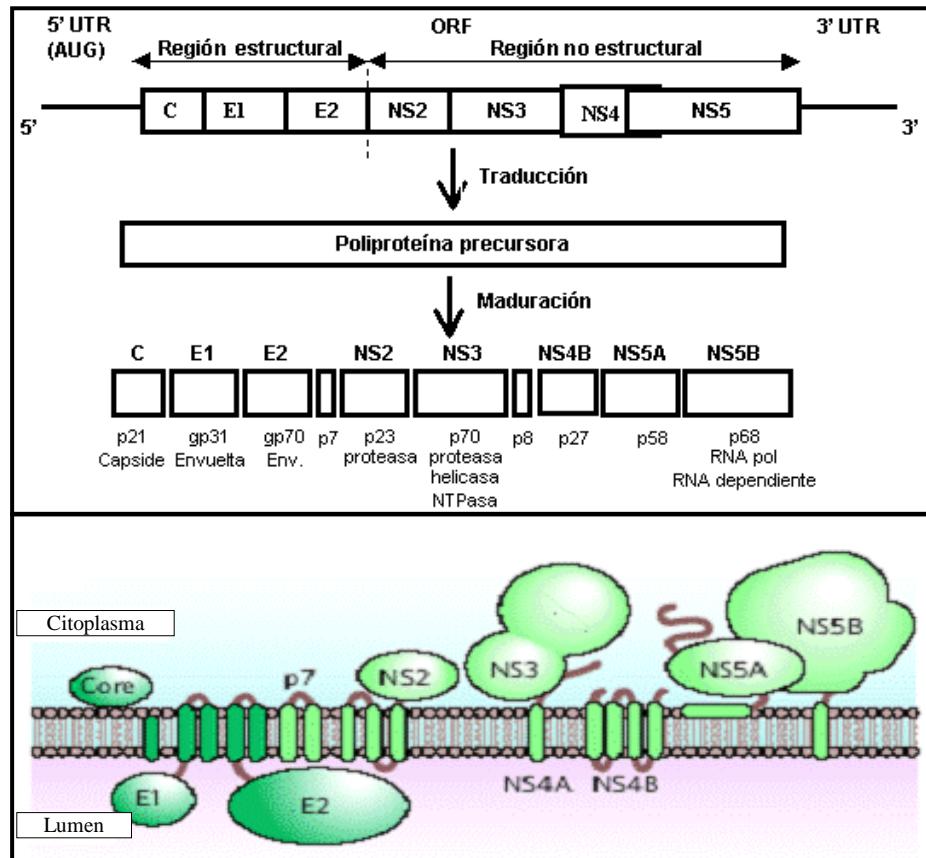


Figura-I.3- Estructura genética VHC

Las **proteínas estructurales** son las proteínas que forman parte de la partícula viral y que incluyen; la proteína del *core* y dos proteínas de cubierta, la E1 y E2. La primera de ellas, una vez madura, se une al ARN viral para formar la nucleocápside. Se trata de una proteína muy conservada que interacciona con numerosas proteínas celulares afectando algunas funciones de la célula hospedadora: transcripción, metabolismo lipídico, muerte celular y diversas vías de señalización. Algunos autores la han asociado con la inducción de esteatosis y hepatocarcinoma (45). Esta nucleocápside viral quedará envuelta por dos glicoproteínas (E1 y E2) tras seguir un proceso de ensamblaje.

Las **proteínas no estructurales** denominadas **NS2** y **NS3** son un componente de la proteasa NS2-3. La **NS3** además también forma parte de la serinproteasa, la NTPasa y de la helicasa. La **NS4A** ejerce de cofactor para la serinproteasa **NS3**. La **NS5B** forma parte de la ARN polimerasa dependiente de ARN. Por último las **NS4B**, **NS5A** y **NS5B** tienen en común que se han relacionado con el mecanismo de resistencia al interferón.

1.1.3.1 Regiones no codificantes

El **extremo 5' NC** está muy conservado entre los diferentes genotipos y la conforman los primeros 332-342 nucleótidos del extremo 5'. Hay porciones de la secuencia de esta región que tienen una alta homología con la secuencia 5'NC de los Pestivirus y los virus GB B. Esta secuencia genómica no codifica ninguna proteína, sin embargo es esencial para la traducción (46, 47), ya que adopta, junto a los primeros 30-40 nucleótidos de la región codificante del core, una estructura terciaria necesaria para el anclaje y entrada al ribosoma (*internal ribosome entry site, IRES*). Esto explicaría porque su secuencia está tan bien conservada entre todos los aislados secuenciados (homología superior al 97%) (48). Esta característica hace que sea una buena diana para el diagnóstico molecular y el diseño de fármacos antivirales (49, 50).

La **región 3'NC** se puede dividir en tres zonas: una región variable de unos 40 nucleótidos, seguida de una secuencia de poli-U/polipirimidinas de longitud variable, y la región terminal altamente conservada de 98 nucleótidos de los que los 46 últimos adoptan una estructura de bucle cerrado (51). Se cree que el **extremo 3'** es esencial para iniciar la replicación viral aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de replicación del VHC. Parece que una vez que entra en el citoplasma de la célula huésped, perdería la cubierta y el genoma viral actuaría como un molde de transcripción de una molécula de ARN complementario (negativo). Esta molécula negativa serviría, a su vez como un molde para la síntesis de la molécula ARN genómica (positiva). Las enzimas capaces de realizar estos pasos, serían proteínas codificadas por el propio virus.

1.1.3.2 Región estructural

El virus de la hepatitis C es un virus pequeño con envoltura. La nucleocápside viral consiste en la proteína del core y el ARN genómico viral. Éste está envuelto por una bicapa lipídica que contiene dos glicoproteínas virales E1 y E, que constituyen el virión infeccioso de 30-50 nm de diámetro.

Región del core: Codifica una fosfoproteína muy conservada no glicosilada de 191 aminoácidos (p21) codificada por el gen C. Constituye la subunidad básica

de la proteína de la nucleocápside que forma el core del virión (52). La región carboxiterminal contiene una región hidrofóbica que actúa como secuencia señal para el transporte de E1 dentro del retículo endoplásmico y para el procesamiento membrana-dependiente del core. Según los resultados de diferentes estudios de inmunofluorescencia, la proteína del core se localiza en el citoplasma. También se han localizado formas menores de la proteína en el núcleo y, de hecho, la translocación de la proteína del core desde el citoplasma al núcleo se ha propuesto como mecanismo potencial de transformación celular. Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína del core podría interactuar con protooncogenes de las células del huésped y algunos trabajos la han implicado en el desarrollo de hepatocarcinoma en pacientes con infección crónica por el VHC, al igual que ha ocurrido con otras regiones genómicas del virus (53).

Región de envoltura: Los genes E1 y E2 codifican dos proteínas de envoltura del VHC: gp31 y gp70 (54,55). Ambas glucoproteínas contienen un dominio hidrofóbico en el extremo aminoterminal que tiene función de anclaje. Las dos proteínas interaccionan entre sí y actúan como heterodímeros. E1 y E2 estarían implicadas en la unión a receptores celulares y su posterior fusión, es decir, en la entrada del virus dentro de las células del huésped. El gen E2 contiene una región hipervariable (HVR-1) que corresponde a los primeros 27 aminoácidos de la proteína gp70, que están expuestos en la superficie del virus y que contienen epítopos para linfocitos B, que mutan rápidamente bajo la presión del sistema inmunológico, escapando así de la neutralización y consiguiendo la persistencia del virus (56, 57). La región E2 se ha relacionado con la respuesta al tratamiento, esto se debe a que dentro de ella hay un dominio de 12 aminoácidos llamado PePHD (PKR-eIF-2) que contiene una secuencia similar al sitio de fosforilación eIF-2 (eucaryotic Initiation Factor 2 alpha phosphorylation homology domain) de la PKR, una proteinquinasa estimulada por el ARN de doble cadena que desencadena la cascada de reacciones de la síntesis del interferón. Ésta es otra diana importante de tratamiento ya que se están diseñando anticuerpos neutralizantes contra E2 para mejorar la respuesta al interferón.

1.1.3.3 Región no estructural

El grupo de las proteínas no estructurales está formado por siete integrantes. Básicamente son proteínas con acción proteasa, helicasa y polimerasa, necesarias para la replicación viral.

Regiones NS2 y NS3: Estas regiones codifican para dos proteasas que intervienen en el procesamiento de toda la región no estructural del precursor poliproteico (58,13). NS2 codifica para una proteína hidrofóbica que junto con el último tercio de la región N-terminal de NS3 forman una proteasa dependiente de zinc, y NS3 es una serinproteasa-helicasa y NTPasa.

Regiones NS4A y NS4B: El producto de NS4A actúa como cofactor de la actividad serinproteasa de NS3 (59, 60). La función del producto p27 de NS4B está relacionada con la formación de la red membranosa donde se desarrolla la replicación del ARN vírico descrita previamente en el apartado del ciclo vital del virus.

Regiones NS5A y NS5B: Los productos fosforilados de 56 y 58 kD, que son codificados por estas dos regiones, probablemente juegan un papel muy importante en el mecanismo de replicación viral. Se ha descrito una relación entre la secuencia del NS5A y la respuesta al tratamiento con interferón, modulando la cascada de señales de su síntesis, asociándose e inhibiendo la actividad de la quinasa estimulada por el ARN de doble cadena (PKR) (61). Así se ha demostrado que los pacientes con genomas circulantes de VHC del genotipo 1b, que acumulan mutaciones en la región NS5A, llamada ISDR (Interferon Sensitive Determining Region), responden mejor al tratamiento. El producto de NS5B contiene el dominio ARN polimerasa ARN dependiente esencial para la replicación del genoma del VHC (62).

1.1.3.4 Heterogeneidad genómica del VHC

El VHC es un virus con una marcada variabilidad genética, y como tal, evoluciona rápidamente, debido a sus elevadas tasas de mutación (tasa promedio está entre 1.1 y 1.5×10^{-3} mutaciones por nucleótidos por año) (63) y de replicación (10^{11} nuevas partículas de VHC / día) y por la falta de

mecanismos de reparación de errores de su ARN-polimerasa. El grado de variabilidad no es homogéneo a lo largo de todo su genoma, ya que no todas las regiones tienen la misma capacidad de mutar. La consecuencia directa es que, en un paciente infectado, la población viral circula como una **quasiespecie** (64), es decir, como una mezcla compleja de mutantes que se diferencian por pequeños cambios, en general mutaciones puntuales (cambios de nucleótidos). Cada mutante tiene mayor o menor capacidad de replicación (*fitness*), de manera que todos ellos compiten por producir nuevos genomas y están sometidos a selección natural. En este panorama, los mutantes aparecen y desaparecen generando un sistema de evolución continua altamente dinámico (65). Además, se ha demostrado que no sólo se trata de una simple mezcla de mutantes, sino que cooperan entre ellos (66), de modo que la unidad de selección no es el virión aislado sino la población, o sea, la quasiespecie. Esto le da una gran ventaja selectiva para adaptarse a un medio cambiante. De este modo, la mutación y, en menor grado, la recombinación constituyen los dos mecanismos de variación conocidos que permiten al VHC persistir y adaptarse a condiciones ambientales cambiantes, hecho que dificulta la obtención de una vacuna eficaz para su tratamiento así como propicia el establecimiento de infección persistente por selección de mutantes de escape a los anticuerpos neutralizantes y linfocitos T.

La heterogeneidad genética que presenta puede ser intragenómica, dando lugar a las quasiespecies víricas, e intergenómica, que da lugar a los **genotipos y subtipos**.

Después de la secuenciación completa del genoma del VHC en 1991 por Choo *et al*, diferentes aislados de VHC del mundo fueron secuenciados. La comparación de estas secuencias condujo a la identificación de diferentes tipos que se diferencian en un 33% entre sí todo el genoma viral. La variabilidad se distribuye igual en todo el genoma excepto la región altamente conservada en 5'NC y las regiones del core y la región hipervariable E2. El distinto grado de homología entre los aislados secuenciados y la observación de mutaciones de nucleótidos y aminoácidos específicamente segregables en grupos o subgrupos en prácticamente todas las regiones genómicas del VHC, ha dado

lugar a la clasificación de los aislados del VHC en genotipos, subtipos, aislados y cuasiespecies.

Se denominan genotipos a aquellos genomas cuyo grado de homología se encuentra entre el 66- 69%; cuando el grado de homología se encuentra entre el 77-80% se habla de subtipo. Dentro de un mismo subtipo, se denomina aislado a aquellos genomas en los que el grado de homología no es superior al 90%. Por último, cuando el grado de homología es superior al 91% se habla de cuasiespecie (67).

Terminología	Homología	Definición
Tipo	66-69%	Heterogeneidad entre virus
Subtipo	77-80%	Virus relacionados dentro de cada tipo
Aislado	81-90%	Especies del mismo subtipo en diferentes pacientes
Cuasiespecie	91-99%	Variantes genéticas en un individuo

Tabla I.2-Nomenclatura VHC

Al principio cada investigador utilizaba su propio criterio de clasificación. En la actualidad se acepta la existencia de seis genotipos mayores y hasta 11 genotipos distintos según la clasificación de Peter Simmonds (68). De acuerdo con la nomenclatura más empleada, los genotipos se denominan mediante un número arábigo, mientras que los subtipos se designan mediante una letra minúscula, en ambos casos por orden de descubrimiento. En la actualidad están identificados más de 100 subtipos de VHC (69,70). Hasta hace poco, los genotipos 7,8,9,11 y el genotipo 10 habían sido señalados en la literatura científica como genotipos distintos, si bien actualmente se recomienda la clasificación de los genotipos 7,8,9 y 11 como los subtipos 6c-6l del genotipo 6, y que el genotipo 10 se clasifique como el subtipo 3k del genotipo 3 (71,72).

Tabla I.3- Comparación de las nomenclaturas antigua y moderna de los genotipos del VHC (15)

Genotipo del VHC (clasificación moderna)	Genotipo del VHC (clasificación anterior)
1	1
2	2
3	3
3 subtipo k	10
4	4
5	5
6 subtipos a-b	6
6 subtipos c-f	7
6 subtipos g	11
6 subtipos h-j	9
6 subtipos k-i	8

La distribución de los genotipos en el mundo es variable. En este momento existe una gran divergencia geográfica que se explica por los movimientos poblacionales, el uso de drogas por vía parenteral y la infección postransfusional. Globalmente el genotipo 1 es el más común (46%), seguido de genotipos 3 (22%), 2(13%) y 4 (13%).

Los genotipos 1, 2 y 3 (68, 71, 73), son los más extendidos, y son los responsables de la mayoría de las infecciones por VHC en Europa occidental, EE.UU y Japón. El genotipo 4 es más frecuente en África del norte, central y Oriente Próximo. Los genotipos 5 y 6 parecen estar relegados en Sudáfrica y Hong Kong, respectivamente. Los genotipos 7, 8 y 9 han sido identificados sólo

en pacientes vietnamitas, y los genotipos 10 y 11 fueron identificados en pacientes procedentes de Indonesia (74).

Según Echevarria *et al* (75), durante los últimos 30 años dos epidemias separadas de VHC han tenido lugar en España. La primera involucró la dispersión de los genotipos 1a y 3, la segunda fue más reciente e involucró la diseminación del genotipo 4. Datos posteriores de estos y otros autores han sugerido que la prevalencia de las cepas VHC genotipo 4 se están extendiendo en la población española. En ese mismo estudio destaca el incremento de la prevalencia de los genotipos 1a, 3 y 4. Los últimos estudios publicados basados en datos del año 2013 en España hablan de una prevalencia de 43,8% para genotipo 1b, 25,5% 1a, 19,6% 3, 8% 4 y 3,1% para el 2 que sería el menos frecuente en nuestro medio (Tabla I.4) (76, 76b, 76c).

Tabla I.4-Estimación de la Prevalencia de VHC en población adulta en España y Genotipos más frecuentes

Prevalencia de Ac anti VHC	1,7% (0,4-2,6%)
Población adulta con Ac anti VHC	688.000 (159.000-1.049.000)
Tasa de viremia	68,6%
Prevalencia de viremia en adultos	1,2% (0,3-1,8%)
Población adulta con viremia	472.000 (109.000-719.000)
Genotipos Tipo y frecuencia	1a: 25,5% 1b: 43,8% 2: 3,1% 3: 19,6% 4: 8%

Igualmente se han descrito cambios en la distribución según la edad, detectándose con más frecuencia el genotipo 3a en personas jóvenes (78). Este hecho podría reflejar la introducción de diferentes tipos víricos a través de determinadas prácticas tales como el uso de drogas por vía parenteral (79).

Los estudios respecto al papel de la heterogeneidad del VHC en la progresión de la enfermedad hepática son discordantes y, mientras algunos autores han encontrado una asociación entre el VHC genotipo 1b y una lesión hepática más grave, incluyendo el desarrollo de carcinoma hepatocelular (80), otros consideran que el genotipo viral no es un factor determinante de mayor gravedad de la hepatopatía (81, 82, 83). Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en la distribución de genotipos, diferencias en los métodos de genotipado, diferencias en la definición de la gravedad de la hepatopatía,

presencia de factores de confusión tales como la edad y/o duración de la infección.

Se ha comprobado que la prevalencia del genotipo 1b es más alta en enfermos de edad avanzada con una duración prolongada de la enfermedad, hecho que podría actuar como factor de confusión al evaluar el peso real del genotipo en la historia natural de la hepatitis crónica C (84,85). Existe un consenso, no obstante, en la asociación entre VHC genotipo 1b y una menor respuesta al tratamiento con interferón (86).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y MECANISMOS DE TRASMISIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un 3% de la población mundial (unos 185 millones de personas) están infectadas por VHC, y entre tres y cuatro millones se infectan de *novo* aproximadamente cada año, siendo difícil de determinar porque la mayoría de infecciones agudas son asintomáticas.

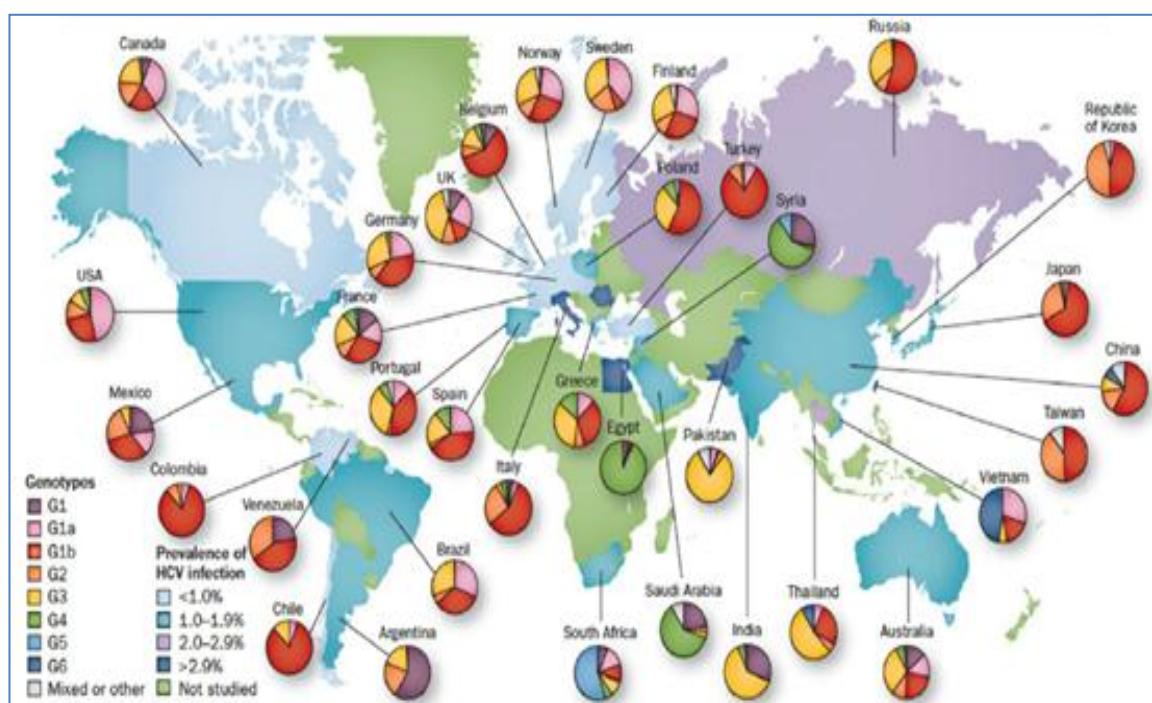


Figura I.4-Distribución mundial de los genotipos VHC (87)

La prevalencia de la infección por VHC presenta diferencias importantes en la distribución geográfica y en el tiempo, tanto en Europa como en EE.UU. La prevalencia varía mucho por países y regiones y oscila entre el 0,02% de Reino Unido o Finlandia al 18% de Egipto (1). Globalmente la prevalencia de la infección crónica por VHC es elevada en África y Asia (>3%) (88,88b), y en menor proporción en países industrializados de Occidente (<2%), aunque en este último grupo se encuentran diferencias según la edad. En EE.UU y Australia, la incidencia más alta se da entre los 30 y los 49 años, y comprenden los dos tercios de todas las infecciones, siendo más baja en menores de 20 y mayores de 50 años (89-91). En contraste, en países como España, Turquía, Italia, Japón y China, la prevalencia de la infección aumenta con la edad. La población entre 40 y 65 años engloba la mayoría de los casos de infección en España (Figura I.5, 76) siendo así mismo notablemente superior en hombres que en mujeres en ese rango de edad. La mayor prevalencia de infección en el mundo se encuentra en zonas rurales del delta del Nilo en Egipto, donde supera el 22% de la población (92).

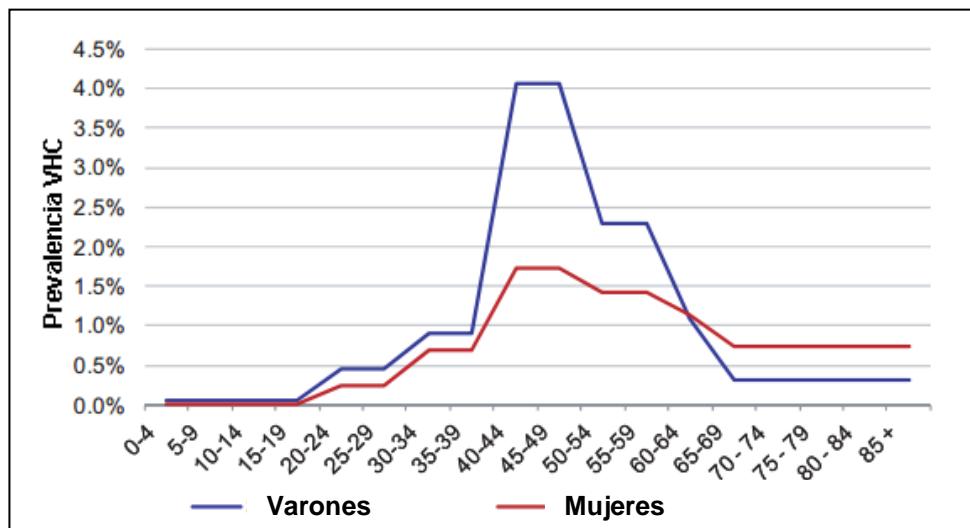


Figura I.5 - Evolución de la prevalencia VHC por edades en España en 2010 (76)

Se cree que la difusión inicial de la infección por VHC se produjo por el uso de material no desecharable utilizado en las inyecciones parenterales (durante las décadas sesenta hasta ochenta), procedimientos médicos invasivos y actos quirúrgicos, así como por la transfusión de hemoderivados. La explosión epidémica de la ADVP a partir de 1980 contribuyó de forma importante a la difusión de la infección por VHC e introdujo cambios en la

distribución geográfica, principalmente en la epidemiología molecular. Las medidas preventivas adoptadas en los países industrializados han contribuido a un cambio progresivo de las causas de infección, así como a una disminución importante de la incidencia de hepatitis aguda postransfusional y esporádica. Concretamente en España, desde 1996 la transmisión debida a consumo de drogas por vía parenteral o a transfusiones han ido disminuyendo hasta convertir hoy en día la infección nosocomial no transfusional como la causa más frecuente de adquisición de la infección pudiendo llegar a representar un 67% de los casos diagnosticados en un hospital terciario (93, 76, Tabla I.5).

Tabla I.5- Evolución de factores de riesgo en el contagio de VHC en España

1996-2001

	OR	IC 95%
ADVP	169,67	21,1-364,75
Transfusión	10,41	3,03-35,75
Tatuajes	9,04	1,25-65,36
<i>Sacristan B Med Clin 1996</i>		
	OR	IC 95%
Tatuajes	6,2	1,85-20,85
Transfusión	5,0	2,19-11,36
ADVP	4,91	2,0-12,0
Nosocomial	2,3	1,14-20,85
<i>Domínguez J Med Virol 2001</i>		
	OR	IC 95%
ADVP	124,8	21,3-734,4
Tatuajes	5,1	1,1-23,7
Cirugía	4,8	1,4-16,6
Transfusión	3,8	1,3-10,8
<i>Riestra S Eur J Gastro 2001</i>		

En España, la prevalencia actual de la infección parece ser mayor que la descrita en la bibliografía del momento situándose, como la más alta de Europa, en un 2,6% (Figura 1.6). Esto es debido principalmente a tres circunstancias: procesos asintomáticos o inadvertidos; infranotificación a los

servicios de prevención (se estima que se registra un 20-30% de los casos); y por mala codificación (76, 94, 95).

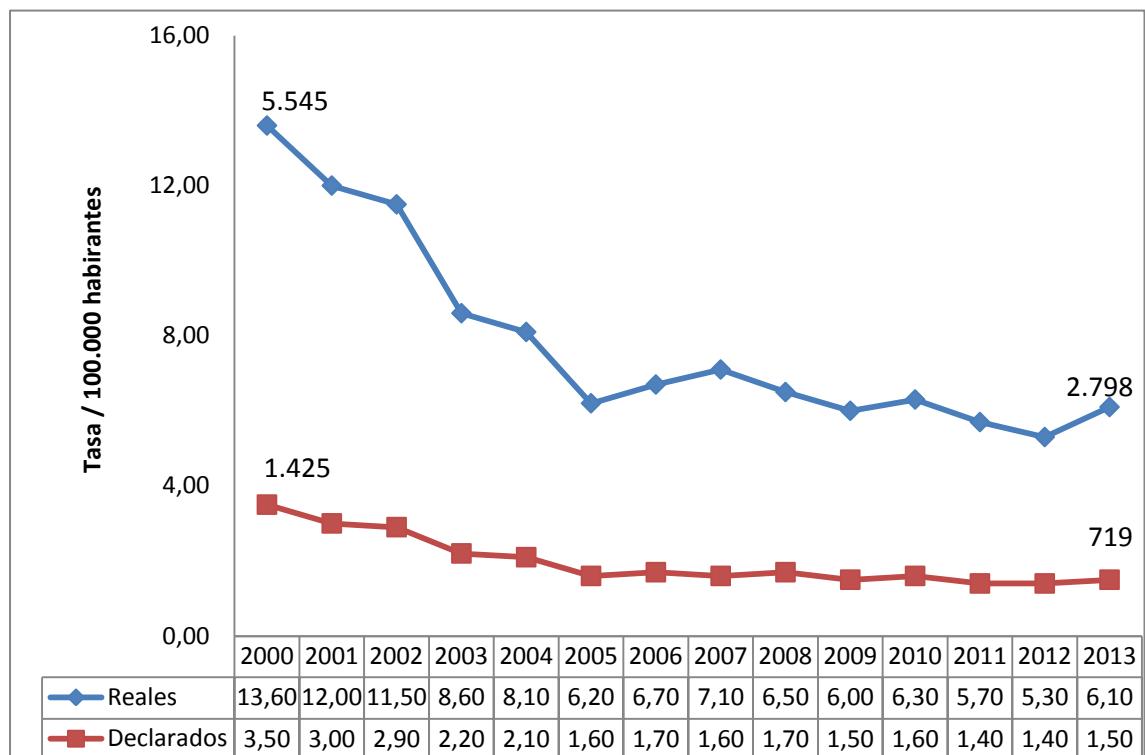


Figura I.6 - Incidencia VHC en España (76)

Según un estudio de *Arroyo Fernández y cols* (96) la infección está presente en el 10% de las muertes naturales en nuestro país, alcanzando casi un 40% en los presos españoles (97), y el 60% de las muertes relacionadas con el consumo de drogas. Se considera que la infección por VHC es la responsable del 50% de las muertes por cirrosis, el 70% de las derivadas por carcinoma hepatocelular (CHC) y el 20% de aquellas personas fallecidas en coinfección VIH/VHC (3, 98, 99). Además, según datos publicados por la Organización Nacional de Trasplantes, en 2013 un 30% de los trasplantes de hígado, lo que equivale a un 7,5% del total de trasplantes de órganos del estado, estuvieron relacionados con el curso de la infección (76, 100).

En números absolutos España se encontraría en el puesto 31 en cuanto a la clasificación global por número absoluto de personas con hepatitis C crónica (unas 700.00 personas), dicha clasificación lo encabeza China con más de nueve millones de personas infectadas (76, Figura I.7). En este sentido cabe

mencionar que España es el vigesimonoveno país más poblado del planeta con 46 millones de personas censadas en la actualidad.

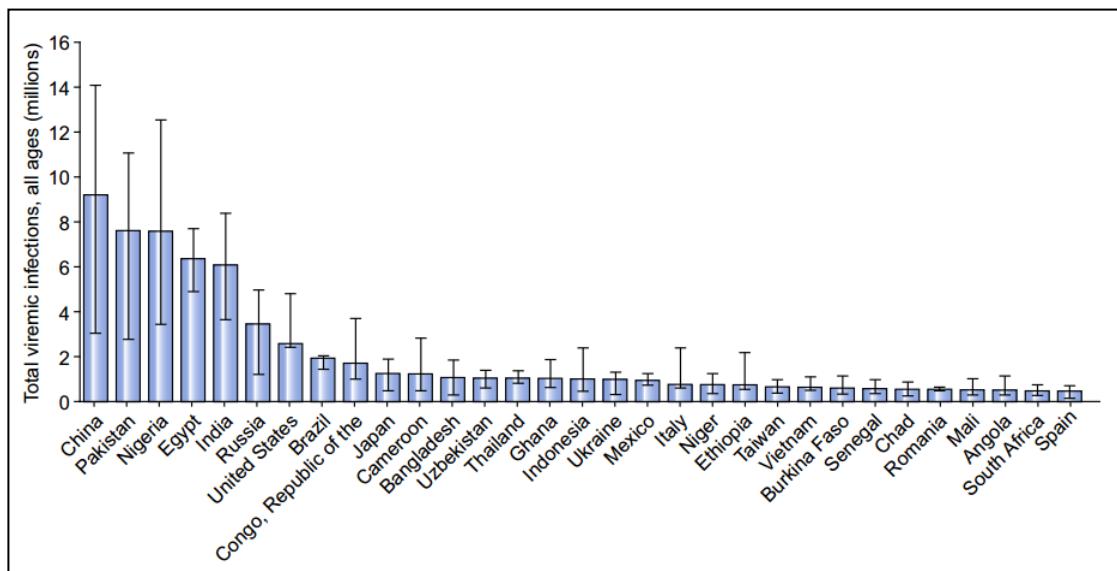


Figura I.7 - Ranking global por Nº Absoluto de personas con hepatitis C crónica (76)

En los datos epidemiológicos obtenidos en Aragón (Boletín del Sistema de Información Microbiológico de Aragón nº 17), un 65,2% de los casos registrados entre los años 2010-2014 fueron hombres con una diferencia estadísticamente significativa frente a las mujeres ($p<0,001$). Así mismo, la media de edad de los casos diagnosticados durante ese periodo ha sido de $49 \pm 13,4$ años (rango desde ocho meses a 91 años).

La transmisión de la infección puede suceder de diferentes formas, y podemos dividirla en parenteral y en no parenteral.

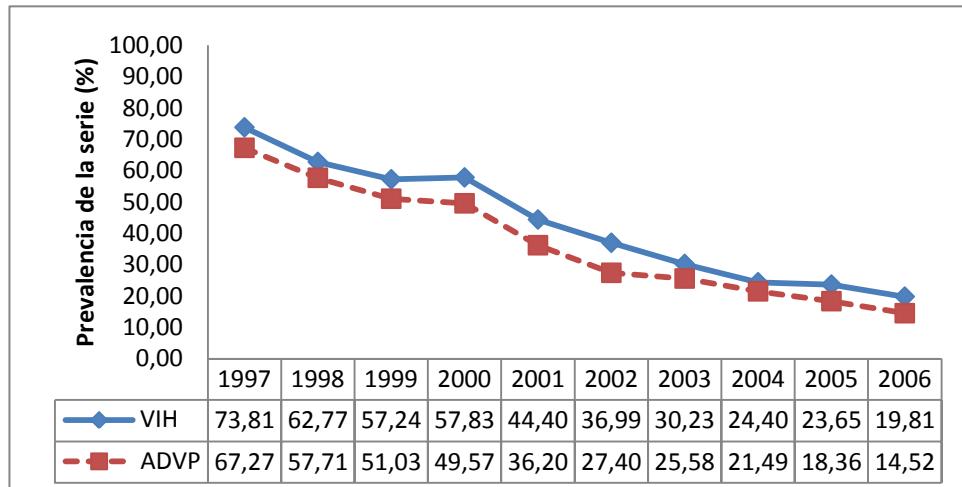
1.2.1 Transmisión parenteral

La infección se transmite fundamentalmente por esta vía. De hecho, el VHC es el agente causal de la mayoría de los casos de hepatitis postrasfusional “no-A, no-B” (101,102). Hasta que se empezó a realizar cribado de todos los productos hemoderivados previa a su transfusión, se calcula que un 2-10% de las transfusiones transmitían VHC hasta el punto de ser la vía responsable de un 25% de los casos actuales. Desde la implementación de dicho cribado este riesgo ha disminuido hasta ser

prácticamente nulo (0,1-2,3/1.000.000 donaciones) (103). Hoy en dia, según el informe de la OMS de 2011, aún hay 39 países donde los sistemas sanitarios no cuentan con los medios necesarios para garantizar la seguridad transfusional mediante el cribaje rutinario. El ejemplo mejor documentado de lo que supone un contagio asociado a un sistema sanitario lo encontramos en Egipto, donde la prevalencia del VHC llega al 25% en algunas regiones. Actualmente los factores de riesgo más significativos para la transmisión, basándonos en la prevalencia poblacional, son la adicción a drogas por vía parenteral (ADVP), la nosocomial y la práctica de tatuajes y piercings (1).

La ADVP es la forma más eficiente de transmisión de la infección, se calcula que la prevalencia dentro de la población de personas adictas a drogas por vía parenteral está en el 67% (1,104). En países subdesarrollados o de desarrollo medio, la mayor parte de las infecciones por VHC se dan en personas que utilizan material no estéril para inyectarse drogas o soluciones de medicamentos intra-venosos. Aproximadamente 16 millones de personas en 148 países consumen activamente drogas parenterales, de ellos, 10 millones se encuentran infectados por VHC (1). En los años 90, en países como EE.UU y Australia el 60% y el 80%, respectivamente, de las infecciones se relacionaban con la ADVP (101, 103).

En el caso de España el consumo de drogas por vía parenteral supone hoy en dia un 10% de los casos de infección y dentro de el grupo poblacional de personas ADVP se estima que un 80% de ellos está contagiado por el VHC. Esta situación ha experimentado una clara mejoría desde los años 90 gracias al descenso en el consumo de este tipo de drogas (descenso que no se ha experimentado del mismo modo en los países del Este de Europa). Dicho descenso está relacionado principalmente con las diversas campañas de concienciación del contagio del VIH, las cuales paralelamente han ayudado a reducir el contagio del VHC. En la gráfica inferior se muestra el descenso en la prevalencia del consumo de drogas por vía parenteral (línea de puntos) y el descenso paralelo de los casos de personas coinfecadas VIH/VHC (105, Figura I.8).



**Figura I.8 - Evolución de la prevalencia de consumo de drogas y personas
Coinfectadas VHC / VIH (105)**

Estudios más recientes sobre poblaciones no seleccionadas en EE.UU han demostrado que tan sólo el 17% de las infecciones por el VHC se asocian a ADVP, correspondiendo el mayor porcentaje (41%) a la práctica de tatuajes. Esta notable variación se relaciona con los cambios que se han producido en el estilo de vida en las últimas dos décadas. La probabilidad de que se produzca una infección por VHC cuando se realiza una perforación o un tatuaje es baja. Aún así, en los últimos años se ha extendido la práctica de realizar piercings en las zonas genitales, donde se puede multiplicar el riesgo de infección por este virus porque puede provocar heridas que faciliten el contagio si se tienen relaciones sexuales con una persona infectada.

Otras vías de transmisión parenteral menos eficientes son, la nosocomial (no transfusional) y la ocupacional. La transmisión nosocomial no transfusional ocurre sobre todo en unidades de hemodializados (106,107). La utilización de material no desechable (agujas intramusculares, acupuntura) ha sido la causa de transmisión de la infección hace más de tres décadas en Europa y Japón (108-110) y continua siendo una vía de contagio muy prevalente en Egipto (111,112). Excepcionalmente, se han descrito casos por realización de pruebas diagnósticas (colonoscopia) (113) o durante intervenciones quirúrgicas (114,115) y por trasplante de órganos (116,117). En el caso particular de España, un estudio reciente de Martinez-Bauer *et al* donde evalua los factores e riesgo que presentaban cifra en un 67% el porcentaje estimado de nuevos casos diagnosticados por VHC que están asociados a transmisión nosocomial

en un hospital terciario (93). Así mismo, en otro estudio, en este caso de Pérez-Álvarez *et al*, evaluaron un total de 131 casos de hepatitis aguda por VHC registrados entre 1989 y 2010, de los cuales un 40% podrían haber tenido un origen nosocomial (119).

Los accidentes con material contaminado no influyen significativamente en la adquisición de la infección. La prevalencia de la infección por el VHC no es mayor en trabajadores sanitarios que en la población general, se estima que el riesgo medio de contraer la infección por el VHC tras un accidente percutáneo es del 1.8 % (0-7%) (119-122), lo cual es un porcentaje intermedio entre el riesgo de contraer el VIH (0.3%) y el virus de la hepatitis B (30%). Los factores de riesgo para la transmisión ocupacional no están bien definidos aunque parecen estar relacionados fundamentalmente con lesiones punzantes por agujas huecas de grueso calibre (120,122).

1.2.2 Transmisión no parenteral

La transmisión no parenteral comprende principalmente vías de contagio de bajo riesgo como la transmisión perinatal y la transmisión sexual. El riesgo de transmisión perinatal es escaso. La proporción de transmisión vertical basada en una revisión de 77 estudios de cohorte con al menos 10 mujeres con serología positiva para el VHC está en el rango del 4-8% (123-125) y del 17-25% en mujeres con coinfección VIH/VHC. Se han descrito factores que incrementarán la posibilidad de transmisión vertical. A saber una carga viral superior a 10^6 UI/ mL implica un incremento de la frecuencia de contagio desde 3,9% a 14,3% o un parto con rotura de bolsa de más de seis horas también incrementará dicha frecuencia. No se ha demostrado que exista riesgo aumentado de transmisión perinatal relacionado con el parto vía vaginal (126-128), ni con la lactancia materna (129-131).

La frecuencia de transmisión sexual es baja, alrededor del 5%, comparado con la transmisión del VIH (15%) y de la hepatitis B (30%). El contagio en parejas heterosexuales estables es infrecuente (0,07% / año) (132,

133), lo es más en pacientes VIH y particularmente en varones que mantienen relaciones homosexuales, en quienes se ha observado un incremento de la prevalencia (134,135). Además del VIH, otros factores como el padecer una hepatopatía grave se han asociado con un mayor riesgo de transmisión sexual de la infección (136, 137).

Otra vía de contagio de menos relevancia hasta la fecha, pero descrita en numerosos estudios recientemente, es el consumo de drogas de administración intranasal. En este caso se ha descrito como vía de transmisión el uso compartido de dispositivos para el consumo de estas sustancias (138,139).

1.3 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Es importante hacer el diagnóstico de la infección activa por el virus de la hepatitis C, no sólo por su asociada mortalidad y morbilidad, sino también por la posibilidad de obtener una curación con respuesta virológica mantenida (tanto espontánea como inducida por fármacos) y por la prevención de su contagio. Aproximadamente 185 millones de personas en todo el mundo están infectadas por el virus de la hepatitis C, de los cuales entre un 15-45% aclarará la infección espontáneamente y el resto desarrollará una infección crónica (101,140,141). Entre los individuos que no aclaran la infección y en ausencia de tratamiento, un 15-25% progresará a un estadío final de enfermedad hepática (cirrosis) y riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma. Ambas situaciones pueden requerir un trasplante hepático.

En numerosos países, existe un acceso muy limitado a los test diagnósticos de VHC y eso hace que la enfermedad esté infradiagnosticada hasta que se manifiesta una cirrosis o un hepatocarcinoma.

Tanto el punto de vista sanitario, donde una respuesta viral sostenida se ha relacionado con una reducción sostenida de la inflamación hepática y de la fibrosis, como el punto de vista fármaco-económico, donde a medida que

avanza la enfermedad los costes por el cuidado de estos pacientes se incrementan exponencialmente, demuestran la imperiosa necesidad de un diagnóstico temprano de la infección activa por el VHC. De esta forma sería posible por un lado, instaurar un tratamiento adecuado y concienciar al paciente de la necesidad de desarrollar conductas saludables (como puede ser el reducir el consumo de alcohol) a tiempo de evitar la progresión de la infección, y por otro, informar a la persona infectada de los métodos para reducir el riesgo de contagio a personas de su entorno

Existen dos **métodos diagnósticos, directos** (métodos moleculares o virológicos) y **métodos diagnósticos indirectos**. Entre los métodos directos contamos con aquellos que determinan y cuantifican el ARN viral o, como es el caso del antígeno del core del VHC (Ag VHC), aquellos que detectan los componentes estructurales virales. Por otro lado entre los métodos indirectos tenemos aquellos que detectan los anticuerpos específicos del VHC.

La variedad de proteínas producidas durante el proceso de replicación del VHC produce una respuesta serológica muy variada frente a él. No ha podido encontrarse una relación precisa entre los diferentes patrones de respuesta inmune y el estadío biológico o clínico de la infección. Únicamente sabemos con certeza que los anticuerpos frente al core (antígeno c22-c) y NS3 (c33-c) son los primeros en aparecer en los cuadros de primoinfección. Dicho estadío biológico o clínico de la infección en cambio, sí que es posible averiguarlo mediante los métodos diagnósticos directos. Los análisis moleculares o virológicos detectan secuencias de ácidos nucleicos virales específicos (ARN-VHC) que indican presencia del virus en el momento del análisis (142). Los análisis de los Anti-VHC serán positivos en la mayoría de pacientes con infección por VHC pero los resultados del enzimoinmunoensayo para este parámetro pueden resultar negativos en el caso de pacientes con una hepatitis C aguda temprana o en pacientes inmunodeprimidos. Tras un aclaramiento inducido por tratamiento del VHC los Anti-VHC pueden persistir positivos en ausencia de ARN VHC pero con el paso del tiempo pueden llegar a desaparecer (143,144). Por ello, la Asociación Europea para el Estudio del

Hígado (EASL sus siglas en Inglés) recomienda combinar tanto métodos directos como indirectos para diagnosticar una hepatitis C aguda o crónica.

Aproximadamente un 50% de los pacientes con hepatitis C aguda presentarán Anti-VHC positivo en su diagnóstico. Para poder diferenciar su estadío agudo de uno crónico habrá que utilizar otra serie de parámetros clínicos (valores de transaminasas 10 veces por encima de su valor normal, ictericia), junto a descartar antecedentes de interés en la historia clínica tales como haber padecido otras hepatitis agudas o una historia de enfermedad hepática crónica así como exposiciones recientes a posibles fuentes de contagio. En todos los casos los métodos de diagnóstico directos resultarán positivos aunque pueden darse breves periodos durante los cuales la carga viral resulte indetectable.

El diagnóstico de una hepatitis C crónica se basa en la detección tanto de los Anti-VHC como del ARN VHC junto con la presencia de síntomas de hepatitis crónica tales como la elevación de las transaminasas o hallazgos histológicos. En aquellos casos de infección por VHC de reciente adquisición el aclaramiento espontáneo del virus es poco frecuente, nunca tarda menos de 4-6 meses tras la infección, por ello el diagnóstico de la hepatitis C crónica puede hacerse tras ese periodo (145).

Rutinariamente, los análisis serológicos se emplean usualmente para el cribado y el diagnóstico de primera línea, mientras que los análisis virológicos son necesarios para confirmar la infección activa o monitorizar la respuesta al tratamiento.

1.3.1 Diagnóstico inmunoserológico

Del 25% al 30% de los pacientes con infección aguda desarrollan síntomas, aproximadamente el 50-70% tendrán anticuerpos detectables en el periodo inicial, pero el 90% tendrán anticuerpos detectables después de tres meses. Los ensayos serológicos detectan una infección activa o pasada, pero no puede discriminar una infección crónica, aguda o resuelta. Los Anti-VHC

IgM pueden ser detectados en un 50-93% de pacientes con VHC aguda y en un 50-70% de los casos crónicos, por lo que no son un buen marcador de infección activa.

Caso aparte merecen los recién nacidos hijos de madres infectadas. En ellos, los anticuerpos maternos transmitidos pasivamente pueden mantenerse positivos de 12 a 15 meses, y extraordinariamente hasta los 18 meses. Para establecer un criterio de transmisión vertical deberían darse las siguientes situaciones (146,147):

- Detectar anticuerpos Anti-VHC durante más de 18 meses.
- Detectar ARN VHC en el niño entre los tres y los seis meses de edad.
- Detectar ARN VHC en el niño al menos en dos ocasiones.
- Confirmación del mismo genotipo entre la madre y el niño.

El riesgo de transmisión vertical se da en un 4-8% de nacimientos de madres VHC positivas y en un 17-25% de los nacimientos de madres coinfectadas VIH/VHC.

El enzimoinmunoensayo (EIA) es el método de elección para la detección de anticuerpos Anti-VHC; los EIAs que se usan actualmente son reactivos para aproximadamente el 99% de los individuos inmunocompetentes infectados (148). De todas maneras, la respuesta mediada por anticuerpos no se puede detectar hasta pasadas 4-6 semanas desde el momento de la infección, en el caso de los pacientes inmunocompetentes, y puede que no se detecte nunca, en el caso de los pacientes inmunodeprimidos. Por otro lado, los individuos que han aclarado el virus espontáneamente pueden mantener los anticuerpos durante mucho tiempo, incluso durante toda la vida (90). Los ensayos serológicos más nuevos dan unos porcentajes de falsos positivos o de indeterminados no despreciables. Los ensayos basados en inmunoblot recombinantes como RIBA y LIA se han utilizado como pruebas complementarias para confirmar la especificidad de las pruebas de cribado de anticuerpos pero están sujetas a las limitaciones de los ensayos serológicos y igualmente no distinguen entre la infección pasada y la infección activa.

El primer ensayo diseñado para el diagnóstico de la hepatitis C era un EIA que detecta anticuerpos Anti-VHC (14). Desde entonces se han desarrollado tres generaciones de EIA para la detección de anticuerpos frente a varios epítopos pertenecientes a la poliproteína codificada por el virus de la hepatitis C.

EIA de primera generación (EIA 1.0): Este ensayo detectaba anticuerpos frente a una única proteína antigénica recombinante (c-100-3), epítopo perteneciente a una pequeña porción carboxiterminal de la proteína codificada, en parte, por el gen NS2 y, en su mayoría, por el gen NS4 (14). La sensibilidad de este ensayo frente a población de alta prevalencia era baja (aproximadamente 80%) y se obtenían un 70% de falsos positivos en donantes de sangre (149). Este ensayo se caracterizaba por un amplio periodo ventana desde que se producía la infección hasta que se detectaban los anticuerpos. Esto llevó al desarrollo de un segundo ensayo más sensible y específico.

EIA de segunda generación: Éste incorporó antígenos adicionales no estructurales (33c) y estructurales (c22-3), proteínas que fueron aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) en 1992 (150). En algunos EIA comerciales los antígenos c33c y c-100-3 están combinados en una única proteína recombinante (c200), lo que permite aumentar la cantidad de antígeno presente en la fase sólida del ensayo. Estos ensayos detectaban un 20% más de casos que los ensayos de primera generación y detectaba anticuerpos entre 30 y 90 días antes (151). Se redujo el periodo de ventana de 16 semanas a 10. La sensibilidad de los EIA 2.0 en población de alta prevalencia es aproximadamente del 95% (basado en la detección de ARN por PCR). Se han descrito un 6% de falsos negativos en población coinfectada con VIH/VHC y este porcentaje se incrementa en poblaciones VIH con inmunodepresión más avanzada o en personas con infección por VHC temprana (152,153).

EIA de tercera generación (EIA 3.0): Fue aprobado por la FDA en 1996 y añade un cuarto antígeno (NS5 (154,155). Los EIA de tercera generación son aún más sensibles que los de segunda generación, aunque no siempre más específicos (156).

Desde el establecimiento cribado de donantes de sangre mediante EIAs primero de segunda y posteriormente de tercera generación prácticamente se ha eliminado la hepatitis C postransfusional, aunque continúan existiendo algunas limitaciones. Una de ellas es el intervalo entre infección y seroconversión (periodo ventana), que oscila entre nueve y 10 semanas para EIA 2.0 y entre seis y ocho semanas para EIA 3.0, lo que ha dado lugar a casos de hepatitis C postransfusional a partir de donantes infecciosos en periodo de ventana. Otro problema son los resultados falsos negativos en pacientes inmunotolerantes. Por último, también existen resultados falsos positivos o indeterminados en grupos de bajo riesgo como los donantes de sangre, que reducen el número efectivo de donantes.

1.3.2 Ensayos confirmatorios

La asociación de Anti-VHC por EIA-2 o EIA-3, en un individuo con un factor de riesgo percutáneo para infección por VHC, con niveles elevados de alaninoaminotransferasa (ALT) es indicativa de infección activa. En estos casos está indicada una prueba para detectar y cuantificar el ARN viral en suero antes de comunicar el resultado y establecer potenciales consejos terapéuticos. Para los donantes de sangre (bajo riesgo) o individuos sin factor de riesgo percutáneo y transaminasas normales, se han desarrollado ensayos suplementarios para confirmar la especificidad del resultado del EIA.

Como ya se ha comentado previamente, Chiron Corporation desarrolló un inmunoensayo en tira de nitrocelulosa para ayudar a diferenciar verdaderos positivos de falsos positivos obtenidos en los enzimoinmunoensayos. Posteriormente, en el año 1993, la FDA aprobó el inmunoensayo recombinante se segunda generación (RIBA). Los inmunoensayos en tira de nitrocelulosa incluyen los antígenos EIA, y además superóxido dismutasa humana (hSOD). Los antígenos recombinantes c-33-c y NS5 que se usan en el EIA se sintetizaron fusionando el antígeno con la hSOD. La hSOD se incluye para detectar anticuerpos no específicos. El RIBA es considerado positivo si hay reacciones con al menos dos antígenos con intensidades superiores o iguales

al control positivo débil y no hay, además, reacción frente a hSOD. Los RIBAs indeterminados se dan cuando hay reacción con un solo antígeno o cuando hay reacción frente la hSOD y en uno o más antígenos. El cambio de c100 a c22 como proteína recombinante, en la tercera versión del RIBA ha reducido significativamente el número de resultados indeterminados (157).

Otro inmunoblot basado en el mismo principio es en Line Inmuno Assay (Inno-LIA™, Innogenetics®, Gante, Bélgica), que incorpora antígenos de la región del core, de la región hipervariable de E2, la región NS3, NS4A, NS4B y NS5. En el caso del ensayo LIA, una muestra es positiva para anticuerpos Anti-VHC si al menos dos bandas de antígeno de VHC tienen intensidad ± o superior. Los LIAs indeterminados se dan en dos situaciones: Cuando únicamente una banda de antígeno de VHC tiene una puntuación 1+ o superior o si la banda NS3 reacciona con una intensidad ± o superior y todas las demás bandas de antígeno son negativas. Estudios recientes han indicado la necesidad de utilizar un método diagnóstico directo (ARN VHC o Ag VHC) en aquellos pacientes con resultado serológico positivo a los Anti-VHC e indeterminado en el ensayo confirmatorio (158).

1.3.3 Anticuerpos IgM Anti-VHC

Se desarrolló un método de enzimoinmunoensayo para la determinación de anticuerpos tipo IgM contra distintos antígenos virales en pacientes con infección aguda o crónica. La respuesta serológica de tipo IgM que se ha detectado de forma más consistente ha sido la dirigida contra determinantes antigenicos del core (159). No se ha podido demostrar una relación entre Anti-VHC IgM y hepatitis aguda C (160).

En cambio durante la infección crónica puede detectarse IgM Anti-VHC en el 75% de los casos y su nivel tiende a ser superior en pacientes con elevada carga viral. Durante el tratamiento antiviral con interferón, el anticuerpo se vuelve indetectable en los respondedores, reaparece en aquellos que recidivan y su nivel no cambia en los no respondedores. El porcentaje de

respondedores al tratamiento antiviral es mayor en los pacientes previamente IgM negativos (161). Por todo ello, la determinación de IgM Anti-VHC se propuso como un método indirecto para la monitorización del tratamiento, pero con la aparición de las técnicas moleculares de detección y/o cuantificación del ARN viral este método cayó en desuso por lo que finalmente fue retirado del mercado.

1.3.4 Técnicas para la detección y cuantificación de antígenos de VHC

Hay diferentes argumentos para considerar la proteína del core diana adecuada para el diagnóstico de la hepatitis C. En primer lugar, sus anticuerpos se encuentran en la mayoría de pacientes infectados por VHC, la secuencia de aminoácidos de la proteína del core es común en todos los genotipos y, por último, la presencia de anticuerpos frente al antígeno del core está relacionada con la replicación viral (162). A modo comparativo con la detección del ARN viral, éste es un método más sencillo de llevar a cabo gracias a que todo su proceso está automatizado, el escaso volumen que necesita (158 µl frente a 650 µl de la PCR en tiempo real) y rápido de llevar a cabo además de otras facilidades de su procedimiento.

Los primeros intentos para desarrollar una técnica para la detección de un antígeno del VHC se remontan al año 1992, la diana de estos ensayos era la proteína del core del VHC, que es la más abundante en el virión y cuyos epítopos se hallan bien conservados en los diferentes genotipos y además son bien conocidos.

En el año 1999 se publicó el primer método para la detección del antígeno del core de VHC en suero (163). Este método mostró ser capaz de detectar concentraciones de hasta 0.06 pg/mL de dicho antígeno recombinante, lo que equivale a una concentración de viriones de aproximadamente 500 copias/mL. También detectó infecciones por cinco genotipos diferentes (1a, 1b, 2b, 3a y 3c), las correlaciones obtenidas sobre muestras positivas por PCR

VHC fueron del 94.5-96%. Así mismo el método mostró no verse afectado por la presencia de anticoagulantes en la muestra (EDTA, heparina, citrato) ni de otras sustancias que pueden interferir en este tipo de ensayos, como la hemoglobina, el factor reumatoide, la bilirrubina y los lípidos.

Si se exceptúa el periodo de ventana de la infección aguda y las infecciones en pacientes inmunodeprimidos, las partículas virales de VHC circulantes coexisten en el suero del paciente infectado con concentraciones variables de anticuerpos específicos frente a sus distintas proteínas. Al disgregar los viriones para liberar los antígenos, estos vuelven rápidamente a formar inmunocomplejos con sus anticuerpos específicos (164). Y no es posible detectarlos si no se incluye algún componente que prevenga la formación de inmunocomplejos o algún procedimiento para destruirlos. El primer ensayo se desarrolló para uso en bancos de sangre con el objeto de detectar la infección por VHC en pacientes negativos con el ensayo que detectaba anticuerpos Anti-VHC (donantes en periodo de ventana) (165, 166, 167). Este primer ensayo descrito por Tanaka (168), no disponía de tratamiento de disociación de inmunocomplejos, por lo que era negativo en los pacientes que poseían los dos marcadores (Ag del core VHC y Anti-VHC) (169, 170).

El primer ensayo, posteriormente modificado por Aoyagi con la adicción en un paso de la disociación de inmunocomplejos, permitía la detección de antígeno, tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos Anti-VHC (171). El uso de una combinación adecuada de agentes detergentes durante el proceso de liberación del antígeno presente en la muestra permite inhibir la formación espontánea de inmunocomplejos en la medida necesaria para detectar los antígenos liberados de los viriones.

El actual ensayo de cuantificación del Ag del core del VHC (concretamente el desarrollado por Abbott) se trata de una evolución de aquel desarrollado por Aoyagi y entre sus ventajas encontramos el que posee buena especificidad (99,8%), es 25 veces más sensible que aquel primer ensayo diseñado en 1999 (172), es independiente del genotipo y ha mostrado una variación intra e interensayo inferior al 10% (172-174). Su sensibilidad analítica se ha establecido como 0,06 pg/mL o lo que es lo mismo 3,00 fmol/L (<3,00

fmol/L se consideran muestras negativas, >3,00 fmol/L se consideran positivas y muestras 3,00-10 fmol/L se consideran resultados en Zona Gris que deberían repetirse). Después de la infección por el virus de la hepatitis C la detección del antígeno del core se retarda de uno a dos días respecto a cuando el ARN viral se hace detectable (170,177). En este sentido también muestra una buena correlación con el ARN viral (173, 178), por lo que en definitiva algunos autores le atribuyen un papel como marcador fiable de la replicación viral (179).

A partir de la incorporación del paso de disociación de inmunocomplejos se han realizado diversos estudios sobre su posible aplicación en la monitorización del tratamiento con ribavirina e interferón (172, 173, 180, 181, 182, 183) y sobre su utilidad para determinar la respuesta temprana al tratamiento en pacientes infectados con el genotipo 1, a la semana 12 del inicio del mismo, tanto sin coinfeción por el VIH (182, 184, 185, 186) como coinfecados con el VIH (187).

Hoy en día, cualquier análisis molecular es más sensible que los análisis serológicos como por ejemplo en el caso del VIH (VIH ARN vs Ag p-24), pero aunque dicha sensibilidad sea inferior, estos test tienen un rol indiscutible tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la infección. Por citar un ejemplo, hay discrepancias entre estudios llevados a cabo sobre el *Citomegalovirus*. Por un lado hay algunos autores que indican la existencia de una mayor sensibilidad con la técnica de detección del antígeno viral pp65 en comparación con la PCR (188), mientras que otros concluyen lo contrario (189). De estas discrepancias se puede deducir que dada su relevancia clínica, ambas técnicas pueden resultar intercambiables en función del escenario en el que sean utilizadas, ya que ante un límite tan bajo de detección las diferencias a nivel clínico pueden resultar menos relevantes (190).

1.3.5 Diagnóstico molecular

Mientras que en Europa aún se utilizan técnicas confirmatorias de la presencia de anticuerpos anti-VHC (RIBA, LIA) como test confirmatorios en

pacientes Anti-VHC positivos, en Estados Unidos el CDC (191) ha cambiado sus recomendaciones en el cribado de pacientes. Lo ha hecho basándose en diversos estudios que muestran una elevada proporción de pacientes nuevos diagnosticados de la infección y que han experimentado un aclaramiento espontáneo del virus (192-195). Por ello, en aquellos pacientes diagnosticados *de novo* por presencia de Anti-VHC en suero, el CDC recomienda utilizar métodos de diagnóstico directos, concretamente moleculares, para confirmar la presencia de una infección activa.

Año de nacimiento	Anti-VHC + únicamente		ARN VHC positivo		Total	
	Nº casos	%	Nº casos	%	Nº casos	%
Entre 1945 - 1965	66.728	58,5	74.270	67,2	136.998	62,9
Otro año	44.481	41,5	36.276	32,8	80.757	37,1
Total	107.209	100,0	110.546	100,0	217.755	100,0

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Morb Mortal Wkly Rep 2013.

El diagnóstico molecular en el caso del VHC se basa en la detección del ARN del virus en la muestra clínica y se puede dividir en dos tipos: métodos cualitativos (sólo detectan) y métodos cuantitativos (detectan y además cuantifican).

Las pruebas cualitativas se utilizan para confirmar una infección activa por VHC en algunos pacientes seropositivos con resultados dudosos, para diagnosticar la infección en los seronegativos con alta sospecha (infección muy precoz) y en los pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos (196, 197). Las pruebas de detección cuantitativas de medición de carga vírica y la detección de los genotipos se usan para evaluar la enfermedad por VHC y para establecer un pronóstico sobre la eficacia del tratamiento y monitorizar la respuesta a éste.

La detección y cuantificación generalmente se realiza en muestras de suero y plasma, siendo muy importante una estricta y correcta manipulación de las muestras para obtener una buena rentabilidad. Deberían ser separadas de los hematíes en un plazo no superior a las cuatro horas tras la extracción de la sangre, para prevenir la degradación del ARN por las ARNasas endógenas. Se recomienda su rápida refrigeración y almacenamiento a -70°C para asegurar la

óptima estabilidad del ARN. Deben evitarse las sucesivas congelaciones y descongelaciones. El proceso de manipulación preanalítica (separación de sueros y alicuotado) es proclive a producir contaminaciones cruzadas entre muestras negativas y positivas, por lo que deben extremarse las precauciones, al ser técnicas de una gran sensibilidad.

Debido a que la cantidad de ARN viral en el suero del paciente es muy baja, se requiere un paso de amplificación de la diana, como la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, previa retro-transcripción (RT-PCR), o de la señal de detección, como el branched DNA (bDNA). Para la RT-PCR un paso de retro-transcripción convierte el ARN viral en ADN complementario (ADNc) que es utilizado como diana para la PCR (179). Los cebadores utilizados para la amplificación hibridan en la región 5'-UTR, que es la más conservada del genoma del virus (48).

1.3.5.1 Pruebas cualitativas

Las pruebas cualitativas informan de la presencia o ausencia de ARN del VHC, mediante la técnica de RT-PCR. La sensibilidad de la RT-PCR es muy alta, entre 50-700 copias de ARN viral/mL dependiendo de los sistemas. La especificidad es asimismo muy elevada. Inicialmente se utilizaron ensayos puestos a punto por cada laboratorio, pero en la mayoría de los centros se usan habitualmente métodos comerciales con diferentes desarrollos del proceso de automatización.

1.3.5.2 Pruebas cuantitativas

Para determinar la carga viral del VHC se han desarrollado diferentes ensayos cuantitativos basados en distintas tecnologías, que difieren en variabilidad, intervalo lineal, precisión y reproducibilidad. El más introducido ha sido la RT-PCR cuantitativa aunque también existen otros métodos como son el NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Assay), la tecnología de ADN ramificado (bADN) o el ADN Elisa. En los últimos tiempos se está imponiendo el uso de las técnicas que PCR en tiempo real de alta sensibilidad y precisión,

buena reproducibilidad y amplio intervalo de linealidad. Los resultados de los métodos comerciales están estandarizados en UI/mL.

1.3.5.3 PCR en tiempo real

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

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

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando están unidos al ADN de doble cadena. El más utilizado es el SYBR Green I. El principal inconveniente de este tipo de detección es su baja especificidad, ya que estos fluorocromos se unen indistintamente al producto amplificado, a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores.

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador o un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis TaqMan.

Su coeficiente de variación intra e interensayo es de 1 y 6,2% respectivamente. La sensibilidad puede detectar al menos 10 UI/mL (cuando los métodos convencionales de PCR poseen sensibilidades en torno a 600 UI/mL). Se han desarrollado sistemas comerciales automatizados (ver Tabla

1.6). La relación entre el nivel de fluorescencia y la carga viral se calcula mediante patrones de concentraciones de ARN del VHC ya conocidas (diluciones estándar). Finalmente, conociendo el nivel de fluorescencia de cada muestra y su relación con la carga viral, se calcula la concentración de ARN de la muestra que, como en el resto de técnicas moleculares, se expresa en UI/mL mediante la incorporación del estándar de la OMS.

Tabla I.6- Dispositivos comerciales disponibles de PCR en tiempo real para detección de ARN VHC (196)

Dispositivo	Casa comercial	Tecnología (diana)	ADIV	Rango de detección (UI/mL)	LMC (UI/mL)	LMD (UI/mL)
COBAS® Ampliprep/ COBAS® TaqMan ® v2.0 Test	Roche Molecular Systems	Real-time PCR, (5'UTR)	FDA, CE	15 a 1.00×10^8	15	15
COBAS® TaqMan ® for use with the High Pure System Test, v2.0			FDA, CE	25 a 3.91×10^8	25	20
Abbott RealTime VHC Test	Abbott diagnostics		FDA, CE	12 a 1.00×10^8	12	12
Versant VHC ARN Test, 1.0 (kPCR)	Siemens	Real-time PCR, (gen pol)	CE	15 a 1.00×10^8	15	15
Artus Hepatitis C Test (QS-RGQ)	Qiagen	Real-time PCR (Diana patentada)	CE	65 a 1×10^6	35	21

FDA: Food and Drug administration; CE: Comunidad Europea; LMC: Límite mínimo de cuantificación, LMD: Límite mínimo de detección, ADIV: Aprobado para diagnóstico *in vitro*.

1.3.5.4 Métodos para la determinación de genotipos

La **determinación del genotipo** es una prueba obligatoria en los pacientes a tratar, ya que como veremos más adelante, puede influir en la duración del tratamiento, y es el mayor factor predictivo de la respuesta al tratamiento. En función de la heterogeneidad genética, el VHC tiene seis genotipos y al menos 80 subtipos (198).

Para el tipado de VHC se han utilizado métodos serológicos (serotipado) y moleculares (genotipado). Los métodos moleculares son más sensibles que los serológicos y permiten la subtipificación de las cepas, por lo que son los que habitualmente se usan en los laboratorios (157, 199). Los métodos moleculares están basados en la amplificación de regiones específicas del genoma (core, NS4, NS5 y el extremo 5') son los más habituales, ya que aquí es donde se pueden localizar con mayor exactitud las diferencias que caracterizan a los distintos genotipos y subtipos. El más utilizado es el extremo 5'NC, es el que se utiliza de rutina en el laboratorio, ya que la mayoría de los métodos amplifican dicha región. Existe la opción de determinar la secuencia de nucleótidos de la cepa en cuestión, pero no es práctico en un laboratorio de diagnóstico clínico, por lo que se utilizan otras técnicas: el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la PCR con iniciadores específicos de tipo y el método comercial LiPA (Linear Probe Array, Innogenetics®, Gante, Bélgica). Hoy en día los sistemas moleculares de genotipado comerciales optan por utilizar una secuenciación directa de ARN (TRUGENE® VHC Genotyping Assay, Siemens Erlangen, Alemania) o secuenciación bi-direccional. En ambos casos tanto el genotipado como el subtipado se determina mediante dos *primer* ADN marcados con fluorescencia o mediante sondas tipo-específicas fijadas en una tira de nitrocelulosa (INNO-LIPA VHC II Genotype Test, Innogenetics®, Gante, Bélgica), capaces de detectar las regiones 5'UTR y Core simultáneamente mejorando así la caracterización del genotipo 1 (201). Por ello, el más utilizado en laboratorios asistenciales es el INNO-LIPA, detectando todos los genotipos conocidos y bastantes subtipos.

1.3.5.5 Técnicas para estimación de la complejidad de la población viral

Se han desarrollado varios métodos para estimar la heterogeneidad de la población viral menos complejos que la clásica clonación y secuenciación. Los principales son: análisis de desviación heteroduplex en gel (GSA), gel electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE) y análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP). Aunque son técnicas mucho menos sensibles que la clonación y secuenciación de múltiples clones, los resultados de los estudios llevados a cabo mediante éstas son similares a los basados en la clonación y secuenciación.

1.3.6 Evaluación del estado de lesión hepática

Una clasificación inicial permite diferenciar procedimientos invasivos (biopsia hepática, medición del gradiente de presión venosa hepática y endoscopia) y no invasivos (evaluación clínica, marcadores séricos, métodos radiológicos clásicos y métodos elastográficos) en la evaluación del estado hepático. Todos ellos presentan una aceptable precisión diagnóstica si bien ninguno de ellos está exento de inconvenientes. En la práctica, se debería disponer de diferentes alternativas para precisar el alcance de la fibrosis en pacientes con resultados no concluyentes a partir de una determinación aislada. La realidad es que la biopsia hepática ha sido y sigue siendo una herramienta fundamental en el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades del hígado (202, 203). La biopsia permite no solo llegar a un diagnóstico histológico, sino también excluir otras enfermedades y evaluar el grado de lesión (inflamación, fibrosis, esteatosis). La fibrosis hepática es, sin duda, la variable que más impacto tiene en el pronóstico de las enfermedades crónicas del hígado, ya sea de etiología viral (hepatitis crónica B y C) o provocada por otras causas (alcohol, enfermedades autoinmunes, metabólicas o colestásicas). La cuantificación de la fibrosis en la biopsia hepática se ha utilizado de forma frecuente para decidir el inicio del tratamiento de la hepatitis crónica C (fig.I.10) (204).

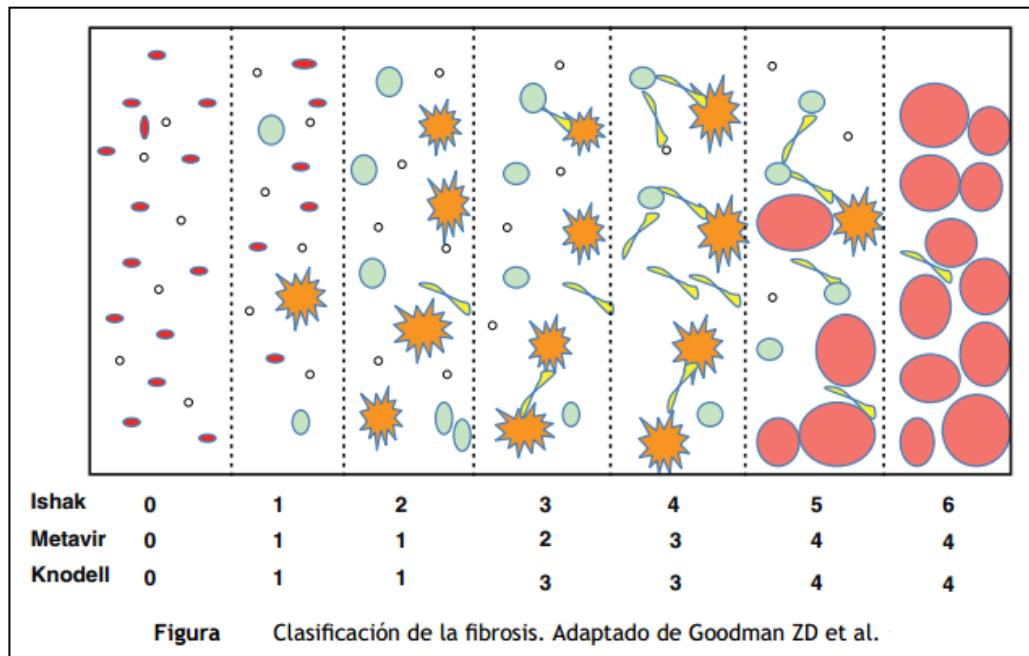


Figura I.10. Clasificación de la fibrosis. Adaptado de Goodman ZD et al (204)

Así pues, la presencia de una fibrosis que supera el espacio porta ($F = 2$ según la escala METAVIR o $F = 3$ según la escala de Ishak) se considera fibrosis significativa y, por tanto, tributaria de una intervención terapéutica (que en el caso de las hepatitis virales constituye el inicio del tratamiento antiviral). La evaluación de la fibrosis en la biopsia es semicuantitativa y controvertida por diferentes motivos. La principal razón es que el fragmento de tejido que se obtiene es muy pequeño y solo representa 1/50.000 partes del hígado. Por ello, es muy frecuente que la evaluación cuantitativa de la fibrosis sea inexacta, pudiendo clasificar de manera errónea hasta el 25% de las biopsias debido al error de muestra (205). Por otra parte, la cuantificación de la fibrosis en estadios depende de la clasificación utilizada. Las clasificaciones más complejas (Ishak) pueden identificar estadios intermedios no recogidos en clasificaciones más simples (Knodell o METAVIR) haciendo difícil comparar los estudios que no utilicen una misma clasificación (fig I.10)(204). Además, en aquellos casos en los que una segunda biopsia demuestra un incremento de la fibrosis, ni la cantidad de la fibra ni las consecuencias clínicas son proporcionales si comparamos los cambios que se producen entre estadios iniciales (de F0 a F1) o finales (de F3 a F4). Sin duda, la limitación más importante de la biopsia hepática es que se trata de una técnica invasiva asociada a un cierto grado de morbilidad. El dolor después del procedimiento es muy habitual (hasta el 80% de los pacientes) y, aunque con

poca frecuencia, a veces se asocia a complicaciones graves como hematomas (1/500 casos) o hemoperitoneo (1/2.500 casos) e incluso el fallecimiento (1/10.000 casos) (202). Estos aspectos han hecho que en estos últimos 10 años se hayan dedicado esfuerzos significativos a evaluar alternativas no invasivas para identificar la cantidad de la fibrosis y evitar la biopsia hepática (206).

Otro métodos invasivos alternativo a la biopsia hepática sería el cateterismo de venas suprahepáticas. Permite la valoración del grado de hipertensión portal de forma precisa y reproducible mediante la medida del gradiente de presión venosa hepática, y la realización de una biopsia transjugular. La utilización de un catéter provisto de un balón distal permite estimar los cambios circulatorios de una importante cantidad de parénquima hepático, lo que aumenta la fiabilidad de la técnica. Un valor de gradiente de presión venosa hepática superior a 10 mmHg implica un incremento del riesgo de descompensación en pacientes con fibrosis. Sin embargo, es una técnica invasiva que exige personal e instalaciones especializadas. Por último se dispone también de la técnica de endoscopia. Aunque estrictamente no es un procedimiento para la evaluación del grado de fibrosis, la endoscopia digestiva alta sigue siendo una herramienta esencial para la valoración de la presencia de varices esofágicas y gástricas, así como del riesgo de hemorragia. La Asociación Española para el Estudio del Hígado considera que todo paciente F4 debe tener una evaluación endoscópica (206b).

En cuanto a las técnicas no invasivas, como son la ultrasonografía o la tomografía computarizada y la resonancia magnética, únicamente pueden distinguir entre formas muy avanzadas de la enfermedad (cirrosis o F4) y el resto de estadios evolutivos. Por otro lado, los marcadores serológicos relacionados (directos) o no (indirectos) con el proceso de fibrogénesis han demostrado una capacidad aceptable para diferenciar pacientes con fibrosis significativa (F2-F4) de aquellos con ausencia o presencia de mínima fibrosis (F0-F1) (207). La cifra de plaquetas, la gammaglutamil transpeptidasa, las transaminasas, los valores de colesterol, la macroglobulina, la haptoglobina, los productos de degradación del colágeno y algunas enzimas encargadas de su

degradación como las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares son algunos ejemplos.

Además de los métodos serológicos, en los últimos cinco años se ha desarrollado una nueva técnica basada en la evaluación de la elasticidad hepática llamada elastografía transitoria (FibroScan®) (208). Esta técnica se basa en la medición de la elasticidad del tejido por ultrasonidos, midiendo la velocidad de propagación de una onda mecánica dentro del parénquima hepático. La técnica es muy sencilla (209). El aparato dispone de una sonda emisor-receptor que se coloca entre las costillas a la altura del hígado y que emite una onda mecánica corta de baja frecuencia. Esta onda de vibración se transmite dentro del parénquima hepático a una velocidad que depende de la rigidez del tejido, siendo más rápida cuanto más rígido es el tejido. La velocidad es detectada mediante ultrasonografía por la misma sonda y el software del aparato transforma la velocidad (m/s) en un valor de elasticidad (kilopascales o kPa). El volumen de tejido evaluado es un cilindro de aproximadamente 1 cm de ancho y 4 cm de longitud que se localiza entre 25 y 65 mm por debajo de la piel (dentro del hígado) y es cien veces superior al volumen evaluado con una biopsia. La elastografía ha demostrado una excelente capacidad para excluir la cirrosis y buena para identificar a los pacientes con diferentes estadios de fibrosis. La gran mayoría de estudios se han realizado en pacientes con hepatitis crónica C (210), pero también se dispone de información en hepatitis B, enfermedades hepáticas colestásicas, por consumo de alcohol, esteatohepatitis no alcohólica y hepatitis C postrasplante confirmando las buenas expectativas.

La indicación más aceptada del FibroScan® es básicamente la evaluación del estadio de fibrosis en las enfermedades crónicas del hígado (207, 210, 211). La técnica permite identificar con una buena fiabilidad aquellos pacientes con formas más avanzadas de la enfermedad (F2-F4) y, particularmente, la presencia de cirrosis hepática (F4). Dado que la gran mayoría de datos han sido generados en pacientes con hepatitis crónica C, su utilidad está bien establecida en esta enfermedad. Pese a que el número de estudios en otras enfermedades es más pequeño, la realización del

FibroScan® para identificar fibrosis avanzada o cirrosis en enfermedades colestásicas crónicas (cirrosis biliar primaria) (212) o en la recurrencia de la hepatitis C postrasplante hepático está también aceptada (213). A título de ejemplo, el Sistema de Salud Francés considera el FibroScan® como una herramienta diagnóstica en estas indicaciones y, de hecho, financia el coste derivado de su utilización.

A modo comparativo entre la biopsia y la elastografía transitoria se pueden hacer diversas consideraciones. El coste del aparato FibroScan® es de unos 60.000 euros, al que hay que anadir el derivado del mantenimiento anual de la sonda de unos 2.000 euros/año. El coste de una biopsia hepática es de unos 300 euros (rango mínimo), por lo que son necesarias unas 200 exploraciones para amortizar la inversión inicial (214). El hecho de que la prueba se pueda realizar por una enfermera en consultas externas es importante, dado que permite una fácil implementación pues no requiere un personal adicional para su realización. Entre las grandes ventajas de la elastografía transitoria están su rapidez (se puede obtener el resultado en unos cinco minutos), la facilidad de su uso y su reproducibilidad como han demostrado estudios en los que dos exploradores realizaban la técnica por duplicado (215). Como todos los métodos no invasivos, se puede repetir tantas veces como sea necesario y, por lo tanto, resulta muy útil para el seguimiento de los pacientes en la consulta externa. Un dato que se debe tener en cuenta es que al utilizar ultrasonidos como método de medición de la onda mecánica podría ser utilizada en mujeres embarazadas sin que ello suponga un riesgo ni para el feto ni para la madre (204).

En definitiva, según las guía de la EASL (145) se deben utilizar los métodos no invasivos para evaluar inicialmente la lesión hepática mientras que la biopsia hepática se debe reservar como método de referencia para evaluar pacientes con enfermedades añadidas (pacientes post-trasplante, enfermedades autoinmunes, etc) o con valores discordantes de los métodos no invasivos (marcadores séricos vs elastografía). En este sentido coincide la Asociación Española para el Estudio del Hígado, quien además, de forma global, realiza unas recomendaciones en el manejo de los pacientes infectados

por VHC. En primer lugar indica que se debe evaluar el estadio de fibrosis en todos los pacientes con hepatitis crónica por el virus de la hepatitis C (Nivel de evidencia A1). Profundizando al respecto, dentro de dicho grupo de pacientes, recomienda identificar a los pacientes con fibrosis avanzada (F3 y F4) dado que influencia de forma relevante el pronóstico, el tratamiento y el seguimiento (nivel de evidencia A1). (206b)

1.4 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN

La historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C ha sido muy difícil de definir puesto que la fase aguda es muy silenciosa y la infección crónica es asintomática durante los primeros años.

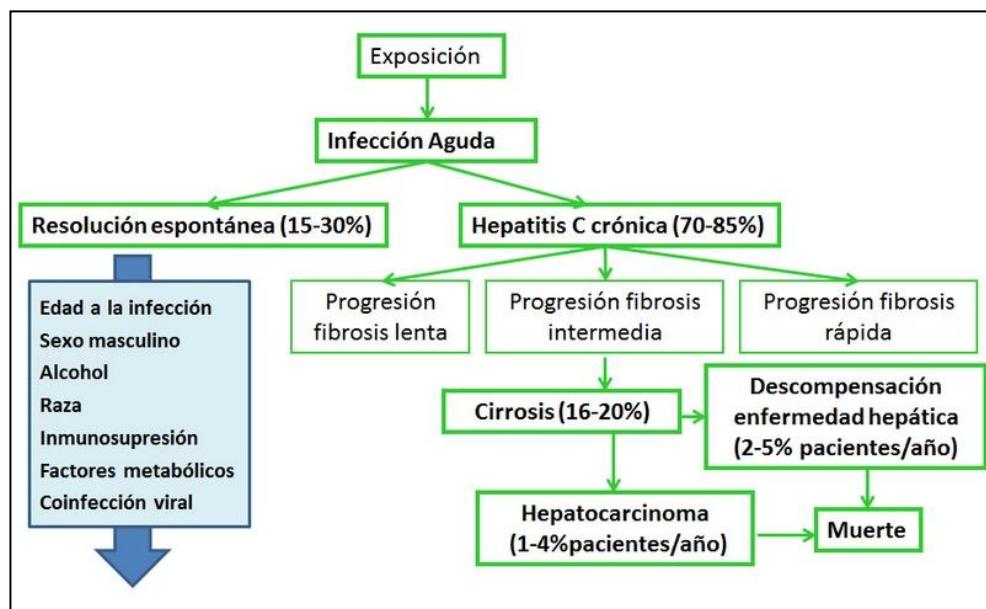


Figura I.11- Evolución de la infección y principales factores de mal pronóstico. (216)

1.4.1 Hepatitis aguda C.

Se define como hepatitis C aguda (HAC) la situación clínica con anticuerpos Anti-VHC, detección de ARN-VHC sérico, elevación brusca de los niveles de transaminasas (ALT) por encima de diez veces su valor normal y antecedentes de exposición previa al VHC durante las 2-12 semanas previas.

En la mayoría de los casos la hepatitis aguda C (HAC) cursa de un modo asintomático, por lo que se desconoce la incidencia real del cuadro. Se ha señalado una disminución de su incidencia gracias a la introducción de medidas como; el test de cribado para el VHC en los bancos de sangre, los programas del intercambio de jeringuillas en ADVP y la generalización del uso de material médico desechable.

La HAC evoluciona a infección crónica hasta en un 85 % de los casos. Entre aquellos que experimentan un aclaramiento espontáneo del virus, un 89% eliminará el virus dentro de las 12-24 primeras semanas después del diagnóstico.

Según *Martínez-Rebollar et al* el tratamiento, en su caso referido al interferón y ribavirina, se debe iniciar entre la semana ocho y la 12 tras el diagnóstico, si no se ha resuelto la infección. En cambio otros estudios indican que lo idóneo es esperar hasta los seis meses post-diagnóstico ya que empezar antes puede suponer que algunos pacientes que podrían aclarar el virus espontáneamente sean expuestos al tratamiento antiviral sin necesidad, y retrasarlo más disminuiría la eficacia. En el caso de tratarse de pacientes que desean recibir tratamiento o de que existiera riesgo de perdida para seguimiento o contagio se recomienda el uso del peginterferon a 12 semanas en pacientes monoinfectados y junto con ribavirina 12-24 semanas en pacientes coinfectados con VIH. En todos los casos, llegados a la semana 24, si el ARN VHC es positivo está indicado el tratamiento como una hepatitis crónica.

Las nuevas terapias desarrolladas son iguales para la hepatitis C aguda o para la crónica. Generalmente son bien tolerada y se alcanzan tasas de RVS que con los nuevos fármacos (AAD) alcanzan un 71-98 % en los pacientes monoinfectados con VHC. Se profundizará en cada uno de los fármacos en el apartado específico del tratamiento.

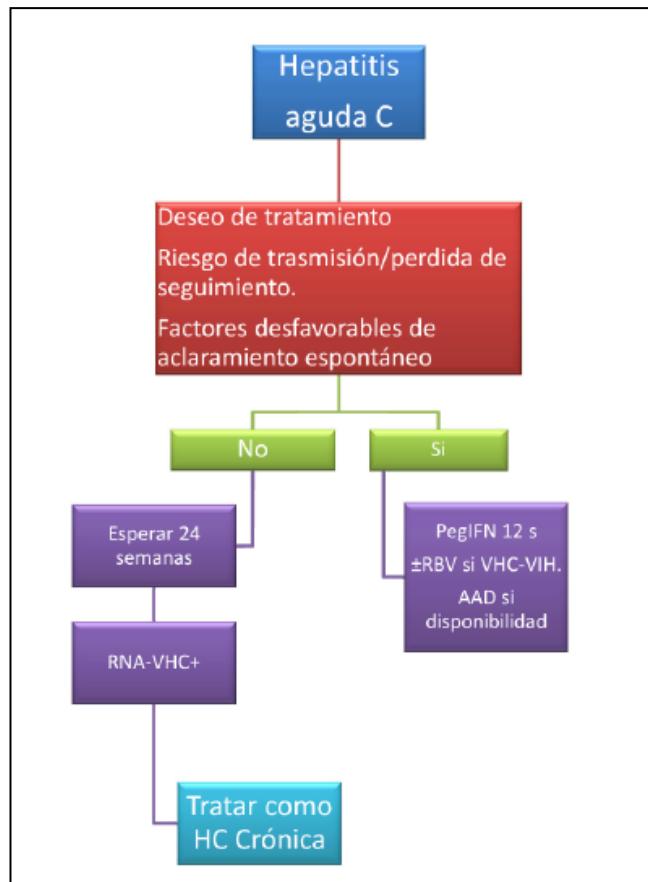


Figura I.12 - Algoritmo tratamiento previo a la aparición de AAD

En general, los pacientes con enfermedad sintomática, ictericia o síntomas pseudogripales, y los pacientes que presentan una disminución rápida de la carga viral parecen experimentar una mayor eliminación espontánea (106, 107, 109, 110).

El ARN es perceptible en el suero por PCR desde pocos días tras la infección mientras que los anticuerpos en suero no serán detectables hasta las 4-10 semanas de la exposición (periodo ventana). La elevación de las transaminasas se produce entre las dos y las ocho semanas de la exposición (intervalo 1 a 26 semanas), alcanzando valores 10 veces superiores al valor normal, aunque suele tener valores algo menores que los hallados en otras hepatitis agudas.

Respecto a la clínica, ocurre después de un periodo de incubación variable de 15 a 160 días (media siete semanas). Únicamente el 20-30 % de todos los pacientes que contraen la infección por el VHC presentarán clínica. Los síntomas prodrómicos son sistémicos y variables. La ictericia puede estar

precedida por anorexia, náuseas y vómitos, astenia, artralgias, mialgias, dolor de cabeza, fotofobia y faringitis, así como alteraciones del gusto y del olfato. El hígado aumenta del tamaño y puede haber dolor en hipocondrio derecho.

1.4.2 Hepatitis crónica por virus C, cirrosis hepática y hepatocarcinoma

Se considera hepatitis crónica por virus C a la persistencia de ARN-VHC sérico pasados los seis meses posteriores a la infección. Se ha relacionado el alto porcentaje de pacientes que cronifican, con la diversidad genética del virus y su tendencia a la mutación rápida, permitiendo al VHC escapar constantemente del reconocimiento inmune (217).

Por lo general, los pacientes con infección crónica están asintomáticos o tienen síntomas leves poco específicos como: astenia, malestar general, anorexia, molestias en el hipocondrio derecho de carácter leve, mialgias, artralgias y pérdida de peso. Los síntomas raramente incapacitan aunque si se ha destacado una disminución de la calidad de vida del paciente (218), que en parte está justificado por el conocimiento del diagnóstico (219).

La historia natural de la HCC ha sido difícil de definir a causa del largo curso de la enfermedad (220). Múltiples estudios han estimado que aproximadamente del 20 al 30% de los individuos con infección crónica desarrollan cirrosis entre los 10 y los 30 años posteriores. Dicho porcentaje difiere entre los estudios retrospectivos oscilando entre el 17 y el 55%. Sin embargo, y más cercano probablemente a la incidencia real, en los estudios prospectivos es del 7 al 16%. La infección no produce siempre una enfermedad progresiva. Poynard y cols. (221), en un estudio prospectivo en pacientes con infección crónica por VHC, estiman que el tiempo medio para el desarrollo de cirrosis fue de 30 años. Los autores diferencian tres patrones evolutivos: Fibrosantes lentos (31% de los pacientes), con un tiempo de progresión a cirrosis no menor a 50 años, Fibrosantes intermedios (36% de los pacientes), y Fibrosantes rápidos (33%) con un tiempo de progresión de menos de 20 años. En otro estudio, 184 mujeres infectadas tras recibir inmunoglobulina contaminada que no recibieron tratamiento, fueron sometidas a biopsia para la

valoración del grado de fibrosis. Durante el seguimiento posterior de más de 10 años, el 49 % no mostró cambios en el grado de fibrosis, el 24% una disminución y sólo el 27% presentó progresión (222, 223).

Aunque ningún signo, síntoma o prueba de laboratorio es determinante en el diagnóstico de cirrosis, algunos hallazgos en la exploración física y datos de laboratorios pueden sugerirlo. Diversos estudios han mostrado que el riesgo de progresión de la enfermedad a fibrosis avanzada o cirrosis en pacientes con transaminasas normales y fibrosis de grado 0 (ausencia de fibrosis) en la biopsia hepática es mínimo en 10 a 15 años. Este riesgo es del 5 al 10% en los que tienen transaminasas elevadas con ausencia de fibrosis y se eleva hasta entre el 30 y el 40% en aquéllos con transaminasas elevadas y fibrosis 1 (fibrosis portal) en la biopsia. La existencia de cifras elevadas de ferritina, presente en el 20-35% de los pacientes con infección crónica por VHC, se asocia con un aumento de los depósitos de hierro de forma leve a moderada en el 10-35% de los casos, y es de localización principalmente sinusoidal (224-226). Este depósito de hierro en tejido hepático no se ha correlacionado sin embargo con un mayor estadio de fibrosis (226). Puede existir una elevación de la bilirrubina sérica (40%), hipoalbuminemia (10%) y trombopenia asociada a esplenomegalia. La alfafetoproteína (AFP) puede estar elevada ligeramente en la infección crónica y no implica necesariamente la presencia de CHC ni cirrosis. Hasta el 43% de pacientes con cirrosis tienen cifras de AFP entre 10 y 100 ng/mL (226). No obstante, una concentración elevada de AFP requiere una prueba de imagen para descartar la existencia de CHC. Una elevación persistente y progresiva de AFP puede ser indicio de malignidad oculta.

Entre el 1 y el 4% de los pacientes con cirrosis desarrollará por año un carcinoma hepatocelular (CHC) (227), sin embargo el VHC es el causante de un tercio de los CHC (228). A menudo la supervivencia se ve marcada no tanto por la existencia del tumor, sino por el deterioro de la función hepática y la aparición de complicaciones.

Las complicaciones están limitadas en su mayor parte a pacientes que han desarrollado cirrosis, aunque no todos los pacientes con cirrosis las desarrollan. Las complicaciones más frecuentes son la ascitis, seguida por el

sangrado de varices esofágicas y la encefalopatía (226, 229). Se presentan en un 3.9 % por año.

La supervivencia de un paciente con cirrosis está comprometida. Las tasas de supervivencia en pacientes con cirrosis compensada son el 92-96%, 83-91% y 79% a los 3, 5 y 10 años (226,228). Tras la aparición de descompensación las tasas descienden al 57% y 50% a los tres y cinco años respectivamente. Cuando se presentan las complicaciones el único tratamiento eficaz es el trasplante hepático suponiendo un 30% de los trasplantes hepáticos llevados a cabo en España (2). La supervivencia postrasplante del VHC es de 60-80%, semejante al resto de causas que llevan también a fracaso hepático.

La infección crónica por VHC está además involucrada en el desarrollo de algunos procesos extrahepáticos. Según diferentes estudios, entre el 40 y el 74% de los pacientes con HCC pueden presentar al menos una de estas manifestaciones en el curso de la enfermedad (230), e incluso en ocasiones puede ser la primera expresión de esta. Estas manifestaciones extrahepáticas se dan a nivel de diversos órganos o sistemas:

- A nivel hematológico: Crioglobulinemia mixta esencial, púrpura trombocitopénica idiopática, linfoma no Hodkin de células B.
- A nivel endocrino: Disfunción tiroidea (hipotiroidismo e hipertiroidismo), diabetes.
- Renal: Glomerulonefritis
- Dermatológico: Porfiria cutánea tarda, liquen ruber plano, eritema nodoso, eritema multiforme, malacoplaquia, síndrome de Behcet, urticaria, vasculitis cutánea necrosante, prurito, psoriasis.
- Salival: Sialoadenitis.
- Ocular: Úlcera corneal de Mooren.
- Diversos: Uveítis, fibrosis pulmonar y vasculitis pulmonar, cardiopatía hipertrófica, poliarteritis nodosa, síndrome antifosfolípido y anticuerpos anticardiolípina, artritis seronegativa.

Se han tratado de identificar una serie de factores que condicionan una mayor velocidad en el desarrollo de la fibrosis. Estos factores pueden ser propios del huésped o del propio virus.

Factores dependientes del paciente:

- Sexo masculino (231).
- Producción de citocinas profibrinogénicas (TGF β 1, angiotensina II) (232).
- Edad superior a 40 años (233).
- Co-infección con VIH o VHB, u otra forma de inmunosupresión subyacente (232,234-237).
- Consumo de alcohol (231): promueve la replicación viral y acelera el daño hepático a dosis mayores de 50 g/día, e incluso con dosis moderadas de alcohol en pacientes con esteatosis (238-240)
- Consumo diario de cannabis (241).
- Obesidad. Resistencia insulínica (231).
- Contaminantes ambientales (231).
- La respuesta inmunitaria celular específica frente al VHC parece influir en la severidad de la afectación; sin embargo, su papel en el daño hepático no está totalmente aclarado (43b, 242). Diferentes genes en varias subregiones del HLA modulan la respuesta inflamatoria (243).

Factores dependientes del virus:

Inicialmente, varios estudios sugerían la asociación entre una carga viral alta o la infección por el genotipo 1 y una enfermedad más agresiva. Estas dos asociaciones parecen estar descartadas en la actualidad. Con respecto a la carga viral, la mayoría de estudios transversales no han demostrado que exista una correlación entre niveles altos de viremia y mayor grado de actividad (231). De hecho, pacientes con transaminasas normales y escasa actividad histológica en la biopsia pueden presentar niveles altos de viremia.

En cuanto al efecto del genotipo, los estudios más recientes no han confirmado la asociación sugerida entre el genotipo 1 y mayor evolución a

cirrosis y hepatocarcinoma. Probablemente la duración más larga de la enfermedad en los genotipos 1 frente a los genotipos no 1, permite explicar las diferencias entre los estudios (231). La alta capacidad mutagénica del virus y su compleja composición en cuanto a cuasiespecies parece ser lo que le permite escapar al sistema de vigilancia inmunológica del huésped y hacer progresar la enfermedad. La heterogeneidad en las cuasiespecies también se ha relacionado con un mayor daño hepático (231), habiéndose observado una menor variabilidad entre aquellos pacientes infectados que resuelven la infección y una alta variabilidad genética en aquellos que evolucionan hacia HCC grave. Aun así, se necesitan más estudios para definir el papel de las cuasiespecies en la historia natural de la hepatitis C.

1.5 TRATAMIENTO

Hasta el momento en España, no ha habido una estrategia nacional que considere la infección por VHC un problema de salud pública. Se estima que tratar a un paciente con cirrosis compensada cuesta menos de mil euros anuales, a un paciente con cirrosis descompensada con múltiples ingresos en hospitales supera los 10.000 euros anuales y el coste medio de trasplantar a un paciente estaría en unos 100.000 euros. Por ello, el mejor tratamiento contra esta infección es la prevención de la enfermedad avanzada mediante un diagnóstico temprano y la utilización de terapias más efectivas que las conocidas hasta ahora.

La pauta de tratamiento para la infección por el virus de la hepatitis C en los últimos años, recomendado por las guías de consenso europeas, americanas y española, está basada en la administración del interferón- α pegilado (PegIFN) junto con rivabirina (RBV) durante 24 semanas en los genotipos 2 y 3 y de 48 semanas para el resto de genotipos (203, 244-247). Sin embargo, dicho tratamiento presenta una eficacia muy limitada; sólo un 40-50% (246,248) de los individuos infectados con genotipo 1, el más prevalente en el mundo, alcanzan una respuesta virológica sostenida (RVS). Además del

genotipo viral, la coinfección por VIH también modifica las tasas de respuesta (250) siendo para pacientes monoinfectados de aproximadamente 55-60% (251,252) y para pacientes coinfectados del 28-40% (253,254). Además, está asociado con efectos adversos importantes como son la depresión y la anemia que muchas veces son limitantes para iniciar tratamiento, de hecho, está contraindicado en personas con problemas neuropsiquiátricos o cirrosis descompensada. Para aquellos pacientes que ya han fracasado con PegIFN-RBV, el mantenimiento de esta terapia o estrategias de retratamiento incrementando el tiempo de duración no han demostrado ser efectivas.

En este escenario, el desarrollo de los antivirales de acción directa (AAD) junto con la implementación de estrategias de salud pública, augura un futuro esperanzador en la batalla contra esta enfermedad. En ese escenario, los datos epidemiológicos y de la historia natural de la enfermedad sugieren claramente que todos los pacientes debieran ser tratados. Muchos argumentos sustentan esta afirmación. Por una parte se reduciría notablemente el reservorio de virus, foco a partir del cual se producen nuevas infecciones, y por tanto es el único sistema que permitiría considerar la posibilidad de erradicar esta infección. En segundo lugar se eliminaría la necesidad de atención médica de estas personas, con el ahorro que esto comportaría, y finalmente porque un tratamiento eficaz eliminaría la carga de angustia que padecen los pacientes, incluso los afectados por formas menos graves de enfermedad, al ser conocedores de que la infección puede poner algún día en riesgo su vida.

Los AAD se dividen en tres grupos en función de su diana terapéutica:

- I) Inhibidores de la proteasa: La nomenclatura de todos ellos finaliza con el sufijo “-previr”. En este grupo encontramos los AAD que más tiempo llevan en el mercado como son el boceprevir, telaprevir y simeprevir así como de reciente autorización como el paritaprevir. En otro grado de desarrollo existen otros aún en diferentes fases de estudio, faldaprevir, asunaprevir, vaniprevir, grazoprevir o danoprevir por citar algunos de los más avanzados en sus estudios.

- II) Inhibidores de la proteína NS5A: Los fármacos de este grupo van siempre acompañados del sufijo “-asvir”. Los primeros fármacos de este grupo han sido autorizados para su comercialización recientemente, daclatasvir, ledipasvir y ombitasvir. Otros en estudio son el samatasvir, elbasvir o el ACH-3102.
- III) Inhibidores de la ARN polimerasa NS5B: Por su parte los compuestos con esta diana terapéutica finalizarán su nombre con el sufijo “-buvir”. Dentro de este grupo se diferencian dos subgrupos en función de su analogía con los nucleósidos.
 - a. Dentro del subgrupo de los inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósidos encontramos el recientemente autorizado sofosbuvir así como dos más en estudio, mericitabina o el VX-135.
 - b. En cuanto al subgrupo de los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósidos tenemos el recientemente autorizado dasabuvir junto con otros no tan avanzados como el VX-222, el ABT-072 o el setrobuvir, por citar algunos.

1.5.1 Objetivos del tratamiento

El objetivo principal del tratamiento es erradicar la infección por VHC y conseguir la denominada Respuesta Virológica Sostenida (RVS), definida como ARN del VHC indetectable en suero por PCR a los seis meses de finalizar el tratamiento. El seguimiento de estos enfermos con RVS durante tres a 11 años ha revelado que el ARN-VHC en sangre sigue siendo negativo en el 97-99% de los casos (255,256).

Los beneficios a largo plazo de la RVS son evidentes y se ha demostrado que va seguida de mejoría de las lesiones histológicas hepáticas, que a largo plazo se traduce en una disminución del número de hepatocarcinomas y en la reducción de la mortalidad de causa hepática (257).

1.5.2 Factores predictivos de RVS pre-tratamiento

Las tasas de RVS son heterogéneas y se ven influidas por un amplio número de factores (258). Se han realizado múltiples estudios para el análisis de los factores que influyen en la respuesta con PegIFN y RBV (246, 252, 259-263).

El genotipo y la coinfección con el VIH junto con el grado de fibrosis y la carga viral basal son los principales marcadores de RVS (246, 251, 252, 260, 261, 263-268). Otros factores de menor impacto son la edad, el sexo, la raza, el índice de masa corporal (IMC), la resistencia insulínica, la concentración de proteínas totales y la esteatosis hepática (246, 251, 252, 260-267, 269-271),

En los últimos tiempos se están realizando muchos estudios clínicos para identificar y estratificar a los pacientes que estén más predisuestos a responder al tratamiento así como desarrollar nuevos y mejores agentes terapéuticos, tanto en pacientes infectados con VHC como en coinfectados por VIH. Los trabajos de investigación en este campo se basan en ver la variabilidad en “genes candidatos” que codifican elementos llave en la respuesta inmune antiviral (272). En este sentido, hasta la fecha, se han identificado y descrito principalmente dos polimorfismos con gran poder predictivo en la respuesta al tratamiento frente al VHC. Uno es dependiente del paciente, el gen de la interleukina 28B, el otro es dependiente del virus, la mutación Q80K en su proteasa NS3.

1.5.2.1 Polimorfismos dependientes del paciente

Se han publicado numerosos estudios sobre la asociación de varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que se localizan dentro o en las inmediaciones de los genes que codifican para la familia del IFN-λ (dentro de dicha familia se encuentra la interleukina 28 y sus dos isoformas IL-28A e IL-28B), los cuales se han asociado con la eliminación espontánea del VHC y con la respuesta al tratamiento del VHC. Los SNP constituyen el cambio de una base en puntos bien localizados de nuestro ADN.

El gen IL28B codifica la interleukina 28, también conocido como interferón (IFN) lambda tipo III (IFN-lambda-3). La IL28B, junto con el IL28A y IL29, participan en la respuesta antiviral de forma sinérgica con el interferón tipo 1 (tales como el interferón-á), aunque usando receptores distintos. Entre todas juegan un papel en la modulación y resolución de los procesos víricos. Cuando dichos procesos afectan a un organismo, se observa un aumento en la expresión de los genes que las codifican, dicho aumento presumiblemente estará inducido por estas infecciones víricas (273,274).

En los últimos años se han hecho estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) (272-275). En estos estudios se investiga un gran número de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) distribuidos a lo largo de todo el genoma en pacientes infectados por VHC, que han recibido tratamiento para posteriormente comparar entre “respondedores” y “no respondedores”. Aunque los polimorfismos encontrados siguen una distribución esperada normal, destacan siete de ellos con un orden de magnitud mayor que si hubieran ocurrido simplemente al azar. Entre estos trabajos, es importante el realizado por Ge *et al* (276) que identifica los polimorfismos rs12979860 y rs8099917 (3 Kb y 8 Kb por encima del gen codificador de la IL28B) como de gran influencia en la respuesta al tratamiento.

- La presencia de dos nucleótidos C/C en el locus del polimorfismo rs12979860 correlaciona con un ratio dos veces mayor de aclaramiento viral espontáneo el virus de la hepatitis C (VHC) y con una mejor respuesta al tratamiento con interferón y ribavirina, en pacientes con genotipo 1 del VHC, respecto a los otros genotipos posibles C/T y T/T, que no presentan relevancia clínica hasta la fecha.

- Los individuos con dos copias del alelo T (genotipo TT) para el SNP rs8099917 se asocian fuertemente con eliminación natural del VHC. Similar al patrón rs12979860, los genotipos TG o GG son menos sensibles al tratamiento.

Polimorfismo IL28B y genotipo viral:

El efecto de los SNPs de IL28B se ha observado principalmente en los pacientes infectados por VHC con genotipo 1 y 4, conocidos como malos respondedores. Así, los pacientes que poseían el alelo C en estado homocigoto (haplotipo CC) en rs12979860, presentaron una tasa de respuesta virológica sostenida (RVS) aproximadamente dos veces superior a la que presentaron los pacientes que presentaban un haplotipo CT y casi tres veces superior a la que presentaron los pacientes homocigotos para el alelo T (TT). Por otro lado, en la mayoría de estudios existe una clara relación entre el genotipo IL28B favorable y una mayor reducción en los niveles de ARN del VHC durante las primeras semanas de tratamiento en los pacientes infectados por los genotipos 1 y 4 del VHC (277).

Sin embargo, estas diferencias no se observan en los pacientes infectados con VHC de los genotipos 2 y 3, que presentan una alta probabilidad de respuesta al tratamiento. Parece que, globalmente, en pacientes infectados por estos genotipos, los polimorfismos de IL28 tienen poco poder predictivo, excepto en el subgrupo de pacientes, relativamente numeroso, que no presentan una respuesta excelente ya desde el inicio del tratamiento. En estos pacientes, la presencia de un genotipo IL28B favorable aumenta sustancialmente la probabilidad de presentar una RVS.

Polimorfismo IL28B y etnia

Estudios ya publicados sobre el tratamiento de la infección crónica por VHC han demostrado diferencias notables en la respuesta al tratamiento antiviral entre grupos raciales o étnicos diferentes, destacando la poca eficacia en la eliminación espontánea del virus y en la respuesta al tratamiento en pacientes afroamericanos. Los estudios de IL28B entre pacientes de diferentes grupos étnicos, muestran una distribución diferente de los genotipos de IL28B, apuntando a considerar que las prevalencias en este *locus* podrían explicar, en parte, las discrepancias raciales en las tasas de RVS y resolución espontánea de la infección (276, 278).

También se han encontrado diferencias en la cinética viral durante las primeras semanas de tratamiento. En el estudio de Clark *et al* (279) se observó que el efecto en la respuesta al tratamiento se mantuvo en caucásicos, afroamericanos e hispanos, en quienes las diferentes frecuencias del alelo protector contribuyeron en gran medida a la disparidad racial de la respuesta global al tratamiento. Sin embargo, incluso en afroamericanos con el genotipo rs12979860 CC, la cinética viral fue más lenta y las tasas de respuesta viral rápida (RVR) y respuesta viral sostenida (RVS) fueron menores siendo esta raza un predictor negativo de respuesta al tratamiento.

Dada la importancia creciente de los polimorfismos mencionados, se han desarrollado técnicas comerciales para su detección. Por ejemplo, Roche ha puesto en marcha una técnica para el estudio del rs12979860 (PCR a tiempo real en el LightCycler).

1.5.2.2 Polimorfismos dependientes del virus infectante

Las resistencias a los nuevos AAD están producidas por la selección de mutaciones en diferentes posiciones de la dianas terapéuticas, es decir, proteasa NS3, polimerasa NS5B y proteína NS5A. (280-283). Cada compuesto o familias terapéuticas muestran una mutación específica responsable de las resistencias y una barrera genética de diverso grado frente a dichas mutaciones. Del mismo modo, estas mutaciones parecen tener diferente prevalencia según el genotipo/subtipo de virus infectante. Las resistencias cruzadas entre compuestos de la misma familia afecta principalmente a los inhibidores de la proteasa NS3 y los inhibidores NS5A.

Mutaciones responsables de resistencias a los inhibidores de la proteasa NS3

La proteasa VHC es un heterodímero que se ubicará en el retículo endoplásmico de los hepatocitos infectados tras la combinación de las proteínas virales NS3 y NS4. Ésta última actúa como cofactor de la proteasa. El sitio catalítico (donde se unirá el sustrato de la enzima) de la

serin-proteasa NS3-4A del VHC está flanqueado por una triada de los aminoácidos serina-histidina-aspartato. La zona catalítica de esta proteasa está ubicada en un surco superficial donde permite una fácil unión del sustrato pero no así de los inhibidores lo cual ha dificultado el desarrollo de esta familia de compuestos (280). Hoy en día, los inhibidores de proteasa actuales, tienen la capacidad de efectuar una unión estrecha con la región catalítica de la enzima con tan solo unos pocos puntos de interacción. Por ello, únicamente unas mutaciones específicas que afecten a esas zonas de unión a la región catalítica podrán conferir resistencia frente a ellos. (281, 284-286).

Las resistencias a nivel los inhibidores de proteasa de primera generación (boceprevir, telaprevir) se han caracterizado por seleccionar mutaciones en las posiciones 36, 54, 55, 155, 156, y 170. Dicha resistencia depende de los subtipos de cada genotipo (280-286). Los pacientes infectados por VHC subtipo 1a suelen seleccionar mutaciones en las posiciones 36 y 155. En cambio los pacientes con VHC 1b habitualmente seleccionarían mutaciones en las posiciones 54, 55, 156 y 170. Además de las posiciones donde se dan estas mutaciones, la diferencia en el patrón de resistencia de uno y otro subtipo se explica por el número de cambios de nucleótidos necesarios por ejemplo en la posición 155 en el genotipo 1a y en el 1b. En esa posición el genotipo 1b necesita un cambio de dos nucleótidos para presentar resistencia (R155K: CGG a AAG) mientras que 1a necesitará solo un cambio de nucleótido (R155K: AGG AAG). Esta diferencia en el número de mutaciones necesarias para conseguir un patrón genético de resistencia explica por qué los pacientes con VHC 1b presentan una mayor barrera genética a las resistencias que aquellos con el subtipo 1a. (280-287).

En diciembre de 2013 la FDA aprobó el uso del simeprevir en el tratamiento para el VHC en pacientes con genotipo 1 y supuso una segunda oleada para los inhibidores de proteasa de primera generación. Esta segunda oleada incluye agentes con una mayor potencia y una dosificación mejorada pero con unos perfiles de resistencia similares a

boceprevir y telaprevir (288). Así mismo, mientras que los inhibidores de proteasa de la primera oleada son activos principalmente frente al genotipo 1, los de la segunda oleada lo son frente a todos los genotipos, excepto el 3. Esto es debido a la presencia natural del polimorfismo D168Q que le confiere resistencia frente a todos los inhibidores de proteasa disponibles (288). Tanto los inhibidores de proteasa de la primera oleada como los de la segunda se caracterizan por presentar una baja barrera genética frente a resistencias y ciertas resistencias cruzadas. (287).

Se ha propuesto que el término inhibidores de proteasa de “segunda generación” se utilice con compuestos que presenten un perfil de resistencia mejorada, como así lo hacen algunos de los que ahora están en estudio o recientemente aprobados (por ejemplo paritaprevir/ribavirina (ABT-450) o grazoprevir (MK-5172)) (289). Recientemente, se han publicado resultados de un ensayo clínico en fase 2 donde se mostraban resultados prometedores con la terapia basada en el grazoprevir llegando a tasas de RVS entre el 89-100% en pacientes con genotipo 1 (290).

Importancia del polimorfismo Q80K

La prevalencia de polimorfismos naturales asociados a resistencias en el VHC ha sido evaluada en tratamientos con pacientes naïve. Se estimó que <1% de la población estudiada mostraba mutaciones en los codones 36, 155, 156 o 168, mientras que cambios en los residuos 54 o 55 fueron observados en un 3-7% de los pacientes. En cambio, en el caso del polimorfismo Q80K, la frecuencia con la que se observó oscilo entre un 19-48% de las secuencias de la proteasa NS3 en el genotipo 1a (288, 291-293).

Estudios *in vitro* han mostrado que el polimorfismo Q80K reduce la susceptibilidad al simeprevir pero no a otros de segunda oleada, como el sovaprevir, asunaprevir o faldaprevir. Estudios *in vivo* han confirmado estos resultados. El ensayo clínico en fase II ASPIRE evaluó el impacto

del Q80K en la respuesta virológica al tratamiento con simeprevir (294). Aquellos pacientes infectados con el genotipo 1a que presentaban en polimorfismo Q80K mostraban un descenso significativo en la tasa de RVS frente al simeprevir (100mg/día), en comparación con los pacientes sin el Q80K (22% frente al 70% respectivamente). Sin embargo, un incremento en la dosis de Simeprevir, hasta los 150mg/día, demostró ser suficiente para lograr una tasa de RVS similar indiferentemente de la presencia del Q80K (Q80K 61% vs No Q80K 66%). Las tasas de RVS fueron más bajas para el subtipo 1a que para el 1b (63% vs 80% respectivamente), al igual que lo observado con otros inhibidores de la proteasa. La presencia del Q80K no afectó a las tasas de RVS frente a sovaprevir en el genotipo 1, tras aplicar una pauta de tratamiento de 28 días en combinación con PegIFN y ribavirina (295). Así mismo, no se apreciaron cambios en la RVS a las 12 semanas frente al faldeprevir en un ensayo clínico en fase II donde se utilizaba un tratamiento combinado con PegIFN y ribavirina (75% RVS en pacientes sin Q80K frente a 82% en pacientes con Q80K) (296). Los ensayos clínicos en fase III QUEST-1 y QUEST-2 que evaluaban la seguridad y eficacia del simeprevir en combinación con PegIFN y ribavirina en pacientes infectados por VHC genotipo 1 refinaron la concepción que se tenía sobre el impacto del Q80K en las tasas de RVS del simeprevir. Comparando pacientes infectados con VHC 1a sin Q80K se observaron tasas más bajas de RVS entre aquellos pacientes con Q80K (58% frente a 84% respectivamente) (297). Estudios recientes han definido por lo menos dos clados (ramas del árbol filogenético) para el subtipo 1a que muestran una distribución geográfica y una prevalencia del polimorfismo Q80K diferente. El clado 1 se observa frecuentemente en secuencias NS3 de VHC en Estados Unidos y se asocia con una elevada prevalencia del Q80K (48,9%) mientras que el clado 2 es más frecuente en secuencias de VHC detectados en Europa y presentan una menor prevalencia del Q80K (298,299). Estas teorías han sido corroboradas recientemente con datos de estudios en fase IIB/III (PILLAR, ASPIRE, QUEST-1, QUEST-2 y PROMISE) que mostraron una prevalencia superior de Q80K entre las

secuencias de la proteasa del subtipo 1a de Norte América comparados con los de Europa (48,1% vs 19,4%) (300).

Las últimas actualizaciones de las guías para el tratamiento de la hepatitis C crónica (AAS 2014) recomiendan realizar un cribado de resistencias mediante la detección del polimorfismo Q80K en pacientes con el subtipo 1a, de cara a considerar tratamientos alternativos al simeprevir si esta mutación es detectada.

Otras mutaciones menos estudiadas

Se han descrito otra serie de mutaciones que afectarían a la sensibilidad de los inhibidores de proteasa en menor medida que el Q80K pero que están menos investigadas. Algunas de ellas que afectan a la mayoría de los fármacos (V36A/M, T54A/V/S, R155T/K, A156S/T/S/V, V170A/T/L), otras afectan a los inhibidores que poseen en su estructura ketoamida, que forma un enlace covalente reversible con el núcleo catalítico de serina de la proteasa (Ej. boceprevir y telaprevir), y otras mutaciones (D168V/A/T/H, A156S/V), y otras que afectan a los inhibidores de proteasa que se unen de forma no-covalente (Ej. faldaprevir).

A continuación se enumeran las principales mutaciones conocidas que provocan un descenso en la sensibilidad frente a los nuevos AAD:

Principales mutaciones conocidas:

- **Mutaciones conocidas que afectan a los inhibidores de proteasa:**
 - Q80K, R155T/K, V36A/M, T54A/V/S, V55A, A156T/S/V, D168V/A/T/H, V170A/T/L.
- **Mutaciones que afectan a los nucleósidos inhibidores de polimerasa**
 - S282T

- **Mutaciones que afectan a los no-nucleósidos inhibidores de polimerasa**
 - C136Y/N, S365T/A, M414T/L, L419M/V, M423T/I/V, Y448C/H, I482L/V/T, M494I/A, P495S/L/A/T, P496A/S, V499A.
- **Mutaciones que afectan a los inhibidores de NS5A**
 - M28T, Q30H/R, L31M/F/V, P32L, Y93C/H/N.

1.5.3 Factores predictivos de RVS durante el tratamiento

Se han establecido tres tipos de respuesta; bioquímica (normalización de transaminasas), virológica (negativización del ARN-VHC) e histológica (mejoría de al menos dos puntos del grado de actividad histológica), pero en los últimos tiempos, la determinación de la respuesta se ha centrado en la determinación virológica. En función de la evolución de la carga viral se podía identificar la respuesta del paciente al tratamiento (respuestas identificadas en base al tratamiento convencional con interferón pegilado combinado con ribavirina) y pronosticar su curación o persistencia tras el mismo. El método de elección para identificar el ARN-VHC es la PCR cuantitativa y, en especial, la que permite detectar como mínimo 50 UI/mL. La técnica de referencia es la PCR a tiempo real.

Tabla I.7- Respuestas al tratamiento frente a VHC

Respuesta al tratamiento	Significado
Respuesta viral sostenida (RVS)	Ausencia de ARN-VHC en plasma (<50 UI/mL) 24 semanas después de completar el tratamiento
Respuesta viral rápida (RVR)	ARN-VHC indetectable en la semana 4.
Respuesta viral precoz o temprana (RVP):	<p>a) Completa: Niveles indetectables en la semana 12 del tratamiento.</p> <p>b) Parcial: ARN-VHC detectable en la semana 12 del tratamiento, pero con una reducción $\geq 2 \log_{10}$, con negativización de la viremia en la semana 24.</p>
Respuesta viral al final del tratamiento (RVF)	Carga viral indetectable al final del tratamiento.
Fracaso viral primario (FVP):	Descenso de la carga viral $\leq 2 \log_{10}$ en la semana 12 o carga viral detectable en cualquier concentración en la semana 24.
Recidiva o fracaso viral secundario (FVS):	Reaparición de ARN-VHC en las 24 semanas posteriores a finalizar el tratamiento.

En resumen, los factores predictivos de respuesta a los diversos tratamientos utilizados actualmente (301, 302, 303) serían los expuestos en la Tabla I.8.

Tabla I.8 - Factores predictivos de respuesta al tratamiento

Factores previos al tratamiento	Factores durante el tratamiento
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Factores virales:</u> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Genotipo viral (según tratamiento utilizado) ➢ Carga viral del VHC baja ➢ Polimorfismos VHC (Q80K) ▪ <u>Factores en relación con la enfermedad hepática.</u> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Menor grado de fibrosis <3. ➢ No coexistencia de otras enfermedades. ▪ <u>Factores en relación con el paciente.</u> <ul style="list-style-type: none"> ➢ edad <40 años. ➢ Raza blanca. ➢ IMC <27. ➢ Sexo femenino ➢ alelo TT del locus del gen IL28B ▪ <u>Tratamientos previos.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Respuesta virológica rápida.</u> (semana 4 ARN-VHC negativo) ▪ <u>Respuesta virológica temprana.</u> (semana ocho ARN-VHC negativo o descenso $\geq 2 \log$) ▪ <u>Adherencia al tratamiento.</u> (en el caso de la terapia convencional, el porcentaje de RVS se incrementa en más de un 10% en aquellos pacientes que son capaces de recibir más del 80% de las dosis de peginterferon y ribavirina durante más del 80% del tiempo de tratamiento).

1.5.4 Fármacos para el tratamiento de la hepatitis C

La terapia para combatir la infección por el virus C ha cambiado notablemente en los últimos años ya que numerosos tratamientos nuevos han sido aprobados recientemente. En ese sentido podemos dividir los diferentes tratamientos en dos grupos: Por un lado aquellos utilizados históricamente y que englobaremos dentro de la terapia convencional y por otro los considerados antivirales de acción directa (AAD).

1.5.4.1 Terapia convencional

La terapia convencional hace referencia a la pauta de medicamentos utilizada hasta ahora y engloba dos fármacos, el interferón y la ribavirina.

Interferón α Pegilado (PegIFN)

El interferón fue empleado por primera vez en monoterapia en el tratamiento de pacientes con hepatitis crónica ““no-A, no-B”” de origen postransfusional en 1986 (304) con tasas de RVS del 8-5 %. El interferón- α es un agente inmunomodulador que actúa sobre la expresión de genes de acción antiviral, generando una respuesta antiviral de amplio espectro (305). Concretamente actúa sobre receptores de membrana de los hepatocitos, causando la transcripción de múltiples complejos interferón-ARNm que salen del núcleo y codifican para proteínas que a su vez alteran el metabolismo celular e interfieren con la replicación viral y la síntesis de proteínas, inhibiendo de esta forma la replicación del VHC (306).

A partir del año 1994 comienza el empleo de RBV en el tratamiento combinado (307). Esta combinación llevó las tasas de RVS globales al 35-43 % (308, 309). La presencia de más de un 60 % de fracasos se relacionó con la corta vida media del interferón (8-10 horas), con fluctuaciones en las concentraciones séricas y aparición de mutantes.

En el año 2000, con la unión del polietilenglicol a la molécula de interferón se logró reducir la velocidad de absorción y el aclaramiento renal y celular, consiguiendo un aumento de su vida media y de su biodisponibilidad, sin pérdida de su actividad biológica, traduciéndose en un aumento significativo de la tasa de RVS. Actualmente, están comercializados dos interferones pegilados, uno basado en interferón α -2b, unido a una cadena lineal de polietilenglicol de 12 kD (Peg-Intron®, Schering-Plough Corporation), y otro en interferón α -2a, unido a una cadena ramificada de 40 kD (Pegasys®, Roche Pharmaceutical). En ambos casos, su prolongada vida media permite administrarlos en una sola dosis semanal por vía subcutánea. Las dosis recomendadas en el adulto son de 180 μ g/semana (252), independientemente

del peso corporal del paciente. La dosis del PegIFN α -2b debe ajustarse al peso, de modo que se administren 1.5 μ g/kg/semana (185).

Ambos PegIFN son relativamente seguros aunque no están exentos de efectos adversos como; síndrome pseudogripal que es el efecto adverso más frecuente, y desaparece habitualmente en 36-48 h.

Los cambios en el estado de ánimo, sobre todo la depresión que afecta a un 20-45 % de los pacientes en tratamiento, siendo su detección precoz y el inicio de tratamiento antidepresivo importante para mejorar la calidad de vida del paciente, su cumplimiento terapéutico y, en último término, la tasa de RVS.

La neutropenia aparece en un 20% de los tratados y se controla si es preciso, disminuyendo la dosis de IFN. Se recomienda disminuir la dosis cuando el recuento de neutrófilos es menor de 750/ μ L y suspender el tratamiento cuando el recuento absoluto es menor de 500/ μ L. El uso de factores estimulantes de colonias de granulocitos (Filgastrim) se ha ensayado con resultados satisfactorios en pacientes coinfecados con VIH y trasplantados que reciben tratamiento frente VHC (310).

La trombocitopenia es menos frecuente, generalmente no se asocia a cuadros hemorrágicos y obliga a menos modificaciones y abandonos excepto en pacientes cirróticos con hiperesplenismo. La disminución de la dosis de interferón se recomienda cuando las plaquetas descienden por debajo de 50000/ μ L y la suspensión del tratamiento cuando alcanzan las 25000/ μ L.

Se han descrito alteraciones en la función tiroidea durante el tratamiento con interferón, tanto hipotiroidismo como hipertiroidismo, este último reflejando en ocasiones una exacerbación de una tiroiditis autoinmune y en otras apareciendo *de novo*. El hipotiroidismo no obliga a suspender el tratamiento, pero sí el hipertiroidismo, y las concentraciones de hormonas tiroideas han de controlarse con frecuencia a lo largo del tratamiento.

En el estudio de *Lee Brunners et al* (311) el 14 % de los pacientes tuvieron que suspender el tratamiento por efectos secundarios, de los cuales los hematológicos fueron los más frecuentes (37%), sobre todo por neutropenia

(el 50% de los casos). Por efectos generales y subjetivos (25%), seguido de efectos neuropsiquiátricos (22%) y cutáneos (13%). Dos pacientes (3%) presentaron alteraciones tiroideas, ambos presentaron hipertiroidismo, uno de ellos precisó tratamiento sustitutivo por desarrollo posterior de hipotiroidismo.

Aunque las dos formas de IFN difieren en su farmacocinética, no está claro que estas diferencias tengan implicaciones clínicas importantes. Los ensayos realizados hasta el momento no encuentran diferencias en la actividad antivírica entre ambas fórmulas de PegIFN (288), pero sí han encontrado diferencias en la tasa de efectos adversos con repercusión clínica y sobre la calidad de vida, siendo mayor en los tratados con PegIFN α -2b (312, 313). Además, un metaanálisis de 12 estudios comparativos de PegIFN α -2a y α -2b (314), mostró una mayor tasa de RVS con PegIFN α -2a respecto al α -2b. A pesar de esto, las guías publicadas hasta 2009 (es decir, previas a la comercialización de los antivirales de acción directa) (315-317), recomendaban indistintamente el uso de los dos tipos de PegIFN en combinación con RBV como tratamiento de elección.

Ribavirina (RBV)

Es un análogo de nucleósido con un amplio espectro de actividad antiviral. Es de administración oral y tiene una buena tolerancia. Se ha utilizado frente a otros virus ARN como el virus respiratorio sincitial (VRS). Aunque su mecanismo de acción no está completamente definido, se han descrito varios efectos como la inhibición de la inosina monofosfato deshidrogenasa a través de la depleción de los niveles intracelulares de trifosfato, la inhibición del extremo no codificante 5' del ARN, la inhibición de la ARNm-guanililtransferasa y con ello la síntesis de ARN vírico, y ARN-polimerasa, la alteración del balance entre citocinas proinflamatorias (Th1-like) y antinflamatorias (Th2-like) (318), y la inducción de mutaciones en el ARN (319). Da lugar además a una disminución de la infectividad (320).

La RBV en monoterapia se ha empleado en la hepatitis crónica por VHC en múltiples ensayos, demostrando una disminución del nivel de aminotransferasas, una mejoría histológica moderada durante el tratamiento

(321) y una disminución de los niveles de ARN-VHC, pero es ineficaz para la eliminación total del virus. (322-325) La ausencia de respuesta sugiere que tiene un valor limitado en monoterapia. Su empleo inicial, junto al interferón convencional, mejoró considerablemente las tasas de RVS (260, 261), pero la reducción de dosis o la suspensión de su administración empeora dichas tasas (327).

Las dosis administradas repartidas en dos tomas, son de 800 mg para los genotipos 2 y 3, y 1000-1200 mg/día ajustadas por peso, para el resto de genotipos (328). El ajuste de dosis de RBV en función del peso es un factor que mejora las tasas de RVS (329,330), incluso se ha podido objetivar que la mayor concentración de RBV a la semana 4 era considerado un factor predictivo de RVS (331).

Aunque es un fármaco bien tolerado, las reacciones adversas al medicamento (RAMs) descritas asociados al tratamiento son; hemólisis, astenia, depresión, insomnio, vértigo, anorexia, congestión nasal, tos y prurito (323, 332-334). La anemia con niveles de Hb <10 g/dL requiere la reducción de dosis y sucede en el 10 al 15 % de pacientes. Es un efecto reversible tras la suspensión. Las medidas a tomar son, reducción progresiva de dosis de 200 mg, a partir de los 10 g/dL y suspender el tratamiento con RBV si no se consiguen mantener niveles superiores a 8.5 g/dL (10 g/dL en cardiópatas). Como consecuencia de la hemólisis se puede producir un aumento de moderado y reversible de la bilirrubina y del ácido úrico que no requiere ajuste de tratamiento.

La RBV es teratógena y se pueden encontrar concentraciones en gónadas hasta seis meses después de finalizado el tratamiento. Por esta razón, es imprescindible una contracepción eficaz.

Además de en embarazo y lactancia, la terapia convencional está contraindicada en pacientes con:

- Hipersensibilidad al principio activo.
- Hepatitis autoinmune, u otras enfermedades autoinmunes no controladas.

- Enfermedades malignas.
- Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) grave.
- Disfunción hepática grave o cirrosis descompensada.
- Recién nacidos y niños de hasta tres años.
- Antecedentes de cardiopatía grave, incluida la cardiopatía inestable o no controlada durante los seis meses previos.
- Trastorno psiquiátrico grave no controlado.
- Enfermedad cerebrovascular.
- Adicción activa a drogas o alcohol.

Desde 1986, la monoterapia con IFN constituía el tratamiento para los pacientes con hepatitis C crónica y se obtenían tasas de alrededor del 8-9%. La posterior introducción de la terapia combinada con RBV fue un gran avance en el tratamiento, consiguiéndose RVS de alrededor del 30% en pacientes con genotipo 1 y del 65% en genotipos 2 y 3. En el 2000, la introducción del PegIFN en la terapia junto con RBV mejoró mucho las tasas de RVS, siendo para PegIFN α 2a 43% (335) y para el PegIFN α 2b del 36% (336). Este porcentaje de RVS varía con la frecuencia de los distintos genotipos, siendo en el estudio de Hadziyannis *et al* (246) del 63 %. Si diferenciamos por genotipos, las tasas de erradicación son del 40 % para el genotipo 1, 60 % el genotipo 4, 70 % en el genotipo 3 y 80 % en el genotipo 2.

Hasta la fecha, momento en el que se está definiendo con mayor precisión los escenarios de utilización de los nuevos AAD (a medida que los tratamientos son más eficaces, seguros y mejor tolerados), ha constituido el tratamiento estándar con una duración de 24 semanas para genotipos 2 y 3, y de 48 semanas para el resto de genotipos.

Los pacientes que no han respondido o que han recidivado tras recibir tratamiento previo con interferón convencional o pegilado asociado a RBV constituyen una población que ha ido incrementándose en los últimos años y que plantea importantes problemas terapéuticos. Mayoritariamente, está integrada por sujetos infectados por el genotipo 1, habitualmente con alta carga viral y muchos de ellos con lesiones de fibrosis avanzada o cirrosis.

En el momento actual son varios los fármacos en fase de ensayo y recientemente comercializados, con diferentes mecanismos de acción, de los que algunos aún son empleados en combinación con la terapia actual. La aparición de resistencias se ha descrito tras el empleo en monoterapia, sin embargo, su uso en combinación con PegIFN y RBV se ha traducido en mejoras significativas en la actividad antiviral. También en ensayo se encuentran fármacos homólogos de la RBV con mayor potencia y/o menores efectos secundarios (viramidina, levovirina, merimepodib-VX 497, taribavirina) así como nuevas moléculas de interferón como el albuferón o el albinterferón α -2b (337).

1.5.4.2 Agentes Antivirales de Acción Directa (AAD)

Los avances en el conocimiento molecular del ciclo de replicación del VHC, han permitido el descubrimiento y desarrollo de diferentes moléculas que bloquean de forma específica proteínas del VHC que son claves para su replicación. Estas moléculas se conocen con el nombre de AAD (Agentes Antivirales de Acción Directa) e incluyen principalmente a inhibidores de la proteasa NS3, polimerasa NS5B y de la proteína NS5A.

Las principales características de las distintas familias están recogidas en la Tabla I.9.

Tabla I.9	Inhibidores de la proteasa NS3	Inhibidores de la polimerasa NS5B AN	Inhibidores de la polimerasa NS5B NAN	Inhibidores de la NS5A
Actividad genotípica	Los de 2 ^a generación son activos frente a todos menos G3 G1 (G1b > G1a)	Todos los genotipos	G1 (G1b > G1a)	Todos los Genotipos G1 (G1b > G1a)
Barrera genética para el desarrollo de resistencias	Baja G1 (G1b > G1a)	Alta	Baja	Baja G1 (G1b > G1a)
Resistencia cruzada	Alta	Baja	Específicas de cada familia	Alta
Principales mutaciones de resistencia	Q80K, R155T/K, V36A/M, T54A/V/S, V55A, A156T/S/V, D168V/A/T/H, V170A/T/L.	S282T	C136Y/N, S365T/A, M414T/L, L419M/V, M423T/I/V, Y448C/H, I482L/V/T, M494I/A, P495S/L/A/T, P496A/S, V499A	M28T, Q30H/R, L31M/F/V, P32L, Y93C/H/N
Autorizados	boceprevir, telaprevir simeprevir paritaprevir	sofosbuvir	dasabuvir	daclatasvir ledipasvir ombitasvir

Tabla I.9. Resumen de las principales características de las distintas familias de AAD

*AN: análogos de nucleósido; NAN: no análogos de nucleósido (283).

La comercialización de los nuevos AAD ha suscitado una notable polémica debido al elevado coste de éstos.

En diciembre de 2014, el tratamiento completo con sofosbuvir, que se vende bajo la marca Sovaldi®, ascendía en EE UU a 61.700 euros y, por ejemplo, en Francia a 56.000 euros por paciente mientras que datos recientes indican que en España se ha alcanzado un acuerdo para disminuir dicho coste a 25.000 euros anuales. En India, donde la farmacéutica dueña de la patente (Gilead) ha autorizado a siete laboratorios a lanzar genéricos de Sovaldi, la terapia de 24 semanas se podrá vender en dicho país y otros 90 en desarrollo (englobando una población infectada de más de 100 millones de personas) previsiblemente a menos de 1.400 euros.

La siguiente generación de AADs ofrece mejores resultados en cuanto a RVS, pero sobre todo son mucho más seguros que telaprevir o boceprevir. Además, la dosificación de estos AAD es más simple y cómoda. Más aún, las interacciones farmacológicas de los nuevos AAD son más manejables o incluso no relevantes.

Recientemente se ha autorizado para uso clínico el Inhibidor de la proteasa del VHC (iP-VHC) de segunda oleada o generación paritaprevir, el inhibidor de la polimerasa NS5B no análogo de nucleósido dasabuvir y los inhibidores de la NS5A daclatasvir, ombitasvir y ledipasvir. A corto plazo se aprobará el IP-VHC faldaprevir. Estos nuevos AAD van a ofrecer, además de eficacia, seguridad y comodidad, actividad frente genotipos distintos del 1.

A pesar de que las expectativas de respuesta son muy esperanzadoras con los AADs, existen una serie de cuestiones que deben aclararse lo antes posible. Principalmente, la información de que disponemos sobre la eficacia y seguridad de los AADs proviene de ensayos clínicos, los cuales no reflejan las condiciones de uso de los fármacos en la práctica clínica diaria. Muchos de los pacientes afectados por la infección por VHC acostumbran a ser de complejo abordaje, una mayoría de usuarios de drogas, especialmente antiguos usuarios de drogas parenterales, con frecuente patología psiquiátrica, que reciben tratamientos concomitantes con problemas de interacciones y adherencia.

El espectro de genotipos del VHC es también distinto, con predominancia de genotipos 1a, frente al 1b, 3 y 4. Todos estos factores

podrían hacer que las tasas de RVS a los AAD y la de interrupciones y abandonos de tratamiento, especialmente los de primera generación, fuese distintas a lo que se ha comunicado, particularmente en los sujetos más difíciles de tratar.

Hasta el momento se cuenta con un limitado número de AAD para el tratamiento de la infección crónica por VHC. Son cuatro inhibidores de la proteasa NS3, (telaprevir, boceprevir, simeprevir y paritaprevir) un inhibidor de la polimerasa NS5B análogo de nucleósido (sofosbuvir), un inhibidor de la polimerasa NS5B no análogo de nucleósido (dasabuvir) y tres inhibidores de la NS5A (daclatasvir, ledipasvir y ombitasvir). Actualmente se encuentran en fases avanzadas de desarrollo clínico diferentes fármacos pertenecientes a distintas familias (ver Tabla I.10) con resultados muy prometedores en cuanto a eficacia y seguridad.

En general, estos nuevos antivirales han demostrado una extraordinaria actividad antiviral solos o en combinación con PegIFN/RBV, aumentando de forma significativa las tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) hasta un 80-100% en el genotipo 1 y reduciendo, en muchos casos, el tiempo de duración del tratamiento (283). Además, por primera vez se ve factible la curación de la infección por VHC con terapias libres de PegIFN/RBV.

Tabla I.10- Familias AAD

Inhibidores de la proteasa NS3	Inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósido	Inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido	Inhibidores de la NS5A
telaprevir (Janssen)*	sofosbuvir (Gilead)*	deleobuvir: NNI de sitio 1 (Boehringer Ingerheim)	daclatasvir (Bristol-Myers Squibb)*
boceprevir (MSD)*	mericitabina (Fase II, Roche)	dasabuvir: NNI de sitio 3 (ABT-333) (AbbVie)*	ledipasvir (Gilead)*
simeprevir (Janssen)*	IDX-184 (Idenix)	VX-222: NNI de sitio 2 (Fase II, Vertex)	ombitasvir (ABT-267) (AbbVie)*
faldaprevir (Fase III, Boehringer Ingerheim)	VX-135 (Fase II)	ABT-072: NNI de sitio 3 (Fase II, AbbVie)	elbasvir (MK-8742) (Fase III, Merck)
asunaprevir (Fase III, Bristol-Myers Squibb)	GS-6620 (Gilead)	setrobuvir: NNI de sitio 3 (Fase II, Roche)	samatasvir (Fase II, Idenix)
vaniprevir (Fase III, Merck)	INX-189 (Bristol-Myers Squibb)	tegobuvir: NNI de sitio 5 (Gilead)	ACH-3102 (Fase II, Achillion)
danoprevir (Fase III, Roche)		filibuvir: NNI de sitio 2 (Pfizer)	
sovaprevir (Fase II, Achillion)			
paritaprevir (ABT-450/r) (AbbVie)*			
GS-9451 (Fase II, Gilead)			
grazoprevir (MK-5172) (Fase III, Merck)			
En negrita con * los compuestos autorizados para su uso en España, En celdas sombreadas en gris los compuestos cuyos ensayos clínicos han debido ser cancelados.			

I) Inhibidores de la proteasa

Telaprevir y boceprevir fueron los primeros AAD aprobados para el tratamiento de pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1 en combinación con PegIFN/RBV. Ambos fármacos son derivados lineares de α -cetoamidas que se unen covalentemente y de forma reversible a la proteasa NS3/4A con una cinética de unión y disociación lenta. En pacientes naïve al tratamiento con interferón, ambos fármacos incrementan de forma significativa las tasas de curación (~70%) y acortan la duración del tratamiento (339, 339, 340, 341). Una de las principales desventajas de estos fármacos es la dosificación: telaprevir, 2 comprimidos/8h durante 12 semanas (342), y boceprevir, 4 comprimidos/8h durante la totalidad de la terapia (24, 36 o 48 semanas). Además, la aparición de efectos adversos como la anemia, rash y los desórdenes gastrointestinales son frecuentes durante el tratamiento con estos fármacos. La actividad antiviral de telaprevir y boceprevir está restringida a infecciones causadas por variantes de genotipo 1 y su eficacia es menor en aquellos pacientes previamente expuestos a PegIFN/RBV (respondedores parciales o no respondedores, fibrosis avanzada, genotipo 1a, y genotipo CT o TT del polimorfismo IL28B (343).

- Telaprevir (TVR) (Incivo®).

El ensayo clínico ADVANCE (340) evaluó la eficacia de telaprevir en 1088 pacientes de VHC genotipo 1 en combinación con PegIFN/RBV observándose tasas de RVS a semana 12 (RVS12) del 75%.

Posteriormente en el ensayo ILLUMINATE (344) se comprobó la no inferioridad del tratamiento con terapia triple (TVR + PegIFN/RBV) durante 24 semanas, frente a 48 semanas en 540 pacientes naïve.

El estudio REALIZE (341) incluyó a pacientes pretratados, con respuesta nula, parcial o que experimentaron una recidiva (no respondedores) a la terapia con PegIFN/RBV. Las tasas de RVS12 fueron significativamente más altas en los pacientes que recibieron terapia triple en comparación con los que recibieron terapia estándar, especialmente en los no respondedores previos (86% vs. 24%). El fracaso al tratamiento y la selección de mutaciones de

resistencia fue más común en los pacientes no respondedores previos y con cirrosis.

El ensayo ZENITH evaluó tres ramas de tratamiento combinando de telaprevir con VX-222 (inhibidor de la polimerasa no-análogo de nucleótido sitio 2) durante 12 semanas, en terapia doble, terapia triple con RBV y terapia cuádruple con PegIFN/RBV. Posteriormente se completó el tratamiento con 48 semanas de PegIFN/RBV (345). Las tasas más altas de respuesta (RVS12) se obtuvieron en la rama de terapia cuádruple (90%) seguida de la terapia triple con un 70%. Por el contrario las tasas más bajas de respuesta se obtuvieron en la rama de terapia doble en la que tuvo que pararse el tratamiento por número elevado de recidivas.

En términos de aparición de resistencias, un 7% de los pacientes en tratamiento con telaprevir seleccionaron cepas del VHC resistentes, de modo especial los pacientes infectados con genotipo 1a.

- Boceprevir (BOC) (Victrelis®).

El estudio SPRINT-2 (338) evaluó la eficacia de la terapia triple con boceprevir en pacientes naïve de genotipo 1, mientras que el RESPOND-2 (339) evaluó la terapia triple en pacientes no respondedores a PegIFN/RBV. En todos los casos la administración de boceprevir fue precedida por una fase en la que se administró PegIFN/RBV en biterapia durante 4 semanas. Esta fase persigue una reducción de la carga viral y una reducción de la probabilidad de seleccionar resistencias a boceprevir. En el SPRINT-2, la tasa de RVS fue del 66%, sin diferencias significativas entre los pacientes tratados durante un año y aquellos tratados durante un periodo más corto de acuerdo con la Terapia Guiada por Respuesta (TGR), que consiste en tratar sólo 24 semanas si alcanzan y mantienen la indetectabilidad desde la semana 4 de iniciar la triple terapia.

En conclusión, en pacientes mono-infectados, la triple terapia basada en PegIFN alfa, RBV y un agente antiviral directo como boceprevir o telaprevir mejora la tasa de RVS hasta un 75 % (pacientes naïve) y hasta un 50 % en el caso de pacientes que han fracasado al tratamiento previo. Sin embargo, la

triple terapia puede asociarse a ciertas reacciones adversas tales como exantema cutáneo (telaprevir) que puede ser grave hasta en un 5% de los casos, anemia (telaprevir y boceprevir) o disgeusia (boceprevir). Por otro lado, la ausencia de respuesta a la triple terapia se asocia de manera casi universal al desarrollo de mutaciones de resistencia en el VHC. Estas mutaciones tienden a desaparecer de manera progresiva con el tiempo, pero su significado clínico es incierto ya que no hay ningún estudio que haya valorado la respuesta al tratamiento con otros antivirales de la misma familia de pacientes con variantes víricas con mutaciones de resistencia.

- Simeprevir (Olysio®).

Se administra una vez al día, y ha demostrado una actividad antiviral potente frente a genotipos 1 y de menor potencia para genotipos 2, 4, 5 y 6. El estudio ASPIRE incluyó 462 pacientes pretratados de genotipo 1, a los cuales se administró 100 mg o 150 mg una vez al día (QD) de simeprevir en combinación con PegIFN/RBV. Las tasas de respuesta (RVS24) fueron del 85%, en el grupo de los no respondedores y respondedores parciales, frente un 51% en el grupo de no respondedores previos (346). Otros ensayos (QUEST-1 y QUEST-2 en pacientes naïve, y el ensayo PROMISE en pacientes no respondedores), mostraron buenos resultados administrando 150mg de simeprevir con PegIFN/RBV a 392 pacientes de genotipo 1. A la semana 12 de tratamiento alcanzaban viremia indetectable el 80%, 81% y 79% de los pacientes, respectivamente.

En definitiva, a diferencia de boceprevir y telaprevir, simeprevir parece tener un mejor perfil de seguridad y ofrece una pauta de tratamiento más cómoda para el paciente. En consonancia con las consideraciones anteriores, en pacientes infectados con VHC genotipo 1, en base a las tasas de curación observadas y a un perfil de seguridad más favorable que telaprevir y boceprevir, se considera que simeprevir representa una alternativa terapéutica a los otros dos inhibidores de la proteasa, en pacientes candidatos al tratamiento con triple terapia basada en interferón pegilado + ribavirina. En pacientes naïve y con recidiva, la terapia triple con simeprevir se considera también una alternativa terapéutica a la terapia triple con sofosbuvir.

Simeprevir, en combinación con sofosbuvir +/- RBV durante 12 semanas, se considera una alternativa terapéutica en aquellos pacientes que no toleran o no son candidatos al tratamiento con interferón y existe una necesidad de tratamiento urgente, en los que el tratamiento debe basarse en combinaciones de antivirales directos libres de interferón. Por otro lado, en todos los ensayos clínicos llevados a cabo, los datos de eficacia de simeprevir fueron consistentes en todos los subgrupos analizados (subtipo, carga viral basal, sexo, polimorfismo IL28B, Metavir) a excepción del polimorfismo Q80K. Sin embargo, excepciones a esta recomendación serían aquellos pacientes infectados por VHC genotipo 1a que presenten polimorfismo basal Q80K. En estos pacientes, no se recomienda el uso de simeprevir (5).

- Paritaprevir (ABT-450/r) / omritasvir (ABT-267) (ambos incluidos en combinación con omritasvir y ritonavir (Viekirax ®); dasabuvir (Exviera®)

El paritaprevir ha sido recientemente autorizado para su uso combinado con omritasvir y ritonavir (combinación comercializada bajo el nombre Viekirax®) en un documento conjunto con el dasabuvir (Exviera®) (5b, 350, 359, 360). Ambos han sido autorizados, combinados entre sí o con otros medicamentos (no autorizados en monoterapia), en el tratamiento de la hepatitis C. En el momento actual, la pauta habitual de combinación es omritasvir/paritaprevir/ritonavir ± dasabuvir ± ribavirina. En su desarrollo se realizaron pequeños estudios en combinación con interferón pegilado y en estos momentos se está realizando, al menos, un estudio en combinación con sofosbuvir (SOF) en pacientes con fallo previo a otros AADs. Por el momento no existen estudios de combinación con telaprevir, boceprevir, simeprevir, daclatasvir ni otras moléculas similares.

Cabe destacar que en el programa de desarrollo de omritasvir/paritaprevir/ritonavir y dasabuvir (OBV/PTV/rtv y DSV) se ha dispuesto de un importante número de ensayos clínicos que incluyen un gran número de pacientes, haciendo que las conclusiones extraídas se puedan considerar sólidas. También se han podido obtener conclusiones certeras sobre su perfil de seguridad ya que se han realizados ensayos clínicos con placebo como comparador. La combinación de omritasvir/paritaprevir/ritonavir

y dasabuvir es el primer régimen autorizado sin interferón que combina antivirales de acción directa y que no incluye a sofosbuvir como parte del régimen.

Para el genotipo 1, en los estudios fase III se demuestra una eficacia superior al 95% cuando los pacientes G1b no cirróticos son tratados con OBV/PTV/rtv y DSV, independientemente de una posible no respuesta a tratamiento previo con Peg/RBV u otros factores del paciente. Por ello, de forma general, el régimen recomendado en pacientes con genotipo 1b no cirróticos debe ser OBV/PTV/rtv y DSV 12 semanas. Según datos presentados del estudio AVIATOR, probablemente la combinación OBV/PTV/rtv + ribavirina (RBV) proporcione similares resultados a OBV/PTV/rtv y DSV, habiéndose optado por ésta última ante el mejor perfil de seguridad de DSV frente al de RBV. No existen datos en no respondedores previos a otros AAD. En cuanto al G1a, atendiendo a datos obtenidos en el estudio PEARL-IV, la combinación OBV/PTV/rtv y DSV sin RBV no demostró la no inferioridad frente a la misma pauta con RBV, ambas durante 12 semanas y en pacientes naïve (RVS 97% con RBV, 90,2% sin RBV). En general, en pacientes cirróticos la RVS tiende a ser inferior.

Por su parte, datos del estudio TURQUOISE-II, muestran la comparación de la combinación OBV/PTV/rtv y DSV + RBV se durante 12 o 24 semanas en pacientes cirróticos G1, previamente tratados (con Peg/ RBV) o naïve. Los resultados en pacientes G1b, tratados durante 12 semanas (RVS 98,5%), muestran tasas de respuestas similares a los tratados durante 24 semanas. En pacientes infectados con VHC G1a cirróticos naïve, la RVS fue ligeramente inferior a G1b con un 92-95%, no existiendo diferencias entre 12 y 24 semanas de tratamiento; en los pacientes previamente tratados, y a pesar del bajo número de pacientes en cada subgrupo, parece que tampoco hay diferencias entre 12 y 24 semanas de tratamiento en pacientes con respuesta parcial previa a biterapia o recidiva. Sin embargo, en pacientes con genotipo 1a, la respuesta nula previa sí que se ha asociado a una menor probabilidad de alcanzar RVS.

En el estudio PEARL-1 se evaluó el tratamiento combinado de OBV/PTV/rtv + RBV en pacientes G4 no cirróticos, mostrando un 100% de RVS, tanto en pacientes naïve como en no respondedores a tratamiento previo. Por el momento no se disponen de datos en pacientes cirróticos compensados con genotipo 4, aunque actualmente se encuentra en marcha el ensayo M11-665 en el cual se estudia el tratamiento de pacientes cirróticos compensados G4 con OBV/PTV/rtv + RBV, en pautas de 12, 16 y 24 semanas. La actividad in vitro de PTV y OBV es similar para G1b y G4 y ambos medicamentos presentan una barrera genética similar frente a la aparición de resistencias para ambos genotipos.

Hasta el momento, a la hora de abordar los genotipos 2 y 3, OBV/PTV/rtv y DSV no son eficaces o no han sido suficientemente estudiados en genotipos 2 y 3 por lo que su uso no está indicado en estos pacientes.

En definitiva, el régimen OBV/PTV/rtv y DSV con RBV durante 12 semanas es una alternativa terapéutica a otras combinaciones de AAD, en pacientes con genotipo 1, tanto mono como coinfectados por VIH, con y sin cirrosis. En pacientes con genotipo 1b no cirróticos se puede prescindir de la RBV. En pacientes con genotipo 1a y cirrosis compensada, con respuesta nula a tratamiento previo con PEG/RBV o factores predictores de mala respuesta, se recomienda prolongar el tratamiento a 24 semanas.

En pacientes con genotipo 4, el régimen OBV/PTV/rtv con RBV administrado durante 12 semanas es una alternativa terapéutica a otras combinaciones de AAD. Sin embargo, en pacientes cirróticos la evidencia procede de la extrapolación de resultados en pacientes con genotipo 1b y la duración óptima del tratamiento es desconocida.

Se debe de tener en cuenta el perfil de interacciones de esta combinación, que complica el manejo de la inmunosupresión. En el contexto del post-trasplante, en el momento actual existen otras combinaciones (sofosbuvir / ledipasvir + RBV o SOF / simeprevir + RBV) que con tratamientos de 12 semanas obtienen resultados similares.

Dada la escasa experiencia de su uso aún existen numerosas poblaciones para las que no existen datos suficientes para su utilización, a saber: pacientes con fibrosis avanzada y/o descompensados, pacientes con VHC G1 con fracaso al tratamiento con inhibidores de la proteasa, pacientes con insuficiencia renal, trasplantados hepáticos con fibrosis avanzada o niños. Dicha ausencia de datos con esta combinación hace preferible el uso de otras alternativas terapéuticas.

Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas se están desarrollando nuevos inhibidores de la proteasa en diferentes fases de desarrollo clínico (ej. asunaprevir, vaniprevir, sovaprevir, danoprevir, faldaprevir, GS-9451 y grazoprevir). Este grupo de compuestos está formado por inhibidores no covalentes, que en su mayoría muestran actividad antiviral frente a todos los genotipos de VHC, con un perfil de seguridad mejorado y que se administran una vez al día (347, 348, 349, 350). Además, algunas de estas moléculas, como el grazoprevir, muestran una actividad antiviral frente a variantes del VHC portadoras de mutaciones asociadas con resistencia a la primera generación de inhibidores de la proteasa (351).

- Faldaprevir

Se trata del medicamento más avanzado entre los aún no autorizados de este grupo. Dos ensayos han demostrado la eficacia de faldaprevir en combinación con PegIFN/RBV en pacientes con genotipo 1. El primero de ellos fue el SILEN-C1 (en pacientes naïve). En él se aleatorizaron los pacientes en 4 ramas de tratamiento. En las dos primeras, se administró durante tres días PegIFN/RBV (fase de inicio o lead-in) y posteriormente 120 o 240 mg de faldaprevir una vez al día. La tercera rama de tratamiento no tuvo fase de lead-in sino que inició 240mg de faldaprevir y PegIFN/RBV a la vez. Por último, se incluyó un grupo placebo de pacientes que sólo recibieron PegIFN/RBV. Todos los grupos recibieron tratamiento durante 24 semanas (Tabla I.11).

Tabla I.11- Resultados del ensayo SILEN-C1

Tratamiento y dosis	RVS Terapia 1	RVS Terapia 2	RVS Terapia 3
faldaprevir 120mg L-in	71%	ND	ND
faldaprevir 240mg L-in	73%	82%	96%
faldaprevir 240mg	83%	93%	90%
Placebo	56%	ND	ND

Terapia 1: faldaprevir, PegIFN y ribavirina 24 semanas; Terapia 2: faldaprevir, PegIFN y ribavirina 24 semanas en terapia guiada por respuesta; Terapia 3: faldaprevir, PegIFN y ribavirina 24 semanas + PegIFN y ribavirina 24 semanas en terapia guiada por respuesta. L-in: Fase de Lead-in de tres días con biterapia PegIFN/RBV

El ensayo SILEN-C2 incluyó a 288 pacientes pre-tratados. Dos grupos de pacientes fueron aleatorizados a recibir una fase de lead-in durante tres días con PegIFN/RBV seguido de terapia con 240 mg de faldaprevir una (QD) o dos veces al día (BID). El tercer grupo de pacientes recibió triple terapia (faldaprevir QD + PegIFN/RBV) sin fase de lead-in. En los tres grupos el tratamiento con faldaprevir fue durante 24 semanas, mientras que el grupo que recibió triple terapia una vez al día con lead-in continuó tratamiento con PegIFN/RBV hasta semana 48 (Tabla I.12).

Tabla I.12- Resultados del ensayo SILEN-C2

Tratamiento y dosis	RVS RP	RVS NoR	RVS Terapia 1	RVS Terapia 2
faldaprevir 120mg/24h + L-in + PegIFN/RBV	30%	21%	40%	72%
faldaprevir 240mg/24h + L-in + PegIFN/RBV	50%	35%	ND	ND
faldaprevir 240mg/12h + L-in + PegIFN/RBV	42%	29%	ND	ND

RP: Población Respondedores Parciales; NoR: Población No Respondedores; Terapia 1: faldaprevir, PegIFN y ribavirina 24 semanas en terapia guiada por respuesta; Terapia 2: faldaprevir, PegIFN y ribavirina 24 semanas + PegIFN y ribavirina 24 semanas en terapia guiada por respuesta. L-in: Fase de Lead-in de tres días con biterapia PegIFN/RBV

II) Inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósido (NI)

Existen diferentes inhibidores análogos de nucleós(t)ido en desarrollo clínico que inhiben la replicación del VHC uniéndose al sitio activo de la ARN-polimerasa ARN dependiente, y por tanto bloqueando la elongación de la cadena. Esta familia se caracteriza por tener una extraordinaria actividad frente a todos los genotipos del VHC y una barrera genética alta para el desarrollo de resistencias. Hasta ahora solo hay un compuesto autorizado para su uso, el sofosbuvir.

- Sofosbuvir (Sovaldi®).

Este fármaco ha demostrado una actividad antiviral muy potente frente a todos los genotipos del VHC así como una barrera genética muy alta para el desarrollo de resistencias (352, 353, 354). El estudio ELECTRON, en el que se evaluó sofosbuvir en combinación con RBV en pacientes naïve con genotipos 1, 2 y 3 en pacientes no respondedores (NR) a una terapia previa con PegIFN/RBV de genotipo 1. Aunque en los pacientes NR las tasas de respuesta fueron del 100%, las tasas de recidivas durante el seguimiento (24 semanas tras finalizar el tratamiento) fueron del 90% (355). Con el objetivo de evitar estas altas tasas de recidiva se ha añadido una nueva rama al estudio formada por pacientes naïve y NR a los que se les ha administrado la combinación de sofosbuvir + ledipasvir (inhibidor de la NS5A recientemente autorizado para su comercialización) + RBV. Añadiendo este segundo antiviral se han obtenido RVS12 del 100% sin recidivas 4 semanas post-tratamiento (355).

A pesar de las limitaciones de los estudios descritas anteriormente, se considera que sofosbuvir presenta valor terapéutico añadido en comparación con los estándares actuales de tratamiento de la infección crónica por el virus de la hepatitis C en determinados escenarios clínicos y para las distintas pautas de tratamiento estudiadas. Sofosbuvir presenta tasas elevadas de RVS12, un buen perfil de seguridad, menor duración de tratamiento y la posibilidad de ser usado sin Peg en determinados grupos de pacientes (6).

En cuanto al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas dentro de esta familia de compuestos, el más prometedor, aún en estudio, es la mericitabina.

- Mericitabina.

Pro-fármaco oral del análogo de 2'-deoxi-2'-fluoro-2'-C-metilcloridina PSI-6130. Este compuesto se convierte a través de la fosforilación de las quinasas celulares al metabolito activo 5-trifosfato, que inhibe la polimerasa NS5B del VHC. Los ensayos JUMP-C e IFNORM-1 (primer régimen libre de PegIFN para el tratamiento de la infección crónica por VHC) demostraron la seguridad y eficacia de la mericitabina tanto en combinación con terapia estándar (JUMPC) como en combinación con danoprevir (ensayo IFNORM-1) (356, 357). Además, se han realizado dos estudios de combinación de mericitabina + danoprevir + RBV, que son el IFNORM-SVR (pacientes naïve) y el MATTERHORN (pacientes pretratados) (358).

III) Inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido (NNI).

Mientras que los análogos de nucleós(t)idos bloquean la replicación del VHC actuando como terminadores de cadena y por tanto bloqueando la elongación de la cadena de ARN, los no-análogos de nucleósido interaccionan fuera del centro catalítico de la enzima y producen cambios alostéricos comprometiendo su función. Se pueden agrupar en cinco familias (NNI-1, NNI-2, NNI-3, NNI-4 y NNI-5) dependiendo del lugar de la polimerasa al que se unan. En el subdominio pulgar (en la literatura denominado con el término anglosajón *thumb*) se encuentran los sitios de unión 1, 2 mientras que en el subdominio *palm* se encuentran los sitios de unión 3, 4 y 5 (Figura I.13). Dentro de esta familia, existe un fármaco recientemente autorizado, el dasabuvir (Exviera®), mientras que los fármacos que se encuentran en fases más avanzadas de desarrollo son VX-222, ABT-072, setrobuvir o el GS-9669. Atrás quedan otros como el tegobuvir, deleobuvir o filibuvir cuyos resultados no han sido los esperados y por ello su desarrollo ha debido ser cancelado. Todos estos compuestos se caracterizan por presentar de forma generalizada una

barrera genética baja para el desarrollo de resistencias sumado a una actividad genotipo/subtipo dependiente.

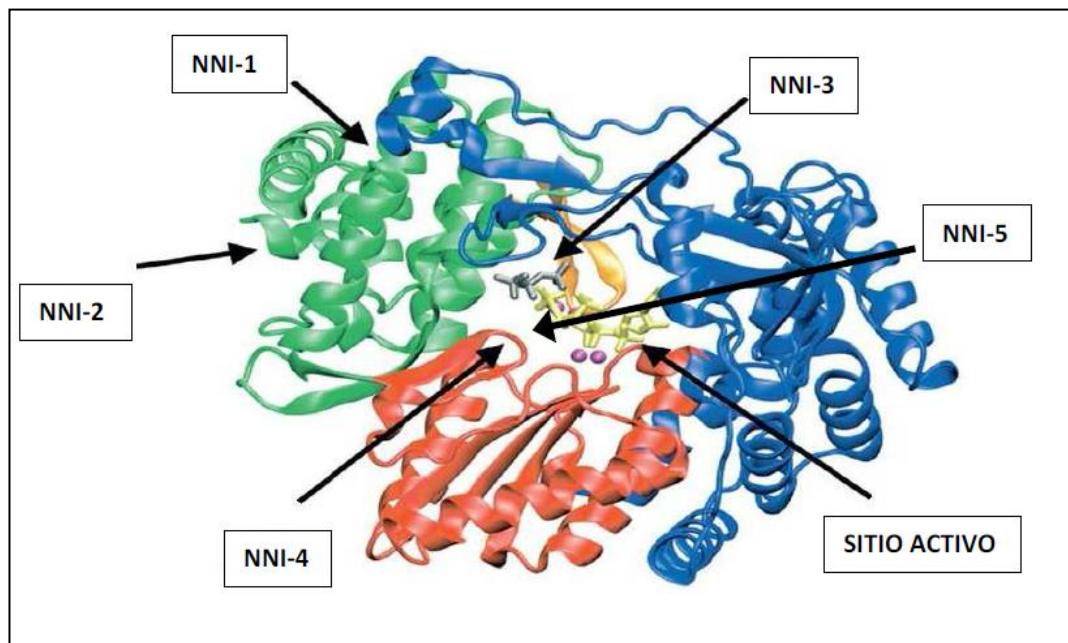


Figura I.13- Sitos de unión de los Inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido (283)

- Dasabuvir (Exviera®).

Previamente se han expuesto los ensayos clínicos efectuados en combinación junto con Viekirax ®. Su mecanismo de acción consiste en la unión al sitio 3 de la polimerasa.

- VX-222.

Se une al sitio 2 de la polimerasa. En los estudios publicados para dosis de 100 o 400 mg/12h mostró una buena tolerancia junto con un incremento de eventos adversos gastrointestinales para la dosis superior. En el estudio QUAD para dicha dosis se observó la frecuencia más elevada de efectos adversos en grado 3/4. Por su parte, el DUAL tuvo que ser discontinuado debido a un elevado avance viral antes de la semana 12. La RVS en la semana 24 semanas post-tratamiento tanto en pacientes tratados 12 semanas y aquellos tratados adicionalmente 24 semanas con PegIFN + RBV fue del 67% en el TRIPLE (400 mg/12h) y de un 79% y 90% en el QUAD (100 mg/12h y 400mg/12h respectivamente).En un estudio comparativo con inhibidores NS5B

como el sofosbuvir y la mericitabina se observó actividad de estos últimos frente a genotipos 1a, 2a y 2b mientras que el VX-222 solo inhibía el genotipo 1a (361)

- Setrobuvir (ANA598, RG7790).

Inhibidor del sitio 3 de la polimerasa. Los ensayos en fase IIb (275 pacientes naïve y pretratados infectados por el genotipo 1) confirmaron primero, una respuesta antiviral potente, tanto en respondedores parciales y no respondedores como en naïve, en segundo lugar, un buen perfil de seguridad y por último una alta barrera genética para el desarrollo de resistencias al fármaco. Actualmente está en desarrollo un nuevo estudio sin PegIFN llamado ANNAPUARN, en el cual se incluirán pacientes de genotipo 1 y se combinará setrobuvir + danoprevir potenciado con Ritonavir + RBV con/sin mericitabina para evaluar RVS a semana 12.

IV) Inhibidores de NS5A

Se trata de una nueva familia de antivirales que actúan inhibiendo la proteína NS5A. Esta proteína forma parte del complejo de replicación del VHC, aunque se desconocen los mecanismos exactos de acción. Los fármacos de esta familia han demostrado una gran actividad antiviral frente a todos los genotipos.

- Daclatasvir (Daklinza®).

Ha sido el primer fármaco de este grupo autorizado por la Agencia Europea del Medicamento en el tratamiento de la hepatitis C crónica. Su mecanismo de acción consiste en efectuar una unión al dominio 1 de NS5A. En los ensayos clínicos ha demostrado una potente actividad antiviral frente a diferentes genotipos del VHC aunque se ha observado una mayor susceptibilidad al fármaco en los pacientes de genotipo 1b frente a los 1a (362). Recientemente se han presentado los datos de diversos estudios en los que se ha combinado el inhibidor con otros AAD sin PegIFN (363, 364, 365). En el estudio AI444-04 donde se testaban diversas combinaciones con sofosbuvir con y sin RBV y sin PegIFN las tasas de RVS a las 4 semanas post tratamiento

fueron del 100% en pacientes naïve genotipo 1 (indiferentemente de la presencia o no de RBV) y 88-100% en pacientes naïve genotipo 2 o genotipo 3 en terapia sin RBV mientras que en esa misma población administrado junto con RBV la RVS a las 4 semanas de finalizar el tratamiento fue del 86%. Combinado con asunaprevir y BMS-791325 (TRIPLE DAA) las tasas llegaron hasta un 91% a la semana 4 y 12 post tratamiento. Además de en estos genotipos, también se ha autorizado su uso con el genotipo 4 en combinación con peginterferón alfa y ribavirina.

A través de los ensayos clínicos, los tratamientos basados en daclatasvir han sido generalmente bien tolerados, con tasas bajas de abandono en una amplia variedad de pacientes. Se han incluido más de 5.500 pacientes entre todos los estudios de daclatasvir en marcha o finalizados, en una variedad de regímenes orales y con el tratamiento estándar actual basado en interferón.

- Ledipasvir (en combinación con sofosbuvir Harvoni®)

Este fármaco ha sido, hasta la fecha, el último inhibidor de la NS5A autorizado por la Agencia Europea del Medicamento en el tratamiento de la hepatitis C crónica. Ha mostrado alta actividad antiviral frente a los genotipos 1a y 1b y además presenta actividad en presencia de la mutación S282T, la única variante hasta ahora conocida que reduce la respuesta a sofosbuvir. (4b, 366). Ledipasvir, al igual que daclatasvir, a pesar de su potente actividad antiviral, requieren ser administrados en combinación con otros AAD para evitar la aparición de mutaciones que ocasionen resistencias al tratamiento. En febrero de 2014 se publicaron los resultados del estudio LONESTAR (367), un ensayo clínico, abierto y aleatorizado, en el que se incluyeron pacientes con genotipo 1. Un grupo de pacientes englobó a pacientes naïve no cirróticos que fueron aleatorizados a recibir sofosbuvir y ledipasvir durante ocho semanas con o sin RBV, o a 12 semanas de tratamiento con sofosbuvir y ledipasvir. Por otro lado, el grupo restante de pacientes fueron los no respondedores a tratamiento previo con triple terapia con boceprevir o telaprevir quienes fueron asignados aleatoriamente a recibir la combinación de los dos AAD durante 12 semanas con o sin RBV. Sofosbuvir y ledipasvir fueron administrados en un solo comprimido que contenía 400 mg y 90 mg, respectivamente (Harvoni®, Gilead)

en el mercado para uso compasivo desde finales de 2014 (368) y recientemente autorizado para su comercialización (4b). Las tasas de RVS12 fueron similares en las dos cohortes de tratamiento. El 95% de los pacientes naïve que recibieron la terapia sin RBV independientemente de la duración (8 o 12 semanas) presentaron RVS12 y el 100% cuando se administró con RBV. La misma situación ocurrió con la cohorte de no respondedores, el 95% de los que recibieron terapia sin RBV y el 100% con RBV. Por tanto, la mayoría de los pacientes respondieron a la terapia independientemente de la presencia o ausencia de RBV, la presencia o ausencia de cirrosis o la raza.

1.5.5 Pautas de tratamiento con AAD autorizados

Al tratarse de fármacos de reciente autorización, su posología y administración junto con otros antivirales que eviten la aparición de resistencias y produzcan un efecto sinérgico aún está en estudio. Recientemente (marzo 2015) el Ministerio de Sanidad ha publicado el documento “Plan estratégico para el abordaje de la hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud” donde se especifica la guía a seguir en el uso de los nuevos AAD. En ella se aconsejan tratar con distintas combinaciones, según el genotipo, a todos los pacientes con fibrosis en grado F2, F3 y F4. De acuerdo con los datos aportados por las Comunidades Autónomas, serían 51.964 pacientes de un total de 95.524 diagnosticados los que recibirán tratamiento con los nuevos AAD (385b). En este punto, los expertos recomiendan tratar con los nuevos antivirales a pacientes tanto monoinfectados como coinfectados con el VIH. Dentro de ellos, se prioriza el tratamiento en los siguientes grupos de pacientes:

- Pacientes con fibrosis hepática significativa (F2 a F4) con independencia de la existencia o no de complicaciones previas a la hepatopatía.
- Pacientes en lista de espera de trasplante hepático o transplantados (hepáticos que hayan vuelto a infectarse y no hepáticos con hepatitis C).
- Pacientes que no hayan respondido a la triple terapia con inhibidores de la proteasa de primera generación (boceprevir y telaprevir).

- Pacientes con hepatitis C con manifestaciones extrahepáticas clínicamente relevantes del virus de la hepatitis C, sea cual sea el grado de fibrosis.
- En cualquier caso, y también con independencia del grado de fibrosis, se debe indicar el tratamiento en pacientes con elevado riesgo de trasmisión y mujeres en edad fértil que deseen un embarazo.

En el resto de casos se prioriza el uso de la terapia convencional o de la combinación de esta con los inhibidores de la proteasa boceprevir, telaprevir o simeprevir. Para la puesta en práctica de este plan, se ha establecido un techo de gasto de 727 millones de euros, a pagar en tres años, lo que garantiza que los servicios de salud puedan asegurar el acceso a estos medicamentos a los pacientes a los que se los prescriban los hepatólogos en base a los criterios incluidos en el Plan.

A continuación se enumeran las recomendaciones terapéuticas para los diferentes grupos poblacionales en función del genotipo infectante o de las comorbilidades del paciente. Estas recomendaciones (206b, 385b) se han efectuado basándose en las mejores tasas de RVS obtenidas en los ensayos clínicos llevados a cabo por los diferentes farmacéuticos responsables del desarrollo de los nuevos antivirales: Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Gilead Sciences, Janssen, Merck Sharp & Dohme, Novartis y Roche y tienen la opinión positiva por parte de la EMA. Se presentan en tres categorías (opciones) en razón de la evidencia científica obtenida en los ensayos terapéuticos y en algunos estudios en práctica clínica. Si los estudios eran fase 3 o basados en amplias cohortes de vida real y el nivel de eficacia alta se han incluido como primera opción. En algunas recomendaciones, sin embargo, se sugieren como primera opción pautas basadas en estudios de fase 2 (dada la ausencia de más datos).

1.5.5.1 Pacientes con Genotipo 1

Las recomendaciones para el tratamiento de estos pacientes se dividen en dos opciones según si se combinan o no con interferón:

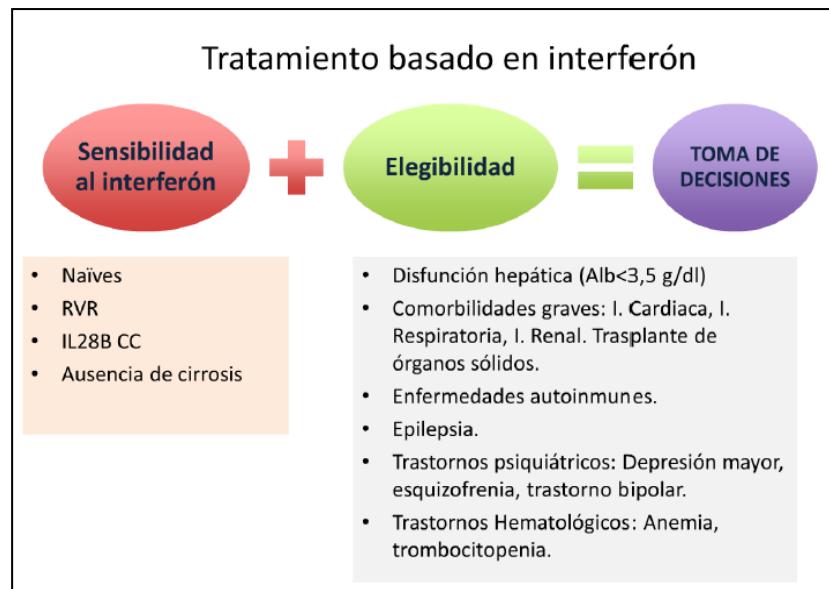


Figura I.14 - Contraindicaciones a tratamientos basados en interferón

I) Primera opción:

- Sofosbuvir/ledipasvir durante 12 semanas. En pacientes con cirrosis, sofosbuvir/ledipasvir y añadir ribavirina. En pacientes sin cirrosis y con factores predictivos de respuesta favorables el tratamiento con sofosbuvir/ledipasvir durante ocho semanas ofrece resultados similares. (4b, 5, 6, 369, 371, 372)
- Paritaprevir/r, dasabuvir, ombitasvir durante 12 semanas (G1b). En pacientes con G1a y en pacientes con cirrosis (independientemente del subtipo) paritaprevir/r, dasabuvir, ombitasvir y ribavirina durante 12 semanas. (5b, 373, 374,375)
- Sofosbuvir y simeprevir (con o sin ribavirina) durante 12 semanas.(5, 206b)

II) Segunda opción

- Sofosbuvir y daclatasvir (con o sin ribavirina) durante 12 semanas. (370)
- PegIFN + ribavirina (PR) y sofosbuvir durante 12 semanas.(206b)

III) Tercera opción

- PegIFN + ribavirina y Simeprevir durante 24 semanas. En pacientes con ARN detectable en la semana 4 se recomienda interrumpir el tratamiento (385b).

Los pacientes infectados con el genotipo 1 que han sido expuestos a un tratamiento previo con PegIFN + ribavirina pueden ser tratados con pautas que contengan Interferón o libres de Interferón. En pacientes no respondedores, las pautas aplicables pueden ser las mismas que en pacientes naïve.

Tratamiento basado en interferón: Se ha demostrado útil en pacientes que presentaron una recidiva después de un tratamiento previo con PR, con tasas de RVS del 80% (375b). En el análisis de subgrupos merece la pena remarcar que la RVS fue del 75% en pacientes G1a con la mutación Q80K, mientras que en el resto de pacientes alcanzó el 90%.

IV) Opciones desaconsejadas

- PegIFN + RBV
- PegIFN + RBV + boceprevir
- PegIFN + RBV + telaprevir
- sofosbuvir + RBV

1.5.5.2 Pacientes con Genotipo 2

El genotipo 2 es responsable de un 9-10% de los casos de VHC mundial (16 millones de personas) principalmente circunscrito en Corea, Venezuela y Colombia. En este genotipo, el tratamiento de PegIFN+ RBV durante 24 semanas ha sido el recomendado hasta ahora con unos resultados aceptables pero con los problemas ya mencionados de reacciones adversas.

Por ello, la EASL y la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) han efectuado recomendaciones para tratamiento del VHC genotipo 2 con AADs:

- En los pacientes naïve y recaedores a interferón y ribavirina la pauta de elección es la combinación de sofosbuvir y

ribavirina durante 12 semanas, y si el paciente tiene cirrosis 16 semanas. (376, 377)

- En los pacientes no respondedores a interferón y ribavirina o a sofosbuvir y ribavirina, se recomienda la combinación de sofosbuvir, interferón pegilado y ribavirina durante 12 semanas o sofosbuvir con ribavirina durante 16-24 semanas.

1.5.5.3 Pacientes con Genotipo 3

Como ya se ha mencionado previamente, la hepatitis C genotipo 3 se asocia a una más rápida progresión de la fibrosis y a una menor supervivencia. Para este genotipo hay recomendaciones específicas para pacientes naïve y pacientes pretratados

- I) **Pacientes naïve:** En este grupo de pacientes las recomendaciones son las mismas indistintamente de si el paciente padece o no cirrosis. Solo se distingue en función de si son o no aptos para ser tratados con interferón:

- sofosbuvir con interferón y ribavirina durante 12 semanas.
- sofosbuvir con ribavirina 24 semanas.
- sofosbuvir con Daclatasvir, 12 semanas. Esta pauta no se recomienda en los pacientes cirróticos.
- sofosbuvir/ledipasvir con ribavirina durante 12 semanas.

- II) **Pacientes recaedores o no respondedores** (incluyendo no respuesta a sofosbuvir y ribavirina) (378, 379):

- sofosbuvir con interferón y ribavirina durante 12 semanas.
- sofosbuvir + daclatasvir 12 semanas (en cirróticos se recomienda alargar a 24 semanas o añadir ribavirina).
- sofosbuvir/ledipasvir con ribavirina durante 12 semanas

1.5.5.4 Pacientes con Genotipo 4

La prevalencia del genotipo 4 en Europa está aumentando (en España ya está por encima del 10%), este incremento se debe a numeroso factores, uno de ellos es el descenso en la prevalencia del genotipo 1 debido a que cada vez más pacientes son tratados. El tratamiento convencional de interferón y ribavirina frente a este genotipo presentaba unos pobres resultados de RVS (en torno al 50%). Sin embargo, al igual que sucede con el genotipo 3, el número de estudios clínicos llevados a cabo con tratamientos frente a VHC genotipo 4 son escasos en comparación con los llevados a cabo frente al genotipo 1.

I) En pacientes naïve y recaedores:

- Primera opción:
 - Sofosbuvir/ledipasvir durante 12 semanas.
 - Paritaprevir/r + ombitasvir + ribavirina durante 12 semanas en no cirróticos (24 semanas en cirróticos). (5b, 6, 368, 381)
 - Sofosbuvir + ribavirina durante 24 semanas. (378, 381)
- Segunda opción:
 - Sofosbuvir + simeprevir durante 12 semanas, aunque solo existen escasos resultados obtenidos en práctica clínica.
 - Sofosbuvir + PegIFN + ribavirina durante 12 semanas.
 - Sofosbuvir + daclatasvir 12 semanas (en no cirróticos) y 24 semanas (en cirróticos) (380).
- Tercera opción:
 - Simeprevir + PegIFN + ribavirina durante 24-48 semanas.
 - Daclatasvir + PegIFN + ribavirina durante 24 semanas.

II) En los pacientes no respondedores a PR:

- Primera opción:
 - Sofosbuvir/ledipasvir durante 12 semanas.
 - Paritaprevir/r + ombitasvir + ribavirina durante 12 semanas en no cirróticos.
- Segunda opción:

- Sofosbuvir con ribavirina durante 24 semanas.
- Sofosbuvir + daclatasvir 12 semanas (en no cirróticos) y 24 semanas (en cirróticos).
- Tercera opción:
 - Sofosbuvir + simeprevir durante 12 semanas.

1.5.5.5 Pacientes con Genotipo 5 o 6

El VHC genotipo 5 afecta a un 1% de la población infectada mundial mientras que el 6 a un 5% (unos nueve millones de personas) de los infectados globales. Las recomendaciones de la EASL para el tratamiento de ambos genotipos son iguales:

- Combinación de sofosbuvir + PR 12 semanas. (379)
- Pacientes intolerantes o inelegibles para tratamiento con interferón pueden ser tratados con RBV + sofosbuvir 24 semanas.

Indicaciones generales

Las indicaciones generales para el tratamiento de la hepatitis crónica por virus C están descritas por la Conferencia de Consenso de la NIH (National Institutes of Health), sustentado por las guías de tratamiento de la *American Association for the Study of Liver Diseases* (382), de la *American Gastroenterological Association* (383) y de la Española (206b, 384, 385). Es el paciente que ha cumplido 18 años, con deseo de ser tratado y sin contraindicaciones del tratamiento, que presenta niveles detectables de ARN-VHC séricos con evidencia de hepatitis crónica (por elevación de los niveles de ALT o por la presencia de actividad necroinflamatoria considerable y fibrosis en la biopsia hepática). Ante el creciente arsenal de medicamentos autorizados y en investigación para el tratamiento de pacientes con esta patología, la propia variabilidad de situaciones clínicas a las que se enfrentan los clínicos, así como la dificultad de abordar de manera inmediata el tratamiento de todos los pacientes, se ha procedido a establecer una estrategia y ordenamiento en el acceso a estos nuevos medicamentos. Dicha estrategia promovida por el Ministerio de Sanidad, y que será sometida a revisiones semestrales, prioriza (a fecha 19 de abril de 2015) el uso de los nuevos medicamentos en pacientes

con fibrosis hepática significativa (F2-F4) así como en todos los enfermos en el entorno del trasplante hepático (lista de espera y transplantados) (385b).

Más allá de prioridades, se hace una indicación de aquellos pacientes específicamente candidatos a terapia frente a VHC:

- Todos los pacientes con hepatitis crónica C, monoinfectados o coinfecitados con el VIH, naïve.
- Todos los pacientes con una hepatitis crónica C, monoinfectados o coinfecitados con el VIH, que no han respondido a un tratamiento antiviral previo (independientemente del tipo recibido) deben ser revaluados como candidatos a un nuevo tratamiento antiviral.
- Los grupos de pacientes prioritarios para el tratamiento con antivirales orales de acción directa incluyen:
 - Pacientes con una fibrosis hepática avanzada (F2-F4), independientemente de la existencia o no de complicaciones previas de la hepatopatía.
 - Pacientes en lista de espera de trasplante hepático / transplantados hepáticos con recidiva de la infección en el injerto hepático, independientemente de la existencia o no de complicaciones y del estadio de fibrosis.
 - Pacientes que no han respondido a triple terapia con inhibidores de la proteasa de primera generación.
 - Pacientes transplantados no hepáticos con una hepatitis C, independiente del estadio de fibrosis hepática.
 - Pacientes con hepatitis C con manifestaciones extrahepáticas clínicamente relevantes del VHC, independiente del estadio de fibrosis hepática.

En todos estos pacientes, salvo situaciones excepcionales, el régimen terapéutico elegido debe ser libre de interferón. Igualmente se indica que en los

pacientes con fibrosis F0-F1, el tratamiento se puede diferir y considerar su indicación individualmente. Estos pacientes deberán monitorizarse de manera estrecha y tratarse si se producen cambios relevantes en su evolución o en la progresión de su enfermedad.

Por otro lado, existen recomendaciones específicas de tratamiento (con independencia del grado de fibrosis) para aquellos pacientes con riesgo elevado de trasmisión de la infección como lo son las mujeres en edad fértil con deseo de embarazo.

Así mismo se han establecido unas normas generales de la terapia con antivirales orales libre de interferón. En primer lugar, la duración recomendada del tratamiento en los pacientes sometidos a regímenes libres de interferón con dos o más antivirales orales es por lo general de 12 semanas, en función del medicamento utilizado. Ocasionalmente, la duración del tratamiento podrá ser superior o inferior a 12 semanas. Por último, se recomienda la adición de RBV al régimen terapéutico establecido, aunque se debe individualizar en función de las características y tolerancia del paciente.

Del mismo modo, se han efectuado recomendaciones específicas en el uso de los nuevos AAD (1, 5, 6, 206b, 382, 385b), válidas para escenarios de poblaciones especiales, que incluyen pacientes de características particulares. Estos pacientes se encuentran en situaciones clínicas en las que existe necesidad de tratamiento debido al avanzado estado de la enfermedad y/o alto riesgo de morbi-mortalidad asociada y no existen alternativas terapéuticas o bien las existentes no son adecuadas debido a problemas de seguridad.

I) Pacientes en lista de espera de trasplante hepático

Todos los pacientes en lista de espera de trasplante hepático deben recibir tratamiento antiviral tan pronto como se incluyan en lista activa de trasplante con el objetivo de evitar la reinfección del injerto y sus consecuencias negativas sobre la supervivencia del paciente y del injerto. En estos pacientes está contraindicado el tratamiento basado en IFN, excepto en pacientes con función hepática preservada y sin citopenias significativas. Si se plantea un tratamiento con IFN en pacientes concretos, existen distintas

alternativas terapéuticas. Podría valorarse usar Peg/RBV en combinación con un inhibidor de proteasa o bien Peg + RBV + sofosbuvir. Las combinaciones libres de PEG-IFN incluyen:

- Sofosbuvir más simeprevir con / sin RBV.
- Sofosbuvir más daclatasvir con / sin RBV.
- Sofosbuvir más ledipasvir con / sin RBV.
- Paritaprevir/ritonavir, dasabuvir y ombitasvir con RBV.

No se ha establecido la duración óptima de la terapia, pero el riesgo de reinfección se minimiza si se consigue que el paciente se trasplante después de un periodo libre de virus de, al menos, 30 días. Además, es posible una mejoría de la función hepática que evite o retrase la necesidad de trasplante.

II) Pacientes transplantados hepáticos con recidiva de la infección por VHC

Estos pacientes tienen clara indicación de tratamiento antiviral debido al alto riesgo de morbi-mortalidad asociada a la reinfección. Los tratamientos basados en interferón, particularmente en combinación con un inhibidor de la proteasa, tienen en estos pacientes un perfil de seguridad difícilmente aceptable, existiendo muchos pacientes con contraindicaciones absolutas al tratamiento. Es difícil establecer la prioridad de un régimen terapéutico sobre otro debido a la escasez de los datos actualmente disponibles, aunque la mayoría de las combinaciones ensayadas han demostrado eficacias por encima del 85% en pacientes con una enfermedad compensada, con excelente tolerancia. Del mismo modo, no se ha establecido con certeza la necesidad de RBV o la duración del régimen antiviral, aunque se tiende a añadir RBV en pacientes con una enfermedad avanzada.

Los pacientes con cirrosis descompensada son candidatos a recibir tratamiento antiviral. En estos pacientes, además de la RVS, es de extrema importancia valorar la mejoría de la función hepática. Los regímenes terapéuticos disponibles son:

- Pacientes genotipo 1:

- Sofosbuvir más simeprevir con /sin RBV.
- Sofosbuvir más daclatasvir con /sin RBV.
- Sofosbuvir más ledipasvir con /sin RBV.
- Paritaprevir/ritonavir, dasabuvir y ombitasvir más RBV.

- Pacientes genotipo 2:

- Sofosbuvir más RBV.

- Pacientes genotipo 3:

- Sofosbuvir más ledipasvir con /sin RBV.
- Sofosbuvir más daclatasvir con /sin RBV.

- Pacientes genotipo 4:

- Sofosbuvir más simeprevir con /sin RBV
- Sofosbuvir más ledipasvir más RBV
- Paritaprevir/ritonavir y ombitasvir más RBV.

III) Pacientes cirróticos (F4 en biopsia o Fibroscan ≥ 14.5 kPa, coinfectados 14kPa):

Debido al avanzado estado de la enfermedad y al alto riesgo de complicaciones hepáticas, existe necesidad de tratamiento indiscutible y prioritario. En pacientes coinfectados por VIH y VHC, la enfermedad hepática progresiona más rápidamente y tienen un riesgo mayor de evolución a cirrosis, de descompensación y de muerte de causa hepática que los pacientes monoinfectados por VHC. Además, la infección por VHC puede favorecer la progresión de la infección por VIH. La tolerabilidad y seguridad del tratamiento basado en IFN es mala en estos pacientes (mortalidad cercana al 1% y eventos adversos graves >50%) y de hecho su uso está contraindicado en pacientes

con cirrosis descompensada (EASL 2014). Por ello, el tratamiento debe ser idéntico al de los pacientes monoinfectados por el VHC prestando especial atención al potencial riesgo de interacciones entre los tratamientos frente a ambas infecciones.

IV) Pacientes con contraindicaciones para tratamiento basado en IFN o tras fracaso al tratamiento con inhibidores de la proteasa

Todos los pacientes en los que haya fracasado la triple terapia basada en inhibidores de la proteasa de primera generación, deben recibir un tratamiento con AADs libre de PegIFN. Para ello, estos serían los regímenes terapéuticos disponibles:

- Simeprevir más sofosbuvir con RBV.
- Sofosbuvir más ledipasvir con RBV.
- Sofosbuvir más daclatasvir con RBV.

Por el momento no existe información contrastada de resultados con Paritaprevir/ritonavir, dasabuvir por lo que aún no se incluye dentro de las alternativas terapéuticas para este grupo.

1.5.6 Monitorización de pacientes con curación virológica

Una vez se establece la RVS, parece claro que ésta se mantiene de forma prolongada, por lo que si tras 6-12 meses tras la interrupción del tratamiento, el ARN del virus se mantiene indetectable, no es necesario realizar más comprobaciones. Sin embargo, esta respuesta no confiere inmunidad frente a una posible reinfección por lo que en determinados grupos de riesgo (varones homosexuales coinfecados con VIH, usuarios de drogas por vía parenteral y pacientes en régimen penitenciario), se debe hacer un seguimiento activo de tal forma que se monitorice periódicamente del ARN del VHC.

No se ha descrito ningún reservorio viral por lo que en principio la posibilidad de reactivación del VHC en pacientes expuestos a tratamiento inmunosupresor o quimioterapia tras la RVS se considera baja, si bien no existen prácticamente datos en este sentido.

Sobre el desarrollo de un hepatocarcinoma tras una RVS los datos disponibles sugieren que en pacientes con fibrosis avanzada (F3) o cirrosis compensada la RVS atenúa pero no anula el riesgo de desarrollo del mismo. A día de hoy, el riesgo de desarrollar hepatocarcinoma tras RVS no se puede determinar con precisión, ya que no existen datos sólidos al respecto, pero recientes estudios indican que la edad, las plaquetas por debajo de 140.000/mm³, la elevación de la alfafetoproteína por encima de 20 y, fundamentalmente, el grado de fibrosis se asocian a un mayor riesgo de desarrollo del mismo. En definitiva, en ausencia de datos más robustos, parece razonable mantener las estrategias de diagnóstico precoz del hepatocarcinoma en pacientes con RVS y fibrosis avanzada.

1.6 Hepatitis C y trasplante Hepático

Según los datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), el número de trasplantes hepáticos en España ha aumentado en los últimos años pasando de 170 en 1989 a 1137 en el 2011, año en el que se marcó la cifra máxima histórica de trasplantes hepáticos. En 2013 se alcanzaron los 1093 trasplantes hepáticos en el estado. En cifras acumuladas, desde 1989 hasta 2013 se han realizado un total de 20877 trasplantes hepáticos en España.

Como ya se ha mencionado, la infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) supone un importante problema de salud pública. Según los últimos datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (1), más de 185 millones de personas se hayan infectadas en el mundo de los cuales 350.000 mueren cada año. En España, según datos de la misma organización, la prevalencia oscila entre un 1,2 - 1,9 % lo que supone que unas 700.000 personas padecen la infección y se estima que un 70% de ellas sufren hepatitis

C crónica (HCC). Al cabo de años, la infección crónica por el VHC se asocia a una mayor incidencia de progresión a cirrosis hepática y hepatocarcinoma. En 1991 la proporción de trasplantes debidos a complicación por hepatitis viral se situaba en un 19,9%, hoy en día se estima que concretamente la hepatitis C es la causa de un 30% de los trasplantes hepáticos realizados en España. Esto equivale a un 7,5% del total de trasplantes de órganos del estado. (76,100, 386).

Una causa importante del aumento de trasplantes debidos a hepatitis C, es la modificación de los criterios de inclusión en las listas de espera y también el que actualmente se da prioridad a los pacientes con carcinoma hepatocelular. Esto se une al incremento de la incidencia de hepatocarcinoma debido a infección por hepatitis C, incremento sustentado en la progresión propia de la enfermedad en aquellas personas infectadas previamente al descubrimiento de los mecanismos de transmisión de esta infección y que hoy en día empiezan a manifestarla. Los datos de la Comunidad Autónoma de Aragón se muestran en la Figura 1.15 (386).

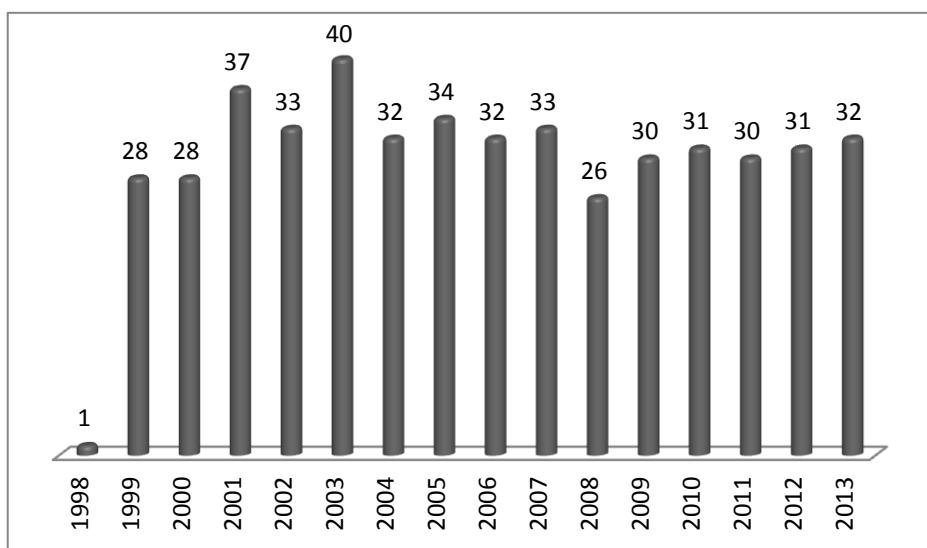


Figura I.15 - Trasplantes hepáticos en Aragón

Aunque la infección por el VHC no parece repercutir de forma negativa sobre la supervivencia del paciente en los primeros meses postrasplante, existen cada vez más evidencias del descenso de la supervivencia de estos individuos a partir del primer año del trasplante como efecto directo de la infección por el VHC.

La evolución tras el trasplante de estos pacientes es muy variable. Hoy en día sabemos que la reinfección del nuevo injerto por el virus es universal y se produce de modo muy precoz. Sin embargo, el curso del proceso infeccioso en el nuevo hígado presenta una gran variabilidad, con un espectro que oscila desde las lesiones de cambios mínimos detectados en algunos pacientes, hasta la presencia de una hepatitis colestásica fibrosante con fallo progresivo de la función hepática en muy pocos meses. La supervivencia media de estos pacientes es de 8.5 años (387), un 56.6% menos que aquellos pacientes no infectados con el VHC y transplantados por otras causas, cuya supervivencia media es de 15 años. Además, la recidiva de la infección por VHC se ha convertido en la primera causa de mortalidad a partir del primer año del trasplante hepático en los pacientes transplantados por cirrosis por VHC. Así, la supervivencia de estos pacientes a los cinco años del trasplante es del 60-70% frente al 80% en los pacientes transplantados por otras etiologías (388,389). Estos porcentajes parecen disminuir progresivamente en los trasplantes sucesivos, encontrando que la supervivencia media de los pacientes con un retrasplante por infección crónica por VHC, desciende hasta los tres años.

Del porqué tras la infección por el VHC, unos pacientes evolucionan lentamente mientras otros presentan lesiones graves en poco tiempo, poco se sabe. Hasta ahora se han analizado tanto factores dependientes del paciente como factores dependientes del virus. En cuanto al comportamiento del virus tras el trasplante, sabemos que la principal fuente de reinfección es el propio paciente. En la mayoría de pacientes la viremia nunca llega a negativizarse y se incrementa de modo considerable después del trasplante, alcanzando en poco tiempo niveles mucho más altos que los detectados antes de la intervención quirúrgica. Sin embargo, este incremento tan llamativo de los niveles de viremia no se correlaciona con un incremento de la replicación viral en el tejido hepático. Esto podría ser debido a una disminución en el aclaramiento del virus, debido al menos en parte, al tratamiento inmunosupresor (390). Existen estudios que correlacionan la evolución de las cuasiespecies del VHC antes y después del trasplante en el curso evolutivo de la reinfección (391).

La terapia antiviral, en particular el tratamiento con IFN-alfa y ribavirina, se ha mostrado eficaz únicamente en el 15-20 % de los individuos con recidiva de la infección por VHC (392-397), por lo que el resto de pacientes que no toleraban el tratamiento, no responden al mismo, estaban abocados a una evolución más rápida y agresiva de una enfermedad cuyo único tratamiento en los estadios finales sería el retrasplante hepático, con las dudas éticas y elevada morbi-mortalidad que el mismo conlleva (398-400).

Hoy en día, con los nuevos fármacos desarrollados, se ha evolucionado enormemente a la hora de implantar una terapéutica frente a la infección en pacientes previa a la realización de un trasplante hepático. En este sentido se deben tener claros los dos objetivos que se buscan. Por un lado el llegar al momento del trasplante con una carga viral indetectable a fin de minimizar los riesgos de reinfección del injerto, y por otro, mejorar la función hepática hasta el punto de poder evitar el trasplante. En este sentido, las sociedades científicas recomiendan el tratamiento antiviral a todos los pacientes VHC+ en lista de espera de trasplante hepático pero en cualquier caso, el hallarse en medio de un régimen de tratamiento no es motivo para retrasar dicho trasplante si el paciente presenta una función hepática muy deteriorada. En cuanto a la selección del tratamiento, salvo en pacientes con indicación de trasplante hepático por hepatitis C crónica, con buena función hepática (Clase A de Child-Pugh) y ausencia de hipertensión portal e hiperesplenismo significativo, no deben utilizarse pautas que contengan interferón.

Todos los estudios llevados a cabo hasta la fecha indican que el sofosbuvir, gracias a su alta barrera genética a las resistencias, será el antiviral de acción directa de elección para combinar con otros fármacos en estos pacientes. Aunque hay pocos datos, parece ser que la combinación de sofosbuvir con simeprevir (salvo en pacientes Child C), daclastavir o ledipasvir parecen ser seguras y eficaces en los pacientes a los que nos referimos, tanto compensados como descompensados. A falta de más datos parece conveniente maximizar la pauta de tratamiento utilizada (mayor duración y uso de RBV) siempre que no se comprometa la seguridad, con ello se busca que el

paciente persista 30 días o más con carga viral indetectable antes de llegar al trasplante (nivel de evidencia A1) (401).

Una vez llevado a cabo el trasplante, el tratamiento de la infección está indicado en todos los pacientes VHC+ (402). En todos los casos el tratamiento debe basarse en una pauta libre de interferón como las indicadas combinaciones de sofosbuvir con simeprevir, daclatasvir o ledipasvir (siguiendo las indicaciones para cada genotipo).

Con el objeto de conocer posibles factores asociados a desechar un hígado para el trasplante, una vez realizada la extracción del mismo, se realizan estudios pormenorizados de las variables que podían estar asociadas a esta eventualidad. La principal causa de no implante en el año 2012 (403) fue el hígado patológico (91%), siendo las causas más frecuentes la esteatosis y el aspecto macroscópico. La siguiente causa en frecuencia de descarte del órgano fue la patología sistémica (tumoral o infecciosa) en el 6% de los casos. Si bien la presencia de infección por VHC en el donante contraindicaría el trasplante, existen dos situaciones en las que el mismo podría llevarse a cabo. La primera de estas situaciones sería en el caso de que el receptor del órgano o tejido padeciera una infección actual por el mismo genotipo del virus, la segunda situación en la que se obviaría la infección en el donante sería en el caso de la existencia de un consentimiento previo informado (404). En cuanto a las variables relacionadas con la no admisión de un hígado para su implante, las que han demostrado tener un impacto real sobre la viabilidad de los hígados extraídos son únicamente edad del donante, la ECO hepática patológica y el alcoholismo (403).

2.-OBJETIVOS

En 1999 apareció publicado el primer trabajo sobre el equipo de segunda generación para la detección de antígeno del core de VHC. Este equipo ha sido evaluado en diversas poblaciones con fines diagnósticos o de cribado. Nos hemos planteado analizar la utilidad del equipo de segunda generación para la detección de la antigenemia de VHC en pacientes o situaciones complejas, para conocer sus prestaciones con mayor profundidad. En este sentido nuestros objetivos han sido:

1. Analizar la utilidad del nuevo equipo en el cribado rutinario de la infección por virus de la hepatitis C.
2. Analizar la utilidad de este método en situaciones de urgencia como la donación de órganos o los pacientes hemodializados.
3. Evaluar las limitaciones de la técnica, especialmente en los aspectos relacionados con su sensibilidad, y especificidad, con los resultados en Zona Gris y con los falsos positivos y negativos.

3.- MATERIAL

Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Se estudiaron **952 sueros de 655 pacientes**, seleccionados entre los remitidos al Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza para análisis de marcadores de hepatitis C. El periodo de estudio comprende cinco años, desde octubre 2009 hasta septiembre de 2014. Todas las muestras fueron divididas en alícuotas y conservadas a -80°C en nuestra seroteca hasta el momento del estudio que nos ocupa.

Las muestras pueden clasificarse en diferentes grupos:

Grupo 1. Es el grupo en el que se ha englobado el conjunto de pacientes estudiados, formado por 952 sueros de 655 pacientes. Los parámetros de inclusión fueron el considerarse muestras de urgencia (pacientes incluidos en algún programa de trasplantes, accidentes laborales con material biocontaminado), formar parte de grupos poblacionales con alteraciones del sistema inmune (pacientes hemodializados, pacientes VIH), haber sido diagnosticados previamente de la infección, sufrir algún tipo de factor de riesgo (pacientes internos en una prisión, adictos o exadictos a drogas por vía parenteral, padecer cirrosis hepática) o presentar cargas virales bajas (inferiores a 10^5 UI/mL) en el momento del análisis.

En todas las muestras se determinó Ag VHC y Anti-VHC (con posterior confirmación mediante LIA). Además, a 171 muestras de 158 pacientes se les realizó una cuantificación del ARN VHC mediante PCR en tiempo real.

Paralelamente se evaluaron los resultados analíticos y específicamente los correspondientes a las transaminasas.

Grupo 2. Formado por 391 sueros de 183 pacientes hemodializados. En las unidades de hemodiálisis, las enfermedades infecciosas, especialmente las que se transmiten a través de la vía hemática representan un grave problema por la gran facilidad de propagación que presentan, tanto entre los pacientes, como entre el personal sanitario. La insuficiencia renal crónica (IRC), es aquella situación patológica en la que se produce un fracaso global de todas las funciones renales, poniendo en peligro la vida del paciente a menos que se establezca una sustitución de estas funciones mediante técnicas de depuración extrarenal como la hemodiálisis, la diálisis peritoneal u otras técnicas. Debido a las características propias de la enfermedad, los pacientes pueden considerarse como inmunodeficientes. En el contexto de dicha situación, las enfermedades infecciosas pueden tener consecuencias graves o incluso fatales en la evolución de su enfermedad.

En todas las muestras se determinó Ag VHC y Anti-VHC (con posterior confirmación mediante LIA), además, a 11 muestras de ocho pacientes se les realizó una cuantificación del ARN VHC mediante PCR en tiempo real.

Grupo 3. Formado por 315 sueros de 257 pacientes implicados en algún programa de trasplante (tanto posibles donantes como posibles receptores), principalmente hepático. Rutinariamente se hace una determinación de Ag VHC y Anti-VHC a aquellos pacientes que se someten a evaluación pre trasplante, a trasplante inmediato y seguimiento post-trasplante.

En todas las muestras se determinó Ag VHC y Anti-VHC (con posterior confirmación mediante LIA), además, a 25 muestras de 24 pacientes se les realizó una cuantificación del ARN VHC mediante PCR en tiempo real. Paralelamente se evaluaron los resultados analíticos y específicamente los correspondientes a las transaminasas.

En todas las muestras se determinó Ag VHC y Anti-VHC (con posterior confirmación mediante LIA), además, a 45 sueros de 31 pacientes se les realizó una cuantificación del ARN VHC mediante PCR en tiempo real.

Paralelamente se evaluaron los resultados analíticos y específicamente los correspondientes a las transaminasas a fin de hallar una correlación (si existiera) entre la hipertransaminasemia y los valores del Ag VHC.

Las citadas determinaciones en cada uno de los grupos, se llevaron a cabo mediante un EIA de tercera generación para Ag VHC y Anti-VHC (CMIA, Architect ® Abbott Diagnostics®, Wiesbaden, Alemania). En el caso de Anti-VHC se realizó confirmación mediante line-inmunoblot assay (Inno-LIA™, Innogenetics®, Gante, Bélgica). La PCR en tiempo real se realizó mediante el equipo Cobas® AmpliPrep/ Cobas® Taqman® para VHC de la empresa Roche.

En la Tabla M.1 se detallan los grupos de pacientes estudiados:

Tabla M.1

Poblaciones evaluadas		
Grupo estudio	Nº sueros	Nº Pacientes*
1 Conjunto estudio	952	655
2 Hemodiálisis	391	183
3 Programa Trasplantes	315	257

*Algunos pacientes están incluidos en más de un grupo

3.2 TÉCNICAS

3.2.1 Detección cuantitativa de antígeno del core del VHC

Se realizó mediante el equipo comercializado Architect® 2000iSR de Abbott (Abbott Diagnostics®, Wiesbaden, Alemania). El ensayo Architect Ag VHC es un CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay) cuantitativo que utiliza micropartículas recubiertas por anticuerpos monoclonales Anti-VHC para la detección del Ag del core de VHC en suero y plasma.



Figura M.1 - Dispositivo Architect® 2000iSR

3.2.1.1 Fundamento y procedimiento

El ensayo Architect Ag VHC es un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CMIA). El formato del ensayo consta de dos pasos y emplea etapas de lavado en el que se aísla y se lava el complejo sandwich para quitar el exceso del reactivo marcado no unido y cualquier otra sustancia que interfiera. El formato no competitivo de dos pasos generalmente ofrece una elevada especificidad y sensibilidad de ensayo.

Los compuestos quimioluminiscentes son distintos de los marcados radioactivos, fluorescentes, y enzimáticos. Un marcador quimioluminiscente produce luz cuando se combina con un reactivo “trigger”. Aunque muchos instrumentos en el laboratorio clínico se basan en la tecnología quimioluminiscente, el tipo específico de marcador varía y a menudo está patentado, y por ello puede variar el proceso. En el caso de Abbott ARCHITECT® (Abbott Diagnostics®, Wiesbaden, Alemania) el marcador es un derivado de acridina patentado. Este marcador produce una alta emisión de luz, y por consiguiente alta sensibilidad (es más fácil medir una gran concentración de luz).

3.2.1.2 Reactivos

Una vez abiertos los reactivos son utilizables hasta 15 días almacenados a 2-8°C (en su defecto, hasta su fecha de caducidad).

- Micropartículas: micropartículas paramagnéticas recubiertas por anticuerpos monoclonales murinos Anti-VHC.
- Conjugado: anticuerpos murinos monoclonales Anti-VHC marcados con acridina.
- Reactivos de pre-tratamiento 1 y 2
- Diluyente específico del ensayo.
- Diluyente de la muestra
- Solución Trigger (contiene hidróxido sódico) y pre-Trigger (contiene peróxido de hidrógeno)
- Tampón de lavado

3.2.1.3 Muestras

Se puede usar suero o plasma (EDTA, heparina, citrato sódico, CPD) sin restos celulares. Las muestras pueden almacenarse hasta 5 días a 2-8 °C. Si la determinación se va a retrasar más de cinco días debe almacenarse el plasma o suero aislado a -20º o menos. Evitar más de dos ciclos de congelación-descongelación.

3.2.1.4 Controles de calidad

Deben realizarse los controles una vez cada 24 horas.

- Los valores de los controles del Architect Ag VHC deben estar dentro de los rangos de referencia especificados en el lote. Si uno de los controles está fuera de su rango de referencia las pruebas asociadas a éste no serán válidas y deberán ser repetidas (se nos indicará que recalibremos de nuevo el equipo).

3.2.1.5 Interpretación de los resultados

- Las muestras con valores < 3,00 fmol/L se consideran negativas a Ag VHC.
- Las muestras con valores ≥ 3 fmol/L se consideran positivas a Ag VHC
- Las muestras con valores ≥ 3 fmol/L y < 10 fmol/mL se consideran indeterminados por lo que se repiten por duplicado. Se

consideraran positivas aquéllas muestras con valores >3 fmol/L en uno o ambos duplicados y negativas si ambos duplicados fueron < 3 fmol/L.

En la nota de corrección de producto de 20 de noviembre de 2009, el fabricante hace dos recomendaciones:

1. Procesar las técnicas de Ag VHC y Anti-VHC en autoanalizadores diferentes o, en caso contrario, realizar el Ag VHC de forma separada, tras haber realizado las operaciones de mantenimiento, para evitar un fenómeno de arrastre que pudiera provocar incrementos en el valor de Ag VHC de aproximadamente 4 fmol/L, cuando esta prueba se realiza inmediatamente después de una determinación de Anti-VHC con resultado positivo.
2. Repetir por duplicado las muestras con concentraciones entre 3 y 15 fmol/L.

Nosotros hemos seguido esta segunda recomendación, pero considerado Zona Gris los valores repetidamente positivos entre 3 y 10 fmol/L.

3.2.2 Detección cuantitativa del ARN del VHC

Se realizó mediante el equipo de PCR a tiempo real (RT-PCR) comercializado por Roche Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC test. Se trata de una técnica de amplificación in vitro de ácidos nucleicos para la determinación cuantitativa de ARN del virus de la hepatitis C en suero o plasma humano usando el Cobas® AmpliPrep para el procesamiento automatizado de las muestras y el analizador Cobas® Taqman®.

3.2.2.1 Fundamento

El equipo Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC se basa en tres procesos principales: En primer lugar se prepara la muestra para aislar el ARN de VHC; en segundo lugar se lleva a cabo una transcripción inversa de la hebra de ARN para generar otra de ADN complementario (cDNA); en tercer y último

lugar simultáneamente se produce una amplificación de la hebra de cDNA y una detección de las sondas de oligonucleótidos marcados de secuencia complementaria a dicha hebra.

El Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® utiliza transcripción inversa y primers de amplificación para PCR dirigidos a las secuencias más conservadas de la región 5'UT del genoma de VHC. La secuencia de nucleótidos de los primers ha sido optimizada de tal forma que no se den diferencias entre los diferentes genotipos.

1. Preparación:

Esta técnica precisa no menos de 850 µl de plasma o suero para poder llevarse a cabo. Las partículas del virus VHC son lisadas mediante una incubación a elevada temperatura con un agente proteolítico y caotrópico, que libera los ácidos nucleicos y protege el ARN del VHC de las ARN-asas presentes en el suero o plasma.

Junto con la muestra, se introduce un agente proteolítico y caotrópico y, además también partículas magnéticas, así como una cantidad determinada de QS del VHC. El QS del VHC es un transcripto de ARN no infeccioso que contiene secuencias del VHC con los mismos sitios de unión al iniciador que el ARN objetivo del VHC y una región exclusiva de unión a la sonda que permite distinguir el amplicón del QS del VHC del amplicón del VHC objetivo (el QS del VHC compensa los efectos de inhibición y controla los procesos de preparación y amplificación para permitir una determinación cuantitativa más exacta del ARN presente en cada muestra). La mezcla es incubada y el ARN de VHC y el ARN del QS del VHC quedarán unidos a la superficie partículas magnéticas. Así, al realizar un lavado de las partículas magnéticas el resto de sustancias no unidas a éstas, como pueden ser sales, diversas proteínas u otros restos celulares resultarán eliminados.

A continuación los ácidos nucleicos adsorbidos son eluídos de las perlas a temperatura elevada mediante una solución acuosa. Entonces las partículas magnéticas, junto con el ARN VHC y el ARN VHC QS se

introduce en el Cobas® Taqman®, se lleva a cabo la mezcla de amplificación. Ahí, como ya hemos dicho, se producirá la transcripción, amplificación y detección simultánea de las secuencias mediante la escisión de una sonda oligonucleótida doblemente marcada específica del objetivo y del QS.

2. Transcripción inversa y amplificación:

La transcripción inversa y la amplificación se lleva a cabo utilizando una enzima recombinante termoestable ADN polimerasa de *Thermus specie* (Z05). En presencia de manganeso (Mn^{+2}) y bajo condiciones tampón apropiadas, Z05 presenta tanto actividad de transcriptasa inversa como de ADN polimerasa. Esto permite que la transcripción inversa y la amplificación mediante PCR puedan ocurrir junto con la detección en el tiempo real del amplicón.

2.1.-Transcripción inversa

La mezcla de reacción se calienta permitiendo que el primer se une específicamente a las secuencias diana en el ARN viral y en el ARN QS. En presencia de manganeso (Mn^{+2}) y exceso de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, incluyendo desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina y deoxiuridina trifosfato) la polimerasa extiende los cebadores hibridados formando una cadena de DNA complementaria (cADN) de la secuencia de ARN diana.

2.2.- Amplificación

Una vez se ha llevado a cabo la transcripción inversa del VHC ARN y del VHC ARN QS, el termociclador del Cobas® Taqman® calienta la mezcla de reacción de forma que desnaturaliza el híbrido ARN-cADN dejando la cadena cADN, el ARN y los cebadores libres. Entonces se enfriá la mezcla y así los cebadores se unen a la cadena de ADNA previamente generada. En presencia de manganeso (Mn^{+2}) y exceso de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, incluyendo desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina y desoxiuridina

trifosfato) la polimerasa Z05 extiende los cebadores hibridados formando una cadena de DNA bicatenario denominada amplicón. El Cobas® Taqman® repetirá este proceso un número concreto de ciclos, pretendiéndose con cada ciclo el doblar la cantidad de ADN amplicón. La amplificación sucederá únicamente en la región del ARN VHC incluida entre los primers, no se amplifica por lo tanto el genoma completo.

Para que esta amplificación sea selectiva, el Cobas® Taqman® utiliza la enzima AmpErasa (uracil-N-glucosilasa) y trifosfato de deoxiuridina (dUTP). La enzima AmpErasa reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen deoxiuridina, pero no del ADN que contiene deoxitimidina. El ADN natural carece de deoxiuridina pero sin embargo, ésta está siempre presente en el amplicón debido al uso del trifosfato de deoxiuridina como uno de los dNTP en el reactivo de la mezcla maestra. Por lo tanto, sólo el amplicón contiene deoxiuridina. La deoxiuridina hace que el amplicón contaminante sea susceptible de ser destruido por la enzima AmpErasa antes de la amplificación del ADN objetivo. Del mismo modo, la enzima AmpErasa destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar tras la activación inicial de la mezcla maestra por el manganeso. La enzima AmpErasa, que se incluye en el reactivo de la mezcla maestra, cataliza la escisión del ADN que contiene deoxiuridina en los residuos de deoxiuridina abriendo la cadena de deoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta en el primer paso por el ciclo térmico, la cadena de ADN del amplicón se rompe en la posición de la deoxiuridina, lo que hace que el ADN ya no pueda amplificarse. La enzima AmpErasa permanece inactiva durante largos periodos de tiempo una vez expuesta a temperaturas superiores a los 55°C, es decir, durante los pasos del ciclo térmico y, por consiguiente, no destruye el amplicón diana. Después de la amplificación, cualquier enzima residual se desnaturaliza por la solución desnaturalizante, evitándose la degradación del amplicón diana.

3. Detección de los productos de la PCR

La prueba Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC utiliza tecnología de PCR en tiempo real. El uso de sondas fluorescentes doblemente marcadas permite detectar en tiempo real la acumulación de productos de la PCR monitorizando la intensidad de emisión de los productos fluorescentes liberados durante el proceso de amplificación. Las sondas incluyen sondas oligonucleótidas específicas de VHC y del QS del VHC con un emisor y un atenuador. En la prueba Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC, las sondas del VHC y del QS del VHC están marcadas con distintos emisores. Cuando las sondas están intactas, la proximidad del atenuador inhibe la fluorescencia del emisor debido a efectos de transferencia de energía tipo Förster. Durante la PCR, la sonda hibrida con una secuencia objetivo y se escinde por la actividad nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05 termoestable. Una vez que el emisor y el atenuador se liberan y separan, cesa la actividad inhibidora y aumenta la fluorescencia del emisor. La amplificación del ARN del VHC y el ARN del QS del VHC se miden de forma independiente a distintas longitudes de onda. Este proceso se repite durante un número de ciclos determinado, aumentando en cada ciclo la intensidad de emisión de cada uno de los emisores individuales, lo que permite la identificación independiente del ARN del VHC y del ARN del QS del VHC. El ciclo de PCR en el que la curva de crecimiento adquiere forma exponencial está relacionado con la cantidad de material de partida presente al inicio de la reacción PCR.

4. Cuantificación

La prueba Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC es inherentemente cuantitativa en un intervalo dinámico muy amplio, ya que la monitorización del amplicón se realiza durante la fase exponencial de la amplificación. Cuanto mayor sea la concentración de VHC en una muestra, antes se apreciará la fluorescencia del emisor de la sonda del VHC por encima del nivel de fluorescencia de referencia. Puesto que la cantidad de ARN del QS del VHC es la misma para todas las muestras, la fluorescencia del emisor de la sonda del QS del VHC debería

aparecer en el mismo ciclo para todas ellas. En muestras en las que la fluorescencia del QS pueda verse afectada, la concentración se ajusta en consonancia. La aparición de señales fluorescentes específicas se comunica como un valor umbral crítico (Ct). El Ct se define como el número de ciclos fraccionales donde la fluorescencia del emisor superó un umbral predeterminado (el nivel de fluorescencia asignado) y comienza la fase de crecimiento exponencial de esta señal. Valores de Ct más altos indican una concentración menor de material objetivo del VHC inicial. Un aumento al doble del título corresponde a una disminución de un Ct para el ADN del VHC objetivo, mientras que una disminución de 3,3 Ct corresponde a un aumento de 10 veces en el título.

Por lo tanto, el Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® cuantifica el ARN vírico del VHC utilizando una segunda secuencia objetivo que se añade a una concentración conocida a cada muestra de la prueba. El QS del VHC es un transcripto de Armored ARN no infeccioso que contiene fragmentos de secuencias del VHC con las mismas regiones de unión al iniciador que la secuencia objetivo del VHC. El QS del VHC genera un producto de amplificación de la misma longitud y composición de bases que el ARN objetivo del VHC. La región de unión a la sonda de detección del QS del VHC ha sido modificada para diferenciar el amplicón del QS del amplicón del VHC objetivo.

Durante la fase de hibridación de la reacción PCR, en el analizador, las muestras se iluminan y excitan con luz filtrada, recogiéndose los datos de emisión de fluorescencia filtrada correspondientes a cada muestra. Las lecturas obtenidas para cada muestra se corrigen a continuación para compensar las fluctuaciones instrumentales. El instrumento envía esas lecturas de fluorescencia al software Amplilink, que las almacena en una base de datos. Se utilizan comprobaciones previas para determinar si los datos de ARN del VHC y ARN del QS del VHC constituyen conjuntos válidos, generándose avisos cuando los datos estén fuera de los límites prefijados. Una vez completadas y superadas

todas las comprobaciones previas, las lecturas de fluorescencia se procesan para generar valores de Ct para el ARN del VHC y el ARN del QS del VHC. Se utilizan constantes de calibración específicas del lote para calcular la concentración de las muestras y los controles en base a los valores Ct obtenidos para el ARN del VHC y el ARN del QS del VHC. La prueba Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC está estandarizada frente al primer patrón internacional de la OMS para ARN del virus de la hepatitis C en pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, los valores de concentración se comunican en unidades internacionales (UI/mL).

3.2.2.2 Reactivos

- VHC CS1-Cassette de reactivo de partículas magnéticas para VHC, 93% isopropanol.
 - Conservar entre 2-8 °C
 - Una vez usado el reactivo es estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2-8 °C o hasta la fecha de caducidad si esta es anterior a esos 28 días.
 - Puede utilizarse un máximo de 4 ciclos instrumentales hasta acumular un máximo de 64 horas totales en el instrumento Cobas® AmpliPrep.
- VHC CS2-Cassette de reactivo de lisis para VHC: citrato de sodio dihidratado, tiocianato de guanidina 45%, polidocanol < 14%, ditiotreitol < 0,9%).
 - Conservar entre 2-8 °C
 - Una vez usado el reactivo es estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2-8 °C o hasta la fecha de caducidad si esta es anterior a esos 28 días.
 - Puede utilizarse un máximo de 4 ciclos instrumentales hasta acumular un máximo de 64 horas totales en el instrumento Cobas® AmpliPrep.

- VHC CS3-Cassette multireactivo para VHC que contiene:
 - Pase: tampón Tris, cloruro cálcico, acetato de calcio, EDTA (<0,05%), glicerol y proteasa (\leq 7,8%)
 - EB: Tampón de elución compuesto por tampón Tris-base, metilparabén (0,2%).
 - Conservar entre 2-8 °C
 - Una vez usado el reactivo es estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2-8 °C o hasta la fecha de caducidad si esta es anterior a esos 28 días.
 - Puede utilizarse un máximo de 4 ciclos instrumentales hasta acumular un máximo de 64 horas totales en el instrumento Cobas® AmpliPrep.
- VHC CS4-Cassette de reactivo específico para la prueba de VHC que contiene :
 - VHC QS: Patrón de determinación cuantitativa de VHC que se compone de: Tampón Tris, EDTA, ARN Poli Ar (sintético, <0,002%), fragmento ARN VHC delimitado que contiene secuencias de unión al iniciador del VHC y una región exclusiva de unión a la sonda (<0,001%), azida sódica (0.05%).
 - VHC MMX: Mezcla maestra para VHC que se compone de: Tampón tricina, acetato potásico, hidróxido potásico, de dimetilsulfóxido (< 20%), glicerol, nucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,004%), iniciadores sentido y antisentido del VHC correspondientes a la región (UTR) 5' del VHC(<0,002%), sondas oligonucleótidas fluorescentes específicas del VHC y del patrón de determinación cuantitativa del VHC (<0,001%), aptámero oligonucleótido (<0,001%), ADN polimerasa Z05(microbiana) (<0,05%), enzima AmpErase (uracil-N-glucosilasa) (microbiana) (<0,1%), azida sódica (0,09%).

- CAP/CTM Mn²⁺: Solución de manganeso para CAP/CTM compuesta por: Acetato de manganeso (< 0,5%), ácido acético glacial, azida sódica (0,09%).
 - Conservar entre 2-8 °C
 - Una vez usado el reactivo es estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2-8 °C o hasta la fecha de caducidad si esta es anterior a esos 28 días.
 - Puede utilizarse un máximo de 4 ciclos instrumentales hasta acumular un máximo de 64 horas totales en el instrumento Cobas® AmpliPrep.
- VHC H (+)C -Control positivo alto de VHC que contiene:
 - Fragmento de ARN de VHC protegido que incluye secuencias del VHC (ARN no infeccioso en el bacteriófago MS2) (<0,001%), plasma humano negativo (no reactivo según pruebas de anticuerpos frente al VHC, VIH-1/2, antígeno p24 del VIH y HBsAg, ARN del VIH-1, ARN del VHC y ADN del VHB no detectables mediante métodos de PCR), conservante Proclin® 300 (0,1%).
 - Conservar entre 2-8 °C.
 - El control es estable hasta la fecha de caducidad.
 - Una vez abierto el envase, debe desecharse cualquier porción sobrante.
- VHC L (+)C - Control positivo bajo de VHC que contiene:
 - Fragmento de ARN de VHC protegido que incluye secuencias del VHC (ARN no infeccioso en el bacteriófago MS2) (< 0,001%), plasma humano negativo (no reactivo según pruebas de anticuerpos frente al VHC, VIH-1/2, antígeno p24 del VIH y HBsAg, ARN del VIH-1, ARN del VHC y ADN del VHB no detectables mediante métodos de PCR), conservante Proclin® 300 (0,1%).
 - Conservar entre 2-8 °C
 - El control es estable hasta la fecha de caducidad

- Una vez abierto el envase, debe desecharse cualquier porción sobrante
- CTM (-) C -Control negativo para Cobas® Taqman® que contiene:
 - Plasma humano negativo (no reactivo según pruebas de anticuerpos frente al VHC, VIH-1/2, antígeno p24 del VIH y HBsAg, ARN del VIH-1, ARN del VHC y ADN del VHB no detectables mediante métodos de PCR), conservante Proclin® 300 (0,1%).
 - Conservar entre 2-8 °C
 - El control es estable hasta la fecha de caducidad
 - Una vez abierto el envase, debe desecharse cualquier porción sobrante
- Reactivo de lavado Cobas®AmpliPrep/Cobas® Taqman® VHC:
 - PG WR contiene: Citrato sódico dihidratado, N-metilisotiazolona-HCl (< 0,1 %)
 - Almacenar a una temperatura comprendida entre 2 y 30°C.
 - Es estable hasta la fecha de caducidad indicada.
 - Una vez abierto, el reactivo es estable durante 28 días a una temperatura comprendida entre 2 y 30 °C o hasta su fecha de caducidad si ésta es inferior a esos 28 días.

3.2.2.3 Muestras

Suero o plasma humano obtenido con EDTA como anticoagulante únicamente. La heparina inhibe la PCR. La realización de la prueba en otros tipos de muestra puede dar lugar a resultados inexactos. La sangre total debe almacenarse a una temperatura de a 2 a 25 °C durante un tiempo no superior a seis horas. Debe separarse el suero o el plasma de la sangre entera en las seis horas posteriores a su recogida mediante centrifugación a 800-1600 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de suero o plasma se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 a 8 °C durante un tiempo máximo de tres días o congeladas a temperatura de -70°C o inferior. Las

muestras pueden congelarse-descongelarse hasta dos veces sin que se produzca pérdida de ARN del VHC.

3.2.2.4 Técnica

PRE-AMPLIFICACIÓN

A. Pasos previos

- Si se utilizan muestras congeladas deben dejarse a temperatura ambiente hasta que se hayan descongelado completamente.
- Una vez descongeladas deben mezclarse en un vortex (de tres a cinco segundos) antes de usarlas.
- Los controles se deben extraer de su lugar de almacenamiento a temperatura de 2 a 8 °C, con tiempo suficiente para que se equilibren a temperatura ambiente antes de usarlos.

B. Mantenimiento y cebado

B.1 El instrumento Cobas® AmpliPrep está listo para su funcionamiento en modo stand by.

B.2 Encender la estación de datos del software AMPLILINK iniciando sesión en Windows® XP y en el software AMPLILINK (introduciendo los datos de usuario y contraseña pertinentes).

B.3 Comprobar el suministro de PG WR en la pantalla “Status” y reponer en caso necesario.

B.4 Llevar a cabo todas las tareas de mantenimiento indicadas en las pestaña “Due”. El instrumento Cobas® AmpliPrep procederá automáticamente al cebado del sistema.

C. Carga de cassettes de reactivo

C.1 Todos los cassettes de reactivo se deben extraer de su lugar de almacenamiento a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C para cargarlos inmediatamente en el instrumento Cobas® AmpliPrep y dejar que alcancen el equilibrio a la temperatura ambiente en el instrumento durante al menos 30 minutos antes de proceder a procesar la primera

muestra. Debe evitarse que los cassettes de reactivo alcancen la temperatura ambiente fuera del instrumento, ya que podría formarse condensación en las etiquetas de código de barras.

C.2 Se introduce el VHC CS1 en una rejilla de reactivo. VHC CS2. VHC CS3 y VHC CS4 se introducen en otra rejilla de reactivo distinta.

- Se carga la rejilla de reactivo que contiene VHC CS1 en la posición de rejilla A del instrumento Cobas® AmpliPrep.
- La rejilla contendedora de VHC CS2. VHC CS3 y VHC CS4 se carga en la posición B, C, D o E del equipo.

D. Carga de consumibles

D.1 Se debe determinar el número de cassettes de reactivo Cobas® AmpliPrep, unidades de procesamiento de muestras (SPUs), tubos de muestra (tubo S), puntas K y tubos K necesarios. Se necesitan una SPU, un tubo S de entrada, una punta K y un tubo K por cada muestra o control.

D.2 Se coloca las SPUs en las rejillas de SPU y se cargan dichas rejillas en las posiciones J, K o L del instrumento.

D.3 Se cargan las rejillas llenas de puntas K en la posición de rejilla M, N, O o P del instrumento.

E. Peticiones y carga de muestras

E.1 Preparación de las rejillas de muestras:

1. Se coloca un *rack* con etiqueta de código de barras en cada posición de la rejilla de muestras donde se vaya a colocar una muestra (tubo S).
2. Se coloca un *rack* con etiqueta de código de barras específicos para los controles [CTM (-) C, VHC L (+) C y VHC H (+) C] en cada posición de la rejilla de muestras donde se vaya a colocar un control (tubo S).

3. Los *rack* con etiquetas de códigos de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el equipo. Debe prestarse atención para colocar cada control correctamente en la posición que tenga el clip del código de barras apropiado.
4. Se coloca un tubo S en cada posición que contenga un *rack* de etiqueta de código de barras.

E.2 Utilizando el software Amplilink se crean peticiones de muestras para cada muestra y control en la carpeta “Sample” de la ventana “Orders”. Ahí se selecciona el archivo de prueba apropiado y se completa la operación guardándolo.

E.3 Se asignan las peticiones de muestras y controles a las posiciones de la rejilla de muestras en la carpeta “Sample Rack” de la ventana “Orders”. El número de rejilla de muestras debe corresponder a la rejilla preparada en el paso E1.

E.4 Se imprime el informe “Sample Rack Order” para usarlo como hoja de trabajo.

E.5 Se preparan las rejillas para muestras y controles, en el área designada para añadir las muestras y los controles del siguiente modo:

1. Se vortea cada una de las muestras y los controles [CTM (-) C, VHC L (+) C y VHC H (+) C] de tres a cinco segundos.
2. Hay que extremar las precauciones para evitar la contaminación de los guantes durante la manipulación de las muestras y los controles.

E.6 Se transfieren de 1000 a 1050 μ l de cada muestra y control [CTM (-)C, VHC L (+) C y VHC H (+) C] al tubo S con la etiqueta de código de barras apropiada, utilizando para ello un micropipeteador con punta sin ribonucleasa y filtro para aerosol o desplazamiento positivo. Se debe evitar la transferencia de particulados y/o coágulos de fibrina, que pudieran estar presentes en la muestra original, al tubo S. Las muestras

y los controles se deben transferir a las posiciones de tubo asignadas y registradas en la hoja de trabajo en el paso D4. Los *rack* de los códigos de barras de los controles deben tener el mismo número de lote de control que los viales de control incluidos en el equipo. Se debe asignar a cada control correctamente a la posición que tenga el clip del código de barras apropiado. Tomar precauciones para evitar la contaminación de la parte superior de los tubos S con muestras o controles.

E.7 Se deben cargar entonces la rejilla o las rejillas de muestras llenas de tubos S en la posición de la rejilla F, G o H del instrumento.

F. Inicio de la serie en el instrumento Cobas® AmpliPrep.

F.1 Debe iniciarse el instrumento Cobas® AmpliPrep utilizando el software Amplilink.

G. Finalización de la serie en el instrumento Cobas® AmpliPrep y transferencia al analizador Cobas® Taqman®.

G.1 Tras comprobar si ha habido algún mensaje de error se retiran las muestras y los controles procesados del instrumento Cobas® AmpliPrep en las rejillas de muestra.

G.2 A continuación se evacuarán los residuos del instrumento Cobas® AmpliPrep.

G.3 No deben exponerse a la luz las muestras y los controles procesados después de completarse la preparación de las muestras y controles.

AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN

H. Configuración del analizador Cobas® Taqman®

H.1 Se debe iniciar la serie en el analizador Cobas® Taqman® dentro de los 120 minutos siguientes a completarse la preparación de las muestras.

- No deben congelarse ni almacenarse las muestras o controles procesados a una temperatura comprendida entre 2-8 °C

H.2 Carga de muestras procesadas: Dependiendo de la configuración utilizada existen dos maneras:

- Configuración 1: Se debe transferir automáticamente del vehículo K, a través de la estación de interconexión, al analizador Cobas® Taqman®. No se requiere intervención manual.
- Configuraciones 2 y 5: Se procede mediante una transferencia manual de los tubos K en las rejillas de muestras al analizador Cobas® Taqman®.

I. Inicio de la serie en el analizador Cobas® Taqman®:

I.1 Esta parte del proceso también depende de la configuración utilizada:

- Configuración 1: No se requiere intervención por parte del operario.
- Configuración 2 y 5: Tras la inserción de las rejillas de la muestra se lleva a cabo un inicio automático del analizador Cobas® Taqman®.

J. Finalización de la serie en el analizador Cobas® Taqman®:

J.1 Una vez completada la serie en el analizador Cobas® Taqman® se procede a imprimir el informe de resultados. Se debe comprobar si hay algún aviso o mensaje de error en él. Tras aceptarlos se debe guardar los datos en un archivo

J.2 Se retiran los tubos K usados del analizador Cobas® Taqman®.

3.2.2.5Resultados

El analizador Cobas® Taqman® determina automáticamente la concentración de ARN del VHC presente en las muestras y los controles. La concentración de ARN del VHC se expresa en unidades internacionales (UI/mL).

El software Amplilink:

- Determina el valor del ciclo umbral (Ct) correspondiente al ARN del VHC y al ARN del QS del VHC.
- Determina la concentración del ARN del VHC en base a los valores de Ct calculados para ARN del VHC y ARN del QS del VHC y los coeficientes de calibración específicos del lote, incluidos en los códigos de barras de los cassettes.
- Determina si las UI/mL calculadas para VHC L(+)C y VHC H(+)C están dentro de los intervalos asignados.

VALIDACIÓN DE LOS LOTES E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Validación de lotes para Amplilink versión 3.3 Series

Al realizar los controles, el equipo lleva a cabo una comprobación para determinar si el valor en UI/mL correspondiente a dichos controles está dentro del intervalo especificado.

Si el valor en UI/mL correspondiente al control está fuera del intervalo asignado, se genera un aviso para indicar que el control no ha superado la prueba. El lote es válido si no hay avisos para ninguno de los controles [VHC L (+) C, VHC H (+) C y CTM (-) C]. El lote no es válido si aparece cualquiera de los avisos siguientes (Tabla M.2) en los controles del VHC:

Tabla M.2 - Posibles avisos del analizador Cobas® Taqman®

AVISO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Control negativo		
_N_NC_INVALID	Invalid	Un resultado no válido o un resultado “válido” que no fue negativo para el VHC objetivo
Control positivo bajo del VHC		
LPCINVALID	Invalid	Resultado no válido o control fuera de intervalo
Control positivo alto del VHC		
HPCINVALID	Invalid	Resultado no válido o control fuera de intervalo

Si el lote no es válido, se debe repetir todo el lote incluyendo los pasos de preparación, transcripción reversa, amplificación y detección de las muestras y los controles.

2. Interpretación de resultados

Para lotes válidos, se deben comprobar los posibles avisos o comentarios asociados a cada muestra en la impresión de los resultados. Debe interpretarse los resultados de la manera descrita en la Tabla M.3.

Tabla M.3 - Interpretación resultados Cobas® Taqman®**RESULTADO DEL TÍTULO****INTERPRETACIÓN**

Target not Detected	El valor Ct obtenido para el VHC está por debajo del límite de ensayo o no se ha obtenido un valor de Ct para el VHC. Se debe comunicar el resultado como “ARN del VHC no detectado”.
< 1.50E+01 IU/mL	Las IU/mL calculadas están por debajo del intervalo del ensayo. Se debe comunicar el resultado como “ARN del VHC detectado, menos de 15 UI de ARN del VHC/mL”.
≥ 1.50E+01 IU/mL < 4.30E+01 IU/mL	Los resultados calculados de UI/mL están por debajo del límite inferior del intervalo lineal del ensayo. Estos resultados muestran un elevado grado de variabilidad y, por lo tanto, no se consideran exactos. Los resultados se deben interpretar con cautela.
≥ 4.30E+01 IU/mL ≤ 6.90E+07 IU/mL	Los resultados calculados superiores o iguales a 43 UI/mL e inferiores o iguales a 6,90E+07 UI/mL se encuentran dentro del intervalo lineal del ensayo.
> 6.90E+07 IU/mL	Las UI/mL calculadas están por encima del intervalo del ensayo. Se debe comunicar el resultado como “más de 6,90E+07 UI de ARN del VHC/mL”. Si se desea obtener un resultado cuantitativo debe diluirse la muestra original con suero humano o plasma humano recogido en EDTA, en función de la matriz de la muestra original, negativo para VHC y repetirse la prueba. Después se multiplica el resultado comunicado por el factor de dilución.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Las muestras cuya concentración esté por encima del intervalo del ensayo y que generen un resultado no válido con el aviso “QS_INVALID” no deberían notificarse como “más de 6.9E+07 IU/mL”. La muestra original debería diluirse con plasma humano negativo para VHC recogido con EDTA debería repetirse la prueba. Se debe multiplicar el resultado comunicado por el factor de dilución. ▪ Resultado del título “Failed”: Se interpreta como que la muestra no se ha procesado correctamente durante su preparación en el equipo Cobas® AmpliPrep. ▪ Resultado del título “Invalid”: Se interpreta como que el resultado no es válido. 	

CONTROL DE CALIDAD

En cada lote de determinaciones se debe incluir una réplica de cada uno de los controles Negativo, positivo bajo y positivo alto para VHC. El lote es válido si no aparecen avisos para ninguno de los controles [VHC L (+) C, VHC H (+) C y CTM (-) C].

-Control negativo

- El control CTM (-) C debe dar un resultado “Target not detected”. Si el resultado obtenido para CTM (-) C es consistentemente no válido en varios lotes, debe contactarse con la empresa fabricante del sistema.

-Controles positivos

- El intervalo asignado a VHC L (+) C y VHC H (+) C es específico para cada lote de reactivo; está incluido en los códigos de barras de los cassettes de reactivo para la prueba Cobas® AmpliPrep / Cobas® Taqman® VHC.

Los valores de IU del ARN del VHC/mL obtenidos para VHC L (+) C y VHC H (+) C deben estar dentro de los respectivos intervalos asignados. Si uno o ambos controles positivos tienen el aviso de no válido, todo el lote es no válido. Se debe repetir todo el proceso (preparación de las muestras y controles, amplificación u detección). Si el título de ARN del VHC de uno o ambos controles positivos está consistentemente fuera del intervalo asignado en varios lotes, debe contactarse con la empresa fabricante del sistema.

3.2.3 Determinación del Genotipo VHC

En este caso se ha utilizado en Versant® VHC Genotype 2.0 (LiPA), un ensayo LiPA para uso diagnóstico in vitro que identifica los genotipos de 1 a 6 del virus de la hepatitis C (VHC) y los subtipos a y b del genotipo 1 en muestras de suero humano o de plasma EDTA. En la mayoría de los casos también puede ofrecer información adicional del subtipo. Este equipo únicamente se

utiliza con muestras con resultado positivo de ARN del VHC y en el marco de este estudio solo se realizó en aquellas muestras donde el facultativo clínico lo solicitó. La lectura de las tiras se realizó en el equipo Auto-LiPA™ (Innogenetics®, Gante, Bélgica).

3.2.3.1 Fundamento

El ensayo VERSANT VHC Genotype 2.0 (Lipa) utiliza hibridación inversa. El producto DEN de PCR biotinilado, generado por la amplificación de RT-PCR de las regiones 5'UTR y core del ARN del VHC, se hibrida en sondas de oligonucleótidos inmovilizados. Las sondas, que están adheridas a una tira de nitrocelulosa por una cola de poli(dT), son específicas de las regiones 5'UTR y core de diferentes genotipos del VHC.

Después del paso de hibridación, se lava el producto de PCR sin hibridar de la tira y se une estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (conjugado) al híbrido biotinilado. El cromógeno BCIP/NTB (sustrato) reacciona con el complejo de estreptavidina-fosfatasa alcalina para formar un precipitado de color morado/marrón, que produce un patrón de bandas visible en la tira.

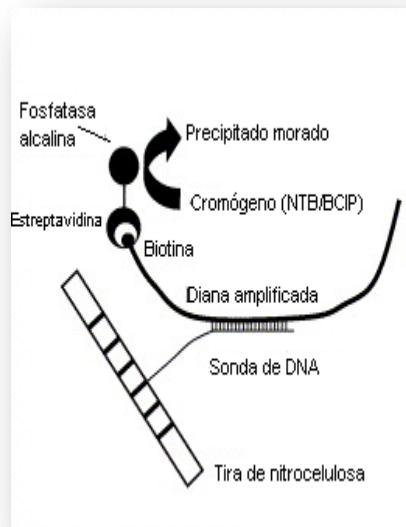


Figura M.2 - Pasos reacción genotipado VHC

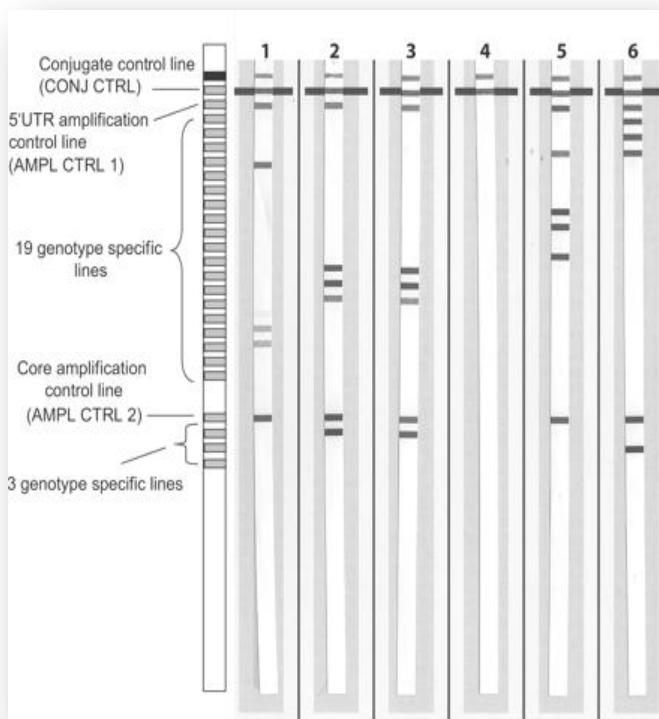


Figura M.3 - Patrón de bandas en el genotipado VHC

3.2.3.2 Muestras

El ensayo Versant VHC Genotype 2.0 (LiPA) utiliza un producto de ADN de PCR, concretamente utiliza un amplicón de ADNc biotinilado específico para las regiones 5`UTR y Core del genoma del VHC. Este ensayo requiere una muestra mínima de 10 µl del producto de PCR y el rango de concentraciones de carga viral dentro del cual es apta esta prueba oscila desde 2173 IU/ml a 8.700.000 IU/ml. Después de realizar el paso del ensayo correspondiente a la desnaturación, se debe guardar el resto del producto de PCR a una temperatura de -20°C ± 5°C. El producto de PCR debe almacenarse un máximo de 4 meses a -20°C ± 5°C y debe evitarse la congelación-descongelación repetida de dicho producto.

3.2.3.3 Reactivos

- Membranas de nitrocelulosa recubiertas con sondas de oligonucleótidos. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Conjugado concentrado (CONJ 100X) que contiene estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina con <0,1% de 2-cloroacetamida,

estabilizadores de proteínas y otros conservantes. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.

- Diluyente conjugado (CONJ DIL), que contiene solución de tampón fosfato con 0,1% de 2-cloroacetamida, detergentes, estabilizadores de proteínas y otros conservantes. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Solución desnaturalizante (DENAT SOLN) que contiene 1,7% de hidróxido sódico. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Solución de lavado estricto (HYB/SW SOLN) e hibridación con cloruro sódico, tampón de citrato sódico con detergente y conservantes. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Solución de aclarado concentrada (RINSE SOLN 5X) con tampón de fosfato y 0,5% de 2-cloroacetamida, NaCl, detergente y otros conservantes. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Tampón de sustrato (SUBS BUF) que contiene solución tampón de TRIS con 0,1% de 2-cloroacetamida, MgCl₂, NaCl y otros conservantes. Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Sustrato que contiene 1,6% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y 4 nitroazul de tetrazolio de dimetilformamida 83% (SUBS BCIP/NBT 100X). Debe almacenarse entre 2°C y 8°C.
- Bandejas de incubación desechables de plástico.
- Tarjetas de lectura para identificar las bandas positivas de cada tira.
- Cuadro de interpretación: proporciona patrones de bandas para identificación de genotipos.

3.2.3.4 Procedimiento de ensayo

Este procedimiento consta de cuatro fases principales: desnaturalizar las muestras, hibridar las muestras, lavar las tiras y revelar en color.

PRECAUCIONES DURANTE EL PROCESO

- Antes de empezar todo el procedimiento, deben ponerse todos los reactivos y las tiras de análisis a temperatura ambiente (20-25°C aproximadamente 45 minutos antes de empezar) y deben devolverse al congelador inmediatamente después.

- Las tiras durante todo el proceso deben manejarse con pinzas (en ningún caso con las manos ya que la grasa cutánea podría afectar a la hibridación y revelado del color).
- Para escribir en las tiras, debe usarse únicamente un lápiz. Los reactivos del ensayo podrían borrar la tinta de las tiras.
- Es importante conservar la relación entre la identificación de la muestra a partir del producto de amplificación de RT-PCR y la tira.
- Puede utilizarse la hoja de información de datos o un formulario equivalente para registrar información adicional de la muestra para cada número de tira.
- Para evitar la contaminación de otras zonas del laboratorio debe aumentarse al máximo la separación física entre los pasos previos y posteriores a la amplificación.
- No debe volver a llevarse las muestras, los equipos o los reactivos a la zona donde se realizó el paso anterior. Si fuera necesario regresar a una zona de trabajo anterior, en primer lugar deben tomarse las medidas apropiadas de descontaminación.
- Para obtener resultados de precisión máxima, debe usarse un baño maría para la hibridación y los pasos de lavado, y es conveniente asegurarse de que esté a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Si la temperatura fuera demasiado baja, el ensayo podría dar resultados falsos positivos; si fuera demasiado alta, las señales podrían ser muy débiles o podrían obtenerse falsos negativos.
 - Para obtener una regulación óptima de la temperatura debe usarse un baño María con agitador y tapa inclinada.
- Deben mantenerse las tiras en la misma cubeta durante todo el procedimiento y el líquido de dichas cubetas se aspira con una pipeta conectada a una aspiradora.

DESnaturalización DE LAS MUESTRAS

1. En primer lugar, antes de añadir una bandeja de muestras, debe corroborarse que la temperatura del baño María con agitador es de $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

2. Se coloca le HYB/SW SOLN en el baño María de 37°C a 50°C, aproximadamente 60 minutos antes del uso, para que se disuelvan todos los cristales.
3. Con unas pinzas, se retira una tira de cada muestra y se deposita sobre una superficie limpia.
4. Con un lápiz, se escribe un número de identificación en la tira, por encima de la línea de marcador verde. Incluir siempre una tira para los controles positivo y negativo.
5. Se coloca una cubeta en la bandeja para cada muestra/tira. La tira en la cubeta no se coloca hasta el paso 2 de “hibridación de las muestras”.
6. Se añaden 10 µl de DENAT SOLN a la esquina superior de cada cubeta.
7. Se añaden 10 µl de control o muestra a la solución DENAT SOLN de cada cubeta. Se mezcla con cuidado, agitando con la pipeta verticalmente.
8. Dejar a temperatura ambiente durante cinco minutos para que se produzca la desnaturalización.

HIBRIDACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Se añaden 2 ml de HYB/SW SOLN a cada cubeta, teniendo cuidado de no contaminar otras cubetas.
2. Mezclar los reactivos, agitando con cuidado la cubeta.
3. Se coloca inmediatamente las tiras rotuladas, con la línea de marcador hacia arriba, en las cubetas pertinentes. Confirmar que la tira esté completamente sumergida en la solución.
4. Se coloca la bandeja en un baño maría con agitador a una temperatura de 50°C ± 0.5°C.
5. Se ajusta el agitado del baño María aproximadamente a 80 rpm y cierra la tapa.
6. Se incuba la bandeja durante 60 ± 2 minutos.
7. Cuando finaliza la incubación de la hibridación se retira la bandeja del baño María.

LAVADO DE LAS TIRAS

1. Se aspira la solución de la cubeta con una pipeta conectada a una aspiradora.
2. Se añaden 2 ml de HYB/SW SOLN a cada cubeta.
3. Se aclara la tira, balanceando la bandeja durante un tiempo de 30 a 90 segundos a temperatura ambiente.
4. Se aspira la solución de las cubetas
5. Repetir el lavado (pasos 2-4)
6. Se añaden 2 ml de HYB/SW SOLN a cada cubeta y se coloca la bandeja en el baño María con agitador a una temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}..$
7. Se ajusta el agitado del baño María aproximadamente a 80 rpm y se cierra la tapa.
8. Se incuba la bandeja durante 30 ± 2 minutos.
9. Se preparan 8 ml de solución de aclarado diluida para cada cubeta de análisis, y 10 ml adicionales, diluyendo RINSE SOLN 5X 1: 5 en agua destilada o desionizada.
10. Se preparan 2 ml de conjugado diluido para cada cubeta del análisis y 2 ml adicionales, diluyendo CONJ 100X 1: 100 en CONJ DIL.
11. Cuando finalice la incubación se retira la bandeja del baño María.

REVELADO DEL COLOR

1. Se aspira la solución de la cubeta con una pipeta.
2. Se añaden 2 ml de solución de aclarado diluida a cada cubeta y se lava la tira, balanceando la bandeja durante un tiempo de 60 a 90 segundos a temperatura ambiente.
3. Se aspira la solución de las cubetas.
4. Se repiten los pasos 2 y 3.
5. Se añaden 3 ml de conjugado diluido a cada cubeta y se pone la bandeja en un agitador a temperatura ambiente.
6. Se incuba durante 30 ± 2 minutos.
7. Se preparan 2 ml de sustrato diluido para cada cubeta y 2 ml adicionales, diluyendo SUBS BCIP/NBT 100X 1: 100 en SUBS BUF (esta dilución es conveniente prepararla 10 minutos antes de que termine la incubación del conjugado).

8. Al finalizar la incubación se retira la bandeja del agitador y se aspira la solución de las cubetas con una pipeta.
9. Se añaden 2 ml de solución de aclarado diluida a cada cuneta u lavar la tira, balanceando la bandeja durante un tiempo de 60-90 segundos a temperatura ambiente.
10. Se aspira la solución de las cubetas.
11. Se repiten los pasos 9 y 10.
12. Se añaden 2 ml de sustrato diluido a cada cubeta y se pone en el agitador a temperatura ambiente.
13. Se aspira la solución de las cubetas.
14. Se añaden 2 ml de sustrato diluido a cada cubeta y se pone en el agitador a temperatura ambiente.
15. Se incuba durante 30 ± 2 minutos.
16. Se extrae la bandeja del agitador.
17. Se aspira la solución de las cubetas.
18. Se añaden 2 ml de agua destilada a cada cubeta.
19. Se pone la bandeja en el agitador durante 3-4 minutos.
20. Se extrae la bandeja del agitador.
21. Se aspira el agua.
22. Se repiten los pasos de 18 a 21.
23. Con las pinzas, se retira cada tira de su cubeta y se coloca sobre papel absorbente, con la línea de marcador hacia arriba.
24. Se deja que las tiras se sequen completamente antes de leer los resultados.
25. Se guardan las tiras secas y reveladas en un lugar protegido de la luz.

Control de calidad

1. La muestra de control negativo de VHC (N-CTRL) sólo debe tener un control positivo CONJ CTRL (línea 1). No debe haber ninguna señal visible para otras líneas de la tira.
2. La muestra de control positivo de VHC (P-CTRL) debe dar resultados positivos en las líneas siguientes: CONJ CTRL (línea 1), AMPL CTRL (línea 2), 13, 14, 15, AMPL CTRL 2 (línea 23) y 24.

- Si el patrón de alguno de los controles no es el especificado se considerará el análisis no válido y deberá repetirse.
3. La línea 1 de la tira es el CONJ CTRL. Si la tira se procesa correctamente esta línea será siempre positiva. Si fuera negativa deberá considerarse la tira no válida y deberá repetirse en ensayo LIPA.
 4. La línea 2 de la tira es AMPL CTRL 1. Esta línea es positiva si está presente el producto DNA de PCR biotinilado amplificado específico de 5'UTR del VHC. Una línea CONJ CTRL (línea 1) positiva y una línea AMPL CTRL 1(línea 2) negativa en una tira indican el procesamiento correcto de la tira, pero señalan que no estaba presente el producto de DNA de PCR biotinilado amplificado específico de 5'UTR del VHC en la cubeta de reacción.
 5. La línea 23 de la tira es AMPL CTRL 2. Esta línea es positiva si está presente el producto de ADN de PCR biotinilado específico de la región core del VHC. Si esta línea es negativa, indica que no se detectó la presencia en la cubeta de reacción del producto de DNA de PCR biotinilado amplificado específico de la región core del VHC.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Para obtener el resultado del genotipo se debe comparar el patrón de bandas obtenidas en la tira de cada muestra con la siguiente tarjeta de referencia:

3.2.4 Determinación de Anti-VHC

Se realizó mediante el equipo comercializado Architect® 2000iSR de Abbott. Concretamente el ensayo Architect Anti-VHC® (Abbott Diagnostics®, Wiesbaden, Alemania) es un CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay) cualitativo que utiliza micropartículas recubiertas para la detección de los anticuerpos Anti-VHC en suero y plasma.

3.2.4.1 Fundamento y procedimiento

El ensayo Architect Anti-VHC es un inmunoensayo de dos pasos que utiliza la tecnología CMIA. El formato del ensayo de dos pasos emplea etapas de lavado en el que se aísla y se lava el complejo sandwich para quitar el exceso del reactivo marcado no unido y cualquier otra sustancia que interfiera. El formato no competitivo de dos pasos generalmente ofrece una elevada especificidad y sensibilidad de ensayo.

Los compuestos quimioluminiscentes son distintos de los marcados radioactivos, fluorescentes, y enzimáticos. Un marcador quimioluminiscente produce luz cuando se combina con un reactivo "trigger". En el caso de Abbott ARCHITECT Anti-VHC® (Abbott Diagnostics®, Wiesbaden, Alemania) utiliza un marcador que es un derivado de acridina patentado. Este marcador produce una alta emisión de luz y, por consiguiente alta sensibilidad (es más fácil medir una gran concentración de luz). En definitiva, este ensayo utiliza la tecnología de ensayo sandwich no competitivo para medir el analito, en este caso presencia de anticuerpos Anti-VHC. Es un inmunoensayo no competitivo, la concentración de señal medida es directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra.

Tabla M.4 - Características de CMIA

Tecnología	Fase sólida	Etapa de separación	Marcador	Tecnología de detección
CMIA	Micropartícula magnética	Imán	Compuesto quimioluminiscente	Tubo fotomultiplicador de quimioluminiscencia

El procedimiento comprende 4 pasos automatizados dentro del equipo:

1. Tras centrifugar la sangre o el plasma 10 min a 3000 rpm se pueden introducir las muestras (tanto dicho suero como el plasma) en el equipo. Ahí la muestra es sometida a un pretratamiento en pocillos no recubiertos

con anticuerpos. Así se rompen los posibles complejos inmunes y se liberan los anticuerpos Anti-VHC.

2. Una alícuota de la muestra pre-tratada se pasa a una cubeta de reacción donde la muestra se pone en contacto con micropartículas paramagnéticas recubiertas por antígeno recombinante de VHC y con el diluyente del ensayo. Tras este paso los anticuerpos Anti-VHC presentes en la muestra quedarán unidos a los antígenos.
3. Tras un lavado, se añade sobre la cubeta de reacción el conjugado de acridina que se unirá a los anticuerpos Anti-VHC retenidos sobre las micropartículas.
4. Se lava la cubeta de reacción una vez más y se añaden los reactivos “trigger” y “pretrigger” responsables de la reacción quimioluminiscente. Dicha reacción será medida en unidades de luz relativas (cuya magnitud es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos Anti-VHC presente en la muestra).
5. La presencia o ausencia de anticuerpos Anti-VHC en la muestra se determina por comparación de la señal quimioluminiscente de dicha muestra y la que había presentado el cut-off en el calibrado del ensayo. Si la señal quimioluminiscente es mayor o igual que la señal del cut-off, la muestra se considerará positiva a anticuerpos Anti-VHC.

3.2.4.2 Reactivos

Una vez abiertos los reactivos son utilizables hasta 15 días almacenados a 2-8°C (en su defecto, hasta su fecha de caducidad).

- Micropartículas: Micropartículas recubiertas por antígeno recombinante de VHC.
- Conjugado: Anticuerpos murinos anti-IgG/anti-IgM marcados con acridina.

- Reactivos de pre-tratamiento 1 y 2
- Diluyente específico del ensayo: No abrir hasta su uso inmediato.
- Solución Trigger (contiene hidróxido sódico) y pre-Trigger (contiene peróxido de hidrógeno)
- Tampón de lavado

3.2.4.3 Muestras

- Se puede usar suero o plasma (EDTA, heparina, citrato sódico, CPD) sin restos celulares. Las muestras pueden almacenarse hasta cinco días a 2-8 °C. Si la determinación se va a retrasar más de cinco días debe almacenarse el plasma o suero aislado a -20° o menos. Evitar más de dos ciclos de congelación-descongelación.

3.2.4.4 Controles de calidad

- Deben realizarse los controles y calibrado una vez cada 24 horas.
- Los valores de los controles del Architect Anti-VHC deben estar dentro de los rangos de referencia especificados en el lote. Si uno de los controles está fuera de su rango de referencia las pruebas asociadas a éste no serán válidas y deberán ser repetidas (se nos indicará que recalibremos de nuevo el equipo).

3.2.4.5 Interpretación de los resultados

El sistema Architect Anti-VHC calcula la tasa del punto de corte o cut-off durante el calibrado y posteriormente calcula el resultado de cada muestra basándose en el siguiente cociente:

Tasa media de la muestra (S)/Tasa del punto de corte (CO)

- Las muestras con valores de señal S/CO < 1.00 se consideran negativas a Anti-VHC.
- Las muestras con valores de señal S/CO ≥ 1 se consideran positivas a Anti-VHC
- Las muestras que dan un primer test positivo debe reanalizarse por duplicado. Si ninguna de las repeticiones es reactiva, la

muestra se considera no reactiva o negativa a Anti-VHC. En cambio si la muestra es reactiva en una de las repeticiones, se considera repetidamente reactiva.

- Aquellas pruebas que resulten positivos tras la repetición deberán confirmarse mediante otra técnica como puede ser el LIA.

3.2.5 Prueba de confirmación: Line Immunoblot Assay

Para la confirmación de los resultados positivos en la prueba de cribado, utilizamos el equipo comercializado INNO-LIA™ VHC Score (Innogenetics®, Gante, Bélgica). Se trata de un inmunoblot en tira donde los antígenos recombinantes del VHC están fijados en una tira de nylon.

3.2.5.1 Fundamento

Es un inmunoensayo en tira de tercera generación que incorpora antígenos del VHC derivados de la región del core, de la región hipervariable E2 (HVR), de la región NS3 (helicasa) y de las regiones NS4A, NS4B y NS5A. Se basa en una tira de nylon con soporte de plástico, recubierta con los antígenos recombinantes, en forma de seis bandas. El ensayo incorpora 4 bandas de control: una banda de control de la estreptavidina, el control positivo 3+ (anti-IgG humano), control de positivo 1+ (IgG humano) y banda de cut-off ± (IgG humano). El inmunoblot en tira está basado en el mismo principio que un enzimoinmunoensayo. La muestra diluida se incuba con la tira de nylon que contiene los antígenos. Si en la muestra están presentes los anticuerpos del VHC se unirán a las bandas de antígeno de la tira. Posteriormente, se añade un conjugado anti-IgG humano de cabra marcado con fosfatasa alcalina purificada y reacciona con los complejos antígeno-anticuerpo VHC específicos siempre y cuando se hayan formado previamente. La incubación con el sustrato enzimático produce una coloración verde oscuro cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico del VHC capturado en una banda determinada. La reacción de producción de color se para con la adición de una solución de ácido sulfúrico. Si no hay anticuerpos en la muestra, el

conjuguado solo se une a los controles ±, 1+ y 3+. Si se omite el paso de la adición de la muestra el control 3+ tendrá una intensidad menor al control 1+.

3.2.5.2 Reactivos

- Tiras reactivas de nylon recubiertas con antígeno de VHC.
- Diluyente de la muestra: contiene tampón fosfato con cloruro sódico, estabilizadores de proteínas y 0.3% de cloroacetamida como conservante.
- Conjugado: Contiene anticuerpos anti IgG humanos marcados con fosfatasa alcalina junto con tampón Tris, estabilizadores de proteínas y 0.01% de methylisothiazolona y 0.1% de cloroacetamida como conservantes.
- Control negativo: Contiene suero normal de origen humano con 0.01% de methylisothiazolona y 0.1% de cloroacetamida como conservantes.
- Control positivo: Contiene suero humano inactivado positivo para anticuerpos Anti-VHC con 0.01% de methylisothiazolona y 0.1% de cloroacetamida como conservantes.
- Sustrato BCIP / NTP: Contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitroazul de tetrazolio en dimetilformamida con 0.01% de methylisothiazolona y 0.1% de cloroacetamida como conservantes.
- Solución de parada : Contiene ácido sulfúrico a 0.1 mol/l
- Solución de lavado: Contiene un tampón Tris coloreado (acompañado de clorhidrato de sodio y 0.02% de bromo-nitro-dioxano como conservantes) que debe ser diluido 5X en agua destilada. La solución de lavado diluida es estable durante dos semanas si se almacena a temperaturas entre 2-8 °C.

3.2.5.3 Muestras

Se puede usar suero o plasma humano recogido en tubos que contengan EDTA, citrato o heparina como anticoagulantes. Antes de ser almacenados, tanto los sueros como los plasmas deben ser separadas del

coágulo sanguíneo o de las células sanguíneas mediante una centrifugación. Las muestras pueden almacenarse a 2-8°C durante una semana, si se desea almacenar durante un periodo mayor, deberán congelarse a -20°C. No usar muestras que se han congelado y descongelado más de tres veces.

3.2.5.4 Técnica

Se realiza de forma automática utilizando el equipo Auto-LiPA™ (Innogenetics®, Gante, Bélgica). Este instrumento es un sistema autónomo con aspiración, pipeteado e incubación automatizados.

LECTURA DE RESULTADOS

La naturaleza y ubicación de los antígenos y los controles de la tira se establecen de la forma siguiente:

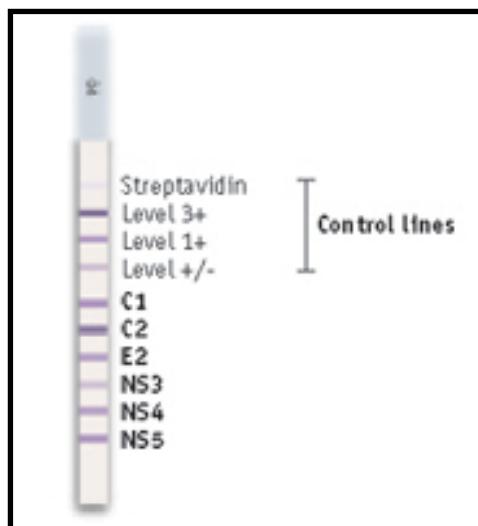


Figura M.4 - Patrón bandas Auto-LiPA™

La intensidad de la reacción de las bandas de control en cada tira se utiliza para asignar los índices de reactividad a cada antígeno presente en dicha tira.

Tabla M.5 - Lectura de Resultados LIA

Intensidad de la reacción de las bandas de antígeno (R)	Puntuación
Inferior a \pm	$R < \pm$
Igual a \pm	$R = \pm$
Superior a \pm , pero menor o igual a 1+	$\pm < R = 1+$
Mayor que 1+ pero menor 3+	$1+ < R = 3+$
Igual a 3+	$R = 3+$
Mayor a 3+	$R > 3+$

*La clasificación de la reactividad debe hacerse para cada tira de forma separada

3.2.5.5 Control de calidad

Validación del ensayo

- La tira de control positivo debe mostrar una reacción de al menos 1+ en las bandas de antígeno C1, C2, NS3 y NS4. Las bandas de antígeno E2 y NS5 pueden tener un valor negativo.
- La tira de control negativo no debe mostrar ninguna reacción o al menos menor que el nivel de control \pm para todas las bandas de VHC.

Validación de una tira individual

- Los niveles de control 1+ y \pm así como el nivel de control positivo fuerte 3+ deben ser visibles.
- La intensidad del nivel del control 3+ debe ser superior a la del nivel 1+ y la intensidad del nivel 1+ debe ser superior a la del nivel \pm .
- La banda del control para anti-estreptavidina debe tener una puntuación negativa.

3.2.5.6 Interpretación de los resultados

Una muestra es negativa para anticuerpos Anti-VHC:

- Si todas las bandas de antígeno de VHC tienen una puntuación negativa.
- Si únicamente una banda de antígeno de VHC tiene una intensidad de \pm , excepto cuando se observa reactividad para el NS3.

Una muestra es positiva para anticuerpos Anti-VHC:

- Si al menos dos bandas de antígeno tienen una intensidad ± o superior.

Una muestra se considera indeterminada para anticuerpos Anti-VHC:

- Si únicamente una banda de antígeno de VHC tiene una puntuación 1+ o superior.
- Si la banda NS3 reacciona con una intensidad ± o superior y todas las demás bandas de antígeno son negativas.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente, se ha realizado el análisis descriptivo de los datos y se han reportado la media y desviación estándar como medidas de tendencia central y de dispersión respectivamente. Para las concentraciones de PCR $>6,9 \times 10^7$ UI/mL hemos utilizado el valor $6,9 \times 10^7$. Para las concentraciones de PCR VHC $< 1,5 \times 10^1$ UI/mL hemos utilizado el valor $1,5 \times 10^1$. Para las concentraciones de Ag VHC >20000 fmol/L hemos utilizado el valor 20000.

Para comparación de proporciones hemos utilizado el test chi-cuadrado o el test exacto de Fisher en aquellos casos para los cuales la hipótesis de tamaño muestral por grupo inferior a 5 no se cumple. Dentro de cada grupo poblacional se han creado cuatro subgrupos en función de su patrón Ag VHC / Anti-VHC y han sido analizados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA).

Finalmente, se ha aplicado la prueba HDS de Tukey para comparaciones múltiples post-hoc. El análisis se ha llevado a cabo usando la hoja de cálculo Microsoft Excel 2007 y el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows.

4.- Resultados

Grupo 1- Conjunto de pacientes estudiados

En este grupo hemos analizado 952 sueros de 655 pacientes, 213 mujeres y 442 varones, con una edad que va desde los dos meses a los 93 años de vida, siendo la media de $56,88 \pm 16,74$ años y cuyos resultados exponemos de la siguiente manera:

- En la Tabla R.1.1 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de Anti-VHC de muestras del conjunto de pacientes estudiados.

Tabla R.1.1			
Comparación de resultados de Ag VHC y Anti-VHC			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
Anti-VHC +	175	154	329
Anti-VHC -	10	613	623
TOTAL	185	767	952

- En la Tabla R.1.2 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de PCR de muestras del conjunto de pacientes estudiados.

Tabla R.1.2			
Comparación de resultados de Ag VHC y PCR			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
PCR +	94	40	134
PCR -	6	41	47
TOTAL	100	81	181

En términos globales, se observan resultados concordantes en el 82,77% de las muestras en las que se determinó Ag VHC y Anti-VHC (merced a 788 de 952 muestras) y en un 74,59% de las muestras en las que se determinó Ag VHC y ARN viral (135 de 181 sueros). Por el contrario, un 17,23% (un total de 164 sueros de los citados 952 con determinación de Ag VHC y Anti-VHC) y un 25,41% (46 sueros de 181 con determinación de antigenemia VHC y PCR), respectivamente, presentaron resultados discordantes, a expensas principalmente de los patrones con antigenemia negativa (154 muestras Ag VHC - / Anti-VHC + y 40 con Ag VHC - y PCR+).

Dentro de este grupo se han observado numerosos resultados con valores de antigenemia dentro de la denominada Zona Gris. Concretamente hemos observado 33 muestras (3,46% del total de muestras evaluadas) de 32 pacientes, 11 mujeres y 21 varones, con edades comprendidas entre 33 y 85 años y una media de $51,81 \pm 12,38$ años, con un resultado de Ag VHC en un primer análisis dentro del rango considerado como Zona Gris. Tras la repetición del análisis por duplicado, 25 (75,76%) se confirmaron como positivos a Ag VHC frente a ocho que resultaron definitivamente negativos. Evaluando su correspondencia con los resultados de Anti-VHC, hubo 26 muestras concordantes (19 de ellas concordantes con los Anti-VHC + y siete con los Anti-VHC -), mientras que siete fueron discordantes (6 muestras confirmadas como positivas presentaron Anti-VHC negativos y una, confirmada como Ag VHC negativa presentó positividad a Anti-VHC). En 24 de estas muestras con valores de Ag VHC en Zona Gris se pudo efectuar una determinación paralela de carga viral, siendo ésta concordante en 20, merced a 16 positivos a ambos marcadores y cuatro negativos tanto a antigenemia como a dicha carga viral. Entre aquellos concordantes positivos tenemos 15 muestras con una carga viral inferior a 10^4 UI/mL y una superior a dicho valor. Las cuatro muestras discordantes fueron como resultado de sendas confirmaciones de positividad de la antigenemia contrapuestas con PCR negativa y se correspondieron con dos pacientes hemodializados y dos receptores de trasplante hepático.

A continuación se desglosan los diferentes patrones en función de sus valores de antigenemia (discerniendo entre resultados de Ag VHC positivos o negativos y aquellos cuyos valores en un primer análisis resultaron en el rango de la Zona Gris, por lo que requirieron repetir la técnica) y LIA. Igualmente se pormenorizan aquellos resultados anormales o con patrones discrepantes.

1.1 Ag VHC + Anti-VHC +

Este patrón analítico, se encontró en 175 sueros (18,38%), pertenecientes a 145 pacientes, 52 mujeres y 93 varones, con edades comprendidas entre los dos y los 82 años (edad media de $50,42 \pm 12,08$ años). Los valores de Ag VHC oscilaron entre 3,02 y >20.000 fmol/L, con un valor medio de $2596,66 \pm 3979,78$ fmol/L. Los valores S/CO de Anti-VHC estuvieron comprendidos entre 1,29 y 19,28, con una media de $13,58 \pm 2,71$. La carga viral (CV) en aquellas muestras donde fue determinada (88 sueros) osciló entre $<1,5 \times 10^1$ UI/mL (excluyendo las muestras PCR negativa) y $6,9 \times 10^7$ UI/mL, con un valor medio de $3,45 \times 10^6 \pm 9,48 \times 10^6$ UI/mL. Ex puesto en la Tabla R.1.3 se desglosan los resultados de los sueros con patrón Ag VHC + / Anti-VHC + y sus resultados LIA. Se observa que 170 de los Ag VHC + / Anti-VHC + presentaron LIA + (97,14%).

Tabla R.1.3
Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC +	Ag VHC ^{1*} Zgrp
Anti-VHC +	LIA+	151
	LIA-	0
	LIA IND	5
TOTAL	156	19

^{1*} Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos.

Las 19 muestras con Anti-VHC + y con valores de Ag VHC inicialmente en Zona Gris (Zgr), que posteriormente fueron clasificadas como positivas tras su repetición, presentaron en el primer análisis cifras de Ag VHC que oscilaron entre 3,02 y 8,92 fmol/L, con media= $5,94 \pm 1,72$ fmol/L; y que en la repetición oscilaron entre 3,12 y 9,57 fmol/L, media= $6,49 \pm 1,81$ fmol/L). Los valores medios de Anti-VHC en estas 19 muestras fueron S/CO= $13,24 \pm 2,05$.

Los datos de las muestras en Zona Gris confirmadas como positivas (Zgrp) se exponen en la Tabla R.1.4.

Tabla R.1.4
Pacientes con valores de Ag VHC en Zona Gris confirmados como positivos

Paciente	Edad	Ag VHC	1ºAnálisis	Repetición	Anti-VHC	LIA	*PCR
BMJ	47	Zgrp	7,09	8,46	POS / 11,37	POS	$<1,5 \times 10^1$
CCM	46	Zgrp	6,36	4,56	POS / 11,21	POS	$1,37 \times 10^2$
CGMT	63	Zgrp	4,12	5,03	POS / 10,71	POS	ND
ERM	53	Zgrp	7,48	9,04	POS / 12,35	POS	$5,21 \times 10^3$
EJ	39	Zgrp	4,20	² 4,24	POS / 11,55	POS	$1,25 \times 10^3$
GGCM	38	Zgrp	4,01	6,43	POS / 10,12	POS	$1,18 \times 10^2$
GMAM	69	Zgrp	4,48	8,49	POS / 16,01	POS	ND
GRJJ	34	Zgrp	6,24	3,12	POS / 15,23	POS	$2,45 \times 10^3$
LLA	39	Zgrp	5,72	4,33	POS / 15,49	POS	$1,79 \times 10^3$
MANA	63	Zgrp	7,17	5,65	POS / 16,41	POS	$4,62 \times 10^3$
MAJ	47	Zgrp	8,37	7,37	POS / 12,15	POS	$3,63 \times 10^3$
MIO	36	Zgrp	5,69	5,99	POS / 12,83	POS	$5,04 \times 10^2$
MCMP	51	Zgrp	3,02	3,42	POS / 14,25	POS	$2,31 \times 10^3$
NGAR	60	Zgrp	4,22	8,21	POS / 10,25	POS	$3,90 \times 10^3$
OM	43	Zgrp	6,45	7,57	POS / 14,62	POS	$1,88 \times 10^3$
RPCL	47	Zgrp	4,82	6,00	POS / 12,10	POS	ND
RVJC	39	Zgrp	5,80	7,01	POS / 15,21	POS	$4,78 \times 10^3$
RZPD	53	Zgrp	8,73	7,53	POS / 14,28	POS	$1,50 \times 10^1$
SPG	52	Zgrp	8,92	9,57	POS / 15,51	POS	$1,95 \times 10^4$

Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;
ND: No determinada.*Carga viral en UI/mL. ²Única muestra de esta tabla que requirió un tercer análisis tras un segundo análisis con valores de 1,99 fmol/L.

Se efectuó PCR en 16 de las 19 muestras (carga viral entre $<1,5 \times 10^1$ y $1,95 \times 10^4$ UI/mL, media $3,25 \times 10^3 \pm 4,69 \times 10^3$ UI/mL). Quince de ellas mostraron una CV $<10^4$ UI/mL. Una única muestra, perteneciente al paciente SPG, presentó una carga viral superior a 10^4 UI/mL. Dicho paciente mostró valores de Ag VHC cercanos al límite superior de la Zona Gris (8,92 fmol/L y 9,57 fmol/L).

Las cinco muestras con Ag VHC + / Anti-VHC + y LIA IND pertenecen a cinco pacientes, con unos valores de Ag VHC entre 41,17 y 11.893,21 fmol/L (media de $5857,13 \pm 4396,35$ fmol/L) y S/CO Anti-VHC entre 1,29 y 13,38 (media de S/CO= $8,58 \pm 4,64$). Se realizó PCR en cuatro de estas muestras con una CV media de $5,35 \times 10^6 \pm 1,02 \times 10^7$ UI/mL. La Tabla R.1.5 muestra los detalles de dichos análisis. Las circunstancias de estos pacientes se describirán en la discusión.

Tabla R.1.5

Pacientes con resultados Ag VHC + Anti-VHC + LIA IND, desglose de valores

Paciente	Edad	Ag VHC		Anti-VHC		LIA / *Bandas	* ² PCR
CSL	54	POS	11893,21	POS	1,29	IND / NS3 +/-	$2,07 \times 10^7$
CBJ	13	POS	3949,07	POS	13,38	IND / NS3 4+	$5,81 \times 10^5$
MV	41	POS	5704,40	POS	7,47	IND / NS3 2+	$1,24 \times 10^5$
NGE	44	POS	41,17	POS	11,41	IND / NS3 4+	$<1,50 \times 10^1$
SCF	82	POS	7697,78	POS	9,33	IND / NS3 3+	ND

ND: no determinado; *Bandas observadas y su intensidad en aquellas muestras con LIA VHC IND.

*²Carga viral expresado en UI/mL

Hubo una paciente (II), mujer española de 42 años, que presentó un patrón de Ag VHC + (10,81 fmol/L) / Anti-VHC + (S/CO 11,59) / LIA + que mostró discordancia respecto a la carga viral que fue negativa.

1.2 Ag VHC - Anti-VHC -

Este patrón se observó en 613 (64,39%) sueros pertenecientes a 384 pacientes, 119 mujeres y 265 varones, con edades comprendidas entre uno y 91 años, siendo la media de $60,21 \pm 15,86$ años. Los valores de Ag VHC han estado entre 0 y 9,93 fmol/L (media= $0,38 \pm 0,85$ fmol/L) y los S/CO de Anti-VHC entre 0 y 0,99 (media= $0,09 \pm 0,11$). Se determinó la carga viral en 20 muestras, siendo negativa en 18 y positiva en dos. Las dos muestras con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC - / PCR + pertenecieron a un único paciente, CGJ, cuyas circunstancias se expondrán en la discusión, y en ambos casos la carga viral resultó baja ($5,89 \times 10^2$ y $<1,5 \times 10^1$ UI/mL). No se realizó la prueba del LIA en ningún suero con este patrón, como se aprecia en la Tabla R.1.6.

Tabla R.1.6

Desglose de resultados Ag VHC - / Anti-VHC - según resultados LIA

	Ag VHC -	Ag VHC *Zgr
Anti-VHC -	LIA+	0
	LIA-	0
	LIA ND	606
TOTAL	606	7

* Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

Hubo siete muestras que han presentado este patrón en las que los valores iniciales de antigenemia se situaron en Zona Gris y que posteriormente fueron clasificadas como negativas tras su repetición. Concretamente se observaron en el primer análisis cifras de Ag VHC que oscilaron entre 3,49 y

9,93 fmol/L con media= $4,64 \pm 2,69$ fmol/L; en la primera repetición oscilaron entre 0 y 1,21 fmol/L, media= $0,39 \pm 0,47$ fmol/L y en la segunda, y última repetición, estuvieron en un rango entre 0 y 1,13 fmol/L, media= $0,28 \pm 0,44$ fmol/L. Los valores S/CO de Anti-VHC se situaron entre 0,03 y 0,1 siendo en este caso la media= $0,06 \pm 0,024$. En la Tabla R.1.7 se muestran los detalles de dichos análisis.

Tabla R.1.7

Pacientes con el patrón Ag VHC Zgr / Anti-VHC - catalogados definitivamente como negativos

Nombre	Edad	*Ag VHC	1ºAnálisis	2ºAnálisis	3ºAnálisis	Anti-VHC	PCR	ALT* ⁴
EPR	62	Zgr	4,40	0,06	0,03	NEG / 0,06	* ³ ND	16
FCJ	85	Zgr	9,93	0,57	0,08	NEG / 0,03	ND	10
FLJ	61	Zgr	3,49	0,00	0,03	NEG / 0,04	ND	14
KK	43	Zgr	5,14	1,19	0,98	NEG / 0,10	NEG	77
LLD	61	Zgr	4,40	1,21	0,00	NEG / 0,06	ND	25
MLMP	42	Zgr	5,99	0,56	0,30	NEG / 0,08	NEG	12
PRF	64	Zgr	5,71	0,00	1,13	NEG / 0,08	NEG	11

*Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

²NS: No hubo volumen suficiente de suero para nueva determinación. ³ND: No determinada. ⁴ALT expresado en UI/mL

1.3 Ag VHC + Anti-VHC -

Se obtuvieron 10 sueros (1,05%) con este patrón analítico, pertenecientes a nueve pacientes, dos mujeres y siete varones con una edad entre 33 y 72 años, y una media de $51,11 \pm 12,45$ años. Los valores de Ag VHC han ido desde 3,81 hasta 4154,85 fmol/L, media= $470,59 \pm 1302,88$ fmol/L, frente a unas cifras S/CO de Anti-VHC que han oscilado entre 0,02 y 0,33; media= $0,18 \pm 0,09$. No se realizó la prueba del LIA en ningún suero con este patrón, como se aprecia en la Tabla R.1.8.

Tabla R.1.8

Desglose de resultados Ag VHC + / Anti-VHC - según resultado LIA

	Ag VHC +	Ag VHC *Zgrp
Anti-VHC -	LIA+	0
	LIA-	0
	LIA ND	4
TOTAL	4	6

* Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos

Las características de las 10 muestras, pertenecientes a nueve pacientes, se reflejan en la Tabla R.1.9.

Tabla R.1.9

Pacientes con el patrón Ag VHC + / Anti-VHC -

Nombre	Edad	Ag VHC	1a Análisis	2ºAnálisis	Anti-VHC	*PCR	ALT* ²	
BMFJ	41	Zgrp	3,98	3,42	NEG	0,23	ND	33
BOS	33	POS	11,65	-	NEG	0,15	NEG	24
		Zgrp	9,32	5,54	NEG	0,16	NEG	20
CRM	57	Zgrp	4,29	5,90	NEG	0,33	NEG	73
CGJ	48	POS	477,50	-	NEG	0,02	$1,37 \times 10^5$	53
GVA	58	Zgrp	5,18	12,72	NEG	0,14	ND	13
KK	43	Zgrp	3,81	3,87	NEG	0,14	NEG	54
LAJP	72	Zgrp	3,98	4,07	NEG	0,22	NEG	20
MOAI	44	POS	4154,85	-	NEG	0,29	$5,96 \times 10^5$	13
OLPA	64	POS	31,38	-	NEG	0,10	ND	17

ND: No determinado, Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos; *Carga viral en UI/mL. ²ALT expresado en UI/MI.

Se observaron dos muestras (0,21%) de dos pacientes (CGJ, MOAI) con valores notablemente elevados de antigenemia, confirmados mediante PCR, en ambos casos con carga viral igualmente alta. Estos pacientes fueron clasificados como falsos negativos al Anti-VHC.

En cinco muestras de cuatro pacientes la PCR fue negativa. Estas muestras tenían un valor medio de Ag VHC de $7,31 \pm 3,68$ fmol/L. El paciente con dos muestras (BOS) presentó en su primer análisis una positividad cercana al límite superior de la Zona Gris (11,65 fmol/L), mientras que en una segunda muestra analizada dos semanas después los valores fueron inferiores pero, en cualquier caso, no lo suficiente como para resultar negativos. Respecto a las tres muestras restantes, todas ellas se catalogaron como positivas para Ag VHC, tras obtener repetidamente valores de antigenemia en Zona Gris. Tras contrastar estos resultados con la determinación de la carga viral, todos ellos fueron interpretados como una falsa positividad al Ag VHC. Las circunstancias de estos pacientes se describirán en la discusión

Por último, hubo tres pacientes (BMFJ, GVA, OLPA) en los que no se realizó PCR. En ellos, a tenor de sus datos clínicos y la evolución de sus marcadores, el resultado Ag VHC fue interpretado como falso positivo.

Estas ocho últimas muestras, con perfil con PCR negativa o no realizada, supusieron un porcentaje del 0,84% sobre el total del estudio.

1.4 Ag VHC - Anti-VHC +

Se obtuvieron 154 sueros (16,18%) con este patrón analítico, pertenecientes a 129 pacientes, 45 mujeres y 84 varones con edades comprendidas entre los dos meses y los 86 años, media de $44,63 \pm 15,44$ años. El valor mínimo de Ag VHC ha sido de 0 fmol/L, máximo de 5,81 fmol/L y media de $0,59 \pm 0,97$ fmol/L, frente a un valor S/CO de Anti-VHC mínimo de 1,08, máximo de 17,90 y media de $7,18 \pm 5,54$. En 61 muestras se evaluó la carga viral, con valores comprendidos entre <15 UI/mL y $6,25 \times 10^4$ UI/mL y una media de $2,72 \times 10^3 \pm 1,01 \times 10^3$ UI/mL. En la Tabla R.1.10 se exponen los sueros con patrón Ag VHC - / Anti-VHC + en función de su resultado LIA.

Tabla R.1.10		
Desglose de resultados Ag VHC - / Anti-VHC + según resultado LIA		
	Ag VHC -	Ag VHC *Zgr
Anti-VHC +	LIA+	75
	LIA-	25
	LIA IND	53
TOTAL	153	1

* Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

Se pudo realizar PCR a 61 de los 154 sueros, resultando 23 negativos y 38 positivos. En la Tabla R.1.11 se exponen los detalles de las 23 muestras Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR -.

Tabla R.1.11

Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR -

Nombre	Ag VHC	/ Valores	Anti-VHC/ Valores	LIA / Bandas*	PCR
ALF	NEG	/ 0,00	POS /	1,34	IND / NS4 1+ NEG
ACR	NEG	/ 0,00	POS /	1,35	IND / NS3 +/- NEG
BGJA	NEG	/ 0,00	POS /	3,18	IND / NS3 2+ NEG
DCSIJ	NEG	/ 0,00	POS /	11,68	POS NEG
EKH	NEG	/ 0,21	POS /	1,44	IND / C1 2+ NEG
	NEG	/ 1,80	POS /	1,27	IND / C1 1+ NEG
FUC	NEG	/ 2,72	POS /	5,06	NEG NEG
GGA	NEG	/ 0,00	POS /	11,96	POS NEG
GMMI	NEG	/ 0,00	POS /	16,22	POS NEG
HRF	NEG	/ 1,31	POS /	15,90	POS NEG
JBE	NEG	/ 0,00	POS /	13,44	POS NEG
LPMA	NEG	/ 0,46	POS /	12,47	POS NEG
LPS	NEG	/ 1,46	POS /	5,70	NEG NEG
MGM	NEG	/ 0,34	POS /	16,40	POS NEG
MRR	NEG	/ 0,00	POS /	3,88	POS NEG
MRJA	NEG	/ 2,74	POS /	1,17	IND / NS3 1+ NEG
NMV	NEG	/ 0,21	POS /	12,60	POS NEG
OLA	NEG	/ 0,24	POS /	5,64	POS NEG
OSM	NEG	/ 0,00	POS /	4,98	IND / NS3 2+ NEG
PCJ	Zgr	/ 3,35	POS /	13,14	POS NEG
RGO	NEG	/ 0,00	POS /	13,16	POS NEG
RRF	NEG	/ 0,81	POS /	17,90	POS NEG
YR	NEG	/ 0,00	POS /	4,33	IND / NS3 1+ NEG

*Bandas observadas y su intensidad en aquellas muestras con LIA VHC IND (indeterminado). Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

Entre estos 23 sueros con Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR -, hubo 13 sueros de 13 pacientes en los que se confirmó el LIA como positivo. Los valores de los distintos parámetros de estos 13 sueros oscilaron entre 0 y 3,35 fmol/L, media $0,58 \pm 1,12$ fmol/L para Ag VHC; y entre 3,88 y 17,90, media $11,68 \pm 3,86$ para S/CO de Anti-VHC). Todos ellos fueron interpretados como una infección pasada y resuelta.

También hubo dos sueros (pacientes FUC y LPS) en los que el LIA VHC resultó negativo, lo que nos invita a pensar en un falso positivo del Anti-VHC (valores Ag VHC 2,72 fmol/L y 1,46 fmol/L y valores Anti-VHC S/CO= 5,06 y S/CO= 5,70 respectivamente).

Por último, se detectaron ocho sueros de siete pacientes con LIA VHC indeterminado (valores de Ag VHC entre 0 y 2,74 fmol/L, media de $0,67 \pm 1,12$ fmol/L, Anti-VHC S/CO= 1,17 y 4,98 media de $2,38 \pm 1,55$). La evolución serológica de estos pacientes, junto con los valores S/CO de Anti-VHC bajos y

el perfil de LIA, mostrando una única banda de especificidad aleatoria (expuesto en la Tabla R.1.11), apunta a favor de un resultado falso positivo para Anti-VHC.

En el caso de los 38 sueros de 38 pacientes con Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR +, (valores de Ag VHC entre 0 y 2,89 fmol/L, media $1,25 \pm 0,97$ fmol/L, valores S/CO de Anti-VHC entre 10,21 y 16,51, media $13,22 \pm 2,18$), todos ellos salvo una muestra, presentaron una carga viral por debajo de 10^4 UI/mL (concretamente se observó un valor mínimo de <15 UI/mL, máximo de $6,25 \times 10^4$ UI/mL, media de $2,54 \times 10^3 \pm 9,86 \times 10^3$ UI/mL) por lo que todos ellos se interpretaron como falsos negativos de Ag VHC asociados a la falta de sensibilidad de la técnica para cargas virales bajas.

En otros 93 sueros no se llevó a cabo la PCR. A continuación desglosamos sus resultados en función del resultado LIA obtenido (Tabla R.12, R.14 y R.15).

A) LIA indeterminado:

Hubo 45 sueros de 32 pacientes, 15 mujeres y 17 varones con una edad entre uno y 86 años, una media de $45,03 \pm 19,74$ años, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA IND / PCR ND. Los valores de Ag VHC oscilaron entre 0 y 3,00 fmol/L, media de $0,17 \pm 0,51$ fmol/L (Tabla R.1.12), los valores S/CO de Anti-VHC fueron bajos, oscilando entre 1,08 y 6,06 media $2,62 \pm 1,38$, lo cual sugiere resultados falsos positivos o pacientes curados que están perdiendo los Anti-VHC. Esto se correlaciona perfectamente con los resultados de LIA indeterminados (Tabla R.1.13) donde se aprecia una única banda de especificidad aleatoria con predominio de la banda NS3, la banda que, si bien mejora la sensibilidad de la técnica, también es la que con más frecuencia genera resultados indeterminados en el RIBA 2 y RIBA 3 (502, 505). Este fenómeno es igual al observado en los ocho sueros de siete pacientes con LIA indeterminado y PCR negativa descrita anteriormente. Cuando se dispuso de más de un suero del mismo paciente no se apreció variación en el patrón.

Tabla R.1.12

Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA IND

Nombre	Ag VHC	Anti-VHC	LIA / Bandas*	ALT* ²
ACR	NEG 0,00	POS 1,30	IND / NS3 1+	33
ATC	NEG 0,00	POS 3,24	IND / C1 2+	33
AK	NEG 0,00	POS 1,08	IND / NS4 1+	73
BM	NEG 0,00	POS 1,61	IND / NS3 1+	10
BMAM	NEG 0,00	POS 2,69	IND / C1 1+	9
CRL	NEG 0,00	POS 1,30	IND / NS3 1+	-
CGAA	NEG 0,00	POS 6,06	IND / NS3 2+	23
	NEG 0,00	POS 4,81	IND / NS3 3+	16
CCG	NEG 0,00	POS 1,10	IND / NS3 1+	83
EPME	NEG 0,36	POS 3,14	IND / C1 1+	-
	NEG 0,00	POS 1,73	IND / C1 1+	28
GGML	NEG 0,00	POS 1,79	IND / C2 2+	-
GDMDC	NEG 2,92	POS 1,42	IND / NS3 1+	11
HS	NEG 0,00	POS 1,21	IND / C1 1+	17
	NEG 0,00	POS 1,19	IND / C1 1+	11
JMMG	NEG 0,00	POS 2,15	IND / NS3 1+	20
KCK	NEG 1,17	POS 1,10	IND / NS3 +/-	9
LOT	NEG 0,00	POS 2,33	IND / NS3 1+	16
LEV M	NEG 0,00	POS 2,81	IND / NS3 1+	25
LGA	NEG 0,00	POS 3,44	IND / NS3 1+	14
	NEG 0,97	POS 6,03	IND / NS3 2+	49
MGEJ	NEG 1,06	POS 2,17	IND / NS3 1+	20
MGD	NEG 0,00	POS 1,49	IND / NS3 1+	77
	NEG 0,00	POS 1,38	IND / NS3 1+	83
MFMA	NEG 0,00	POS 1,24	IND / NS3 +/-	17
	NEG 0,00	POS 2,89	IND / NS3 +/-	75
MFN	NEG 0,00	POS 2,70	IND / NS3 +/-	-
	NEG 0,00	POS 1,10	IND / NS3 +/-	15
MRJA	NEG 0,00	POS 2,03	IND / NS3 2+	20
NFA	NEG 0,00	POS 1,23	IND / NS3 1+	21
	NEG 0,00	POS 1,34	IND / NS3 +/-	26
PIY	NEG 0,00	POS 2,40	IND / NS3 +/-	21
PLF	NEG 0,00	POS 1,90	IND / NS3 2+	9
	NEG 0,00	POS 3,75	IND / NS3 2+	7
SEM	NEG 0,00	POS 3,63	IND / NS3 2+	6
	NEG 0,42	POS 3,25	IND / NS3 2+	6
SSJF	NEG 0,00	POS 4,20	IND / NS3 2+	5
	NEG 0,00	POS 4,40	IND / NS3 2+	7
SAM	NEG 0,00	POS 2,41	IND / C1 2+	710
SSJ	NEG 0,00	POS 1,92	IND / C1 1+	15
	NEG 0,00	POS 5,55	IND / C1 3+	219
UPJM	NEG 0,00	POS 4,40	IND / C1 3+	25
YR	NEG 0,34	POS 3,69	IND / NS3 1+	19
	NEG 0,00	POS 4,08	IND / NS3 2+	50
	NEG 0,00	POS 3,40	IND / NS3 1+	50

*Bandas observadas y su intensidad en aquellas muestras con LIA VHC IND (indeterminado). ²ALT expresado en UI/mL

Tabla R.1.13

Distribución de las bandas LIA VHC y sus Intensidades en pacientes con patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND /LIA IND

INTENSIDAD	+ /-	BANDAS LIA VHC			
		NS3	C1	C2	NS4
	+ /-	7 (6)	-	-	-
	1+	15 (14)	6 (4)	-	1 (1)
	2+	10 (6)	2 (2)	1 (1)	-
	3+	1 (1)	2 (1)	-	-

*Entre paréntesis el número de pacientes a los que corresponden las muestras descritas, Hubo cuatro pacientes que presentaron bandas distintas en cada análisis.

Cabe destacar que en estos 45 sueros las transaminasas fueron normales, salvo en ocho casos en los que su elevación se puede explicar por otras causas.

B) LIA positivo

Hubo 25 sueros de 23 pacientes, seis mujeres y 17 varones, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA + / PCR ND. La edad de estos pacientes estuvo comprendida entre los dos meses y los 81 años, media de $48,36 \pm 16,01$ años. Las cifras de Ag VHC oscilaron entre 0 y 2,07 fmol/L, media de $0,56 \pm 0,70$ fmol/L, mientras que los valores S/CO de Anti-VHC fueron relativamente bajos, entre 1,34 y 15,51, media $8,11 \pm 5,59$. En la Tabla R.1.14 se muestran los datos de estos pacientes.

Tabla R.1.14

Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA +

Nombre	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	ALT*
ALJM	NEG	1,12	POS	10,91
AAA	NEG	0,00	POS	1,90
ATC	NEG	1,28	POS	1,70
BMJ	NEG	2,07	POS	13,52
BCV	NEG	0,00	POS	2,58
EEM	NEG	0,99	POS	1,65
GGC	NEG	0,00	POS	10,12
GDSF	NEG	0,00	POS	2,31
	NEG	0,00	POS	1,75
HHMV	NEG	0,00	POS	14,43
JRJJ	NEG	0,00	POS	12,97
LPNM	NEG	0,00	POS	11,17
MPJ	NEG	0,16	POS	11,74
NNA	NEG	0,00	POS	14,82
NCAJ	NEG	0,00	POS	1,34
PPP	NEG	0,00	POS	3,72
RRRM	NEG	0,30	POS	13,59
SEM	NEG	1,48	POS	3,77
SSDLMF	NEG	1,24	POS	14,71
SVA	NEG	0,00	POS	1,55
STJ	NEG	1,56	POS	12,04
UBR	NEG	0,00	POS	7,27
VBEA	NEG	1,61	POS	15,27
	NEG	1,42	POS	15,51
VCJL	NEG	0,75	POS	2,60
				-

*ALT expresado en UI/mL

En cuanto a la evaluación de los valores de ALT en este grupo de pacientes, encontramos que de los 25 sueros, ocho de siete pacientes presentaron valores por encima del rango normal (ALT > 40 UI/mL). Todos ellos habían sido diagnosticados de infección por VHC.

C) LIA negativo

Hubo 23 sueros de 21 pacientes, 12 mujeres y nueve varones con una edad que va desde los 11 a los 90 años, media de $42,38 \pm 20,22$ años en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA -. Los valores de Ag VHC estuvieron entre 0 y 2,72 fmol/L, media $0,71 \pm 0,89$ fmol/L, mientras que los de S/CO de Anti-VHC fueron todos bajos, entre 1,08 y 7,37 media= $2,51 \pm 1,70$. En la Tabla R.1.15 se muestran los datos de estos pacientes.

Tabla R.1.15
Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA -

Nombre	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	*ALT
AFF	NEG	1,17	POS	4,80
ABV	NEG	0,00	POS	7,37
BBS	NEG	0,00	POS	1,12
CMA	NEG	0,00	POS	1,82
CSMA	NEG	2,43	POS	2,04
CYMP	NEG	0,00	POS	1,90
CGR	NEG	2,07	POS	1,27
CCR	NEG	1,82	POS	1,63
FUC	NEG	2,72	POS	5,06
GLB	NEG	0,24	POS	1,30
GNMA	NEG	0,83	POS	1,28
	NEG	0,00	POS	3,12
GDC	NEG	0,00	POS	3,63
	NEG	0,75	POS	3,60
KM	NEG	1,26	POS	1,40
LMFJ	NEG	0,48	POS	1,37
LPS	NEG	0,00	POS	5,36
MLF	NEG	1,76	POS	2,39
NEF	NEG	0,47	POS	1,36
PRJ	NEG	0,00	POS	1,77
SAJ	NEG	0,00	POS	1,87
VGJA	NEG	0,29	POS	1,08
WA	NEG	0,00	POS	1,22

*ALT expresado en UI/mL

En cuanto a los valores de transaminasas, solo dos de los 20 pacientes presentó una elevación de las mismas, uno de ellos siendo moderado (paciente WA, valor de ALT 65 UI/ML no atribuibles a VHC) en comparación con el otro (CYMP, ALT de 262 UI/ML).

1.5 Ag VHC vs PCR

Se ha analizado la carga viral en 181 muestras de las 952 en las que se ha determinado la presencia de Ag VHC (19,01% de las muestras). La distribución de los resultados se muestra en la Tabla R.1.16.

Tabla R.1.16

Desglose de resultados de Ag VHC frente a PCR

		Ag VHC +	Ag VHC -	Ag VHC Zgrp	Ag VHC Zgr	TOTAL
PCR+* ²	>10 ⁴ UI/mL	70	1	1	0	72
	<10E ⁴ UI/mL	8	39	15	0	62
PCR-		2	37	4	4	47
PCR ND		80	682	5	4	771
TOTAL		160	759	25	8	952

*Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

*²Carga viral en UI/mL.

La concordancia se ha cifrado en un 74,59% merced a 135 muestras (78 Ag VHC + / PCR+, 16 Ag VHC Zgrp / PCR+; 37 Ag VHC - / PCR -, cuatro Ag VHC Zgr / PCR -) de las 181 evaluadas.

Entre las 134 muestras con PCR positiva, se aprecia como 40 (29,85%) han resultado Ag VHC falsos negativos. De todos estos, un 97,5% (39 de las 40 muestras) se corresponden con cargas virales inferiores a 10⁴ UI/mL.

Respecto a los verdaderos positivos, también resulta llamativo ver como entre aquellas muestras en las que los valores de Ag VHC obtenidos en un primer análisis resultaron en Zona Gris y que posteriormente se confirmaron como positivas, hay un predominio claro de cargas virales por debajo de las citadas 10⁴ UI/mL (15 de las 16 muestras con este patrón de Ag VHC). Por último, y en esta misma línea, se ha apreciado como 70 de las 78 (89,74%) muestras Ag VHC + desde un primer análisis y PCR+ presentaron cargas virales superiores a 10⁴ UI/mL.

Entre las discordancias cabe destacar las seis muestras de cinco pacientes, dos mujeres y tres varones (Tabla R.1.17), falsos positivos frente a Ag VHC (dos positivos en un primer análisis y cuatro confirmados como positivos tras presentar valores en Zona Gris).

Tabla R.1.17
Muestras con resultados discordantes Ag VHC / PCR

Nombre	Edad	Ag VHC	1ºAnálisis	2ºAnálisis	Anti-VHC	LIA VHC	PCR	ALT
BOS	33	POS	11,65	-	NEG	0,15	ND	NEG 24
		Zgrp	9,32	5,54	NEG	0,16	ND	NEG 20
CRM	57	Zgrp	4,29	5,90	NEG	0,33	ND	NEG 73
II	42	POS	10,81	-	POS	11,59	POS	NEG 16
KK	43	Zgrp	3,81	3,87	NEG	0,14	ND	NEG 54
LAJP	72	Zgrp	3,98	4,07	NEG	0,22	ND	NEG 20

*Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos.

Dentro de este grupo, los valores mínimo, máximo y media de Ag VHC en un primer análisis fueron de 3,81, 11,65 fmol/L y $7,31 \pm 3,67$ fmol/L respectivamente mientras que en el segundo análisis para aquellas muestras en Zona Gris fueron 3,87, 5,90 y $4,84 \pm 1,02$ fmol/L respectivamente. Los valores medios de Anti-VHC por su parte fueron $S/CO=2,09 \pm 4,65$ con un valor S/CO mínimo de 0,14 y un máximo de 11,59. Dos de estos pacientes (BOS y LAJP) se trataban de pacientes sometidos a sesiones de hemodiálisis, mientras que CRM y KK estaban implicados en el programa de trasplantes. La paciente II estaba diagnosticada de VHC previamente y había recibido tratamiento en 2007, objetivándose una respuesta viral sostenida que persiste hasta la fecha.

Centrándonos en las cargas virales por encima o por debajo de 10^4 UI/mL tenemos que el 1,39% de las muestras (1 muestra de 72) con carga viral por encima de dicha cifra fue Ag VHC negativo. Por otro lado, 39 (62,90%) de las 62 muestras en las que la carga viral fue inferior a la citada cifra resultaron en una antigenemia falsamente negativa.

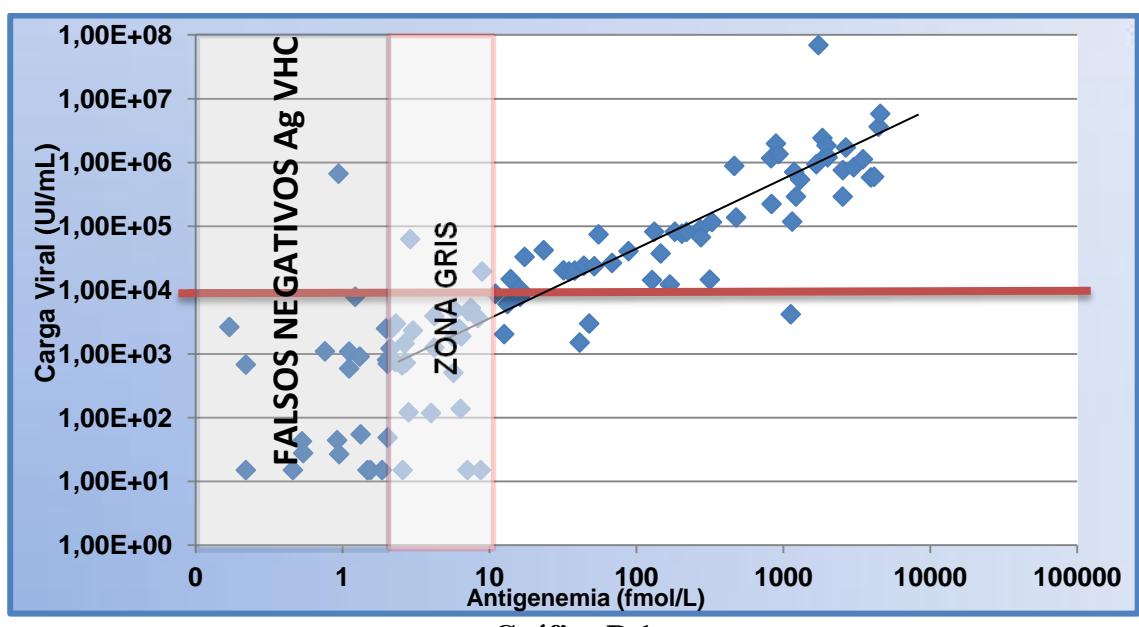
Para averiguar la frecuencia de cargas virales $< 10^4$ UI/mL hemos analizado lo ocurrido durante el periodo de estudio (2010-2014), en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. En este periodo de tiempo se determinó la carga viral en 5325 muestras, resultando positivas 2854 (53,59%) con una media de $5,67 \times 10^6$ UI/mL y con un total de 2562 muestras (89,77%) por encima de 10^4 UI/mL y 292 (10,23%) de 191 pacientes por debajo. Al menos el 94,86% de las muestras con una carga viral $< 10^4$ UI/mL pertenecían a pacientes tratados para la hepatitis C.

Comparativamente, la proporción de muestras con PCR VHC positiva fue significativamente superior ($p<0,001$) a las de muestras Ag VHC positivo. Concretamente se obtuvo un 74,03% (134 muestras de 181 a las que se determinó su carga viral) de muestras PCR+ frente a un 55,24% (100 muestras de 181) de muestras Ag VHC+. Estos datos están relacionados con la mayor sensibilidad de la PCR para cargas virales inferiores a 4 logaritmos, como la que se detecta en pacientes tratados, grupo bien representado en nuestro estudio.

Se ha trazado una gráfica sobre 134 muestras analizadas con carga viral positiva. Se han diferenciado los resultados según los niveles de Ag VHC (fmol/L) y los de ARN VHC (UI/mL), teniendo en cuenta que:

- Valores de Ag VHC Zona Gris (> 3 fmol/L y < 10 fmol/L)
- Valores de Ag VHC > 10 fmol/L (por encima de la Zona Gris)
- Valores de carga viral $> 10^4$ UI/mL (con niveles de ARN VHC superiores a dicho valor tan solo se ha detectado una muestra Ag VHC negativa).

De esta forma se ha obtenido la Gráfica R.1 ($n=134$) en donde se aprecia que los resultados de Ag VHC, presentan una discreta correlación con los niveles de ARN VHC ($r=0,5597$).



Hubo 69 pacientes de este grupo (22 mujeres y 47 varones) en los que se determinó el genotipo infectante previa solicitud del facultativo clínico.

Los genotipos de los 38 pacientes que tenían una carga viral $\geq 10^4$ UI/mL se exponen en la Tabla R.1.18.

Tabla R.1.18
Resultados de antigenemia en función de Genotipo VHC

Genotipo	Ag VHC +	Ag VHC -	Total
1	3	0	3
1a	7	0	7
1b	11	0	11
2	0	0	0
2a/2c	1	0	1
3a	7	0	7
4	6	0	6
4c/4d	2	1	3
Total	37	1	38

*En Ag VHC + se incluyen las Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos. En Ag VHC - se incluyen las Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

Puede observarse que la prueba del Ag VHC ha sido positiva en todos ellos excepto en un paciente con genotipo 4c/4d quien presentaba una carga viral de $6,25 \times 10^4$ UI/mL.

Los genotipos de los 31 pacientes que tenían una carga viral $< 10^4$ UI/mL se exponen en la Tabla R.1.19. De estos pacientes, hubo 21 en los que la antigenemia resultó negativa.

Tabla R.1.19
Resultados de antigenemia en función de Genotipo VHC en pacientes con baja CV

Genotipo	Ag VHC +	Ag VHC -	Total
1	0	0	0
1a	2	2	4
1b	4	9	13
2	0	0	0
2a/2c	0	0	0
3a	2	7	9
4	1	1	2
4c/4d	1	2	3
Total	10	21	31

*En Ag VHC + se incluyen las Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos. En Ag VHC - se incluyen las Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

En la Tabla R.1.20 presentamos los genotipos de los 21 pacientes con antigenemia negativa en los que la carga viral fue $< 10^4$ UI/mL.

Tabla R.1.20
Distribución de cargas virales por genotipo

Genotipo	1a	1b	3a	4	4c/4d	Total
VMCV	-	$8,76 \times 10^2$	$2,86 \times 10^2$	-	-	$4,59 \times 10^3$
DS	-	$1,11 \times 10^3$	$7,68 \times 10^2$	-	-	$1,38 \times 10^3$
Vmáx	$7,83 \times 10^3$	$2,63 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$8,04 \times 10^2$	$6,65 \times 10^3$	$6,25 \times 10^4$
Vmín	$3,36 \times 10^3$	< 15	< 15	-	$7,22 \times 10^2$	< 15
NºS	2	9	7	1	2	21

*VMCV: Valor medio de la carga viral, DS: Desviación estándar, Vmáx: Valor máximo, Vmín: Valor mínimo. NºS: Nº de sueros con ese genotipo. Las cargas virales se expresan en UI/mL:

1.6 Resultados en Zona Gris

En total, 33 sueros (3,46%) resultaron en Zona Gris, correspondientes a 32 pacientes, 21 varones y 11 mujeres, con una edad media de $51,81 \pm 12,38$ años. Hubo 25 (76,76%) sueros en los que, tras repetición, se confirmó el resultado de Ag VHC como positivo, 17 hombres y ocho mujeres, con valores de antigenemia entre 3,02 y 9,32 (media: $5,74 \pm 1,81$), frente a ocho (24,24%), cuatro mujeres, cuatro varones, con valores de antigenemia entre 3,35 y 9,93 (media: $5,30 \pm 2,10$) que fueron valorados definitivamente como negativos.

Entre los confirmados como positivos, se observaron 19 sueros con Anti-VHC y LIA positivos, 16 de ellos con PCR realizada y que resultó positiva, en rangos 10^1 - 10^4 UI/ml. En otros seis (21,21%), con valores de Ag VHC entre 3,81 y 9,32 (media= $4,99 \pm 1,96$), se obtuvieron resultados Anti-VHC negativos, en cuatro de los cuales se pudo realizar PCR con resultado negativo, no así en los dos sueros restantes donde no hubo muestra suficiente.

En cuanto a los confirmados como negativos, siete sueros resultaron Anti-VHC negativos, en tres de ellos se pudo realizar PCR que fue negativa. Por último, el suero restante de este grupo, presentó valores positivos para Anti-VHC siendo en este caso la PCR negativa.

Sus resultados en función del resultado de la determinación de Anti-VHC así como de PCR se muestran en las tablas R.1.21 y R.1.22.

En la tabla R.1.21 se exponen los resultados de aquellas muestras en las que se obtuvo un primer resultado en Zona Gris y los patrones que estas mostraron en combinación con su determinación de Anti-VHC.

Tabla R.1.21
Desglose de resultados de Ag VHC en Zona Gris frente a Anti-VHC

	Ag VHC Zgrp	Ag VHC Zgrn	TOTAL
Anti VHC+	19	1	20
Anti VHC-	6	7	13
TOTAL	25	8	33

Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos; Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

En la tabla R.1.22 se exponen los resultados de aquellas muestras en las que se obtuvo un primer resultado en Zona Gris y los patrones que estas mostraron en combinación con su determinación de la carga viral.

Tabla R.1.22
Desglose de resultados de Ag VHC en Zona Gris frente a PCR

	Ag VHC Zgrp	Ag VHC Zgrn	TOTAL
PCR+	16	0	16
PCR-	4	4	8
TOTAL	20	4	24

Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos; Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

Los detalles de las sucesivas determinaciones de antigenemia en los pacientes incluidos en este grupo así como sus resultados de Anti-VHC, LIA y PCR, se exponen en la Tabla R.1.23.

Tabla R.1.23
Pacientes con resultado de Ag VHC en Zona Gris

NOMBRE	Ag VHC	Repeticiones			ANTI-VHC	LIA	* ² PCR	*ALT
BMJ	Zgrp	7,09	8,46	-	POS	11,37	POS	$1,50 \times 10^1$
BMFJ	Zgrp	3,98	3,42	-	NEG	0,23	ND	ND
BOS	Zgrp	9,32	5,54	-	NEG	0,16	ND	NEG
CRM	Zgrp	4,29	5,90	-	NEG	0,33	ND	NEG
CGMT	Zgrp	4,12	5,08	-	POS	10,71	POS	ND
CCM	Zgrp	6,36	4,56	-	POS	11,21	POS	$1,37 \times 10^2$
EPR	Zgr	4,40	0,06	0,03	NEG	0,06	ND	ND
ERM	Zgrp	7,48	9,04	-	POS	12,35	POS	$5,21 \times 10^3$
EBJ	Zgrp	4,22	4,20	-	POS	11,55	POS	$1,25 \times 10^3$
FCJ	Zgr	9,93	0,57	0,08	NEG	0,03	ND	ND
FLJ	Zgr	3,49	0,00	0,30	NEG	0,04	ND	ND
GRJJ	Zgrp	6,24	3,12	-	POS	15,23	POS	$2,45 \times 10^3$
GGCM	Zgrp	4,01	6,43	-	POS	10,12	POS	$1,18 \times 10^2$
GMAM	Zgrp	4,48	8,49	-	POS	16,01	POS	ND
GVA	Zgrp	5,18	12,72	-	NEG	0,14	ND	ND
KK	Zgrp	3,81	3,87	-	NEG	0,14	ND	NEG
	Zgr	5,14	1,19	0,98	NEG	0,10	ND	NEG
LAJP	Zgrp	3,98	4,07	-	NEG	0,22	ND	NEG
LLA	Zgrp	5,72	4,33	-	POS	15,49	POS	$1,79 \times 10^3$
LLD	Zgr	4,40	1,21	0,00	NEG	0,06	ND	ND
MIO	Zgrp	5,69	5,99	-	POS	12,83	POS	$5,04 \times 10^2$
MCMP	Zgrp	3,02	3,42	-	POS	14,25	POS	$2,31 \times 10^3$
MANA	Zgrp	7,17	5,65	-	POS	16,41	POS	$4,62 \times 10^3$
MAJ	Zgrp	8,37	7,37	-	POS	12,15	POS	$3,63 \times 10^3$
MLMP	Zgr	5,99	0,56	0,30	NEG	0,08	ND	NEG
NGAR	Zgrp	4,22	8,21	-	POS	10,25	POS	$3,90 \times 10^3$
OM	Zgrp	6,45	7,57	-	POS	14,62	POS	$1,88 \times 10^3$
PRF	Zgr	5,71	1,12	0,00	NEG	0,08	ND	NEG
PCJ	Zgr	3,35	1,25	1,57	POS	13,14	POS	NEG
RPCL	Zgrp	4,82	6,00	-	POS	12,10	POS	ND
RZPD	Zgrp	8,73	7,53	-	POS	14,28	POS	$1,50 \times 10^1$
RVJC	Zgrp	5,80	7,01	-	POS	15,21	POS	$4,78 \times 10^3$
SPG	Zgrp	8,92	9,57	-	POS	15,51	POS	$1,95 \times 10^4$

Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

ND: no determinado; *ALT expresada en UI/mL; ²Carga viral en UI/mL.

Tabla R.1.24
Resumen resultados Grupo estudio nº1

Grupo	Nº sueros	Ag VHC			Anti-VHC			PCR VHC		
		Máx	Mín	Media	Máx	Mín	Media	Máx	Mín	Media
Ag VHC + / Anti-VHC +	175	>20.000	3,02	2.596,66 ± 3.979,78	19,28	1,29	13,58 ± 2,71	6,9 x 10 ⁷	<15	3,45 x 10 ⁶ ± 9,48 x 10 ⁶
Ag VHC - / Anti-VHC -	613	9,93	0	0,38 ± 0,85	0,99	0	0,09 ± 0,11	NV		
Ag VHC + / Anti-VHC -	10	4.154,85	3,81	470,59 ± 1.302,88	0,33	0,02	0,18 ± 0,09	NV		
Ag VHC - / Anti-VHC +	154	5,81	0	0,59 ± 0,97	17,9	1,08	7,18 ± 5,54	6,25 x 10 ⁴	<15	2,72 x 10 ³ ± 1,01 x 10 ³

*Ag VHC expresado en fmol/L; Anti-VHC expresado en S/CO; PCR expresado en UI/mL; NV: Nº de muestras insuficiente por lo que no es valorable; Máx= Valor máximo observado; Mín= valor mínimo observado. Hubo pacientes que en sus diversos análisis presentaron patrones diferentes por lo que figuran en más de un grupo.

En la tabla R.1.24 se expresan los valores de Ag VHC Anti-VHC y PCR en función de los cuatro perfiles serológicos de VHC expuestos al principio. Como puede verse el grupo con Ag VHC y Anti-VHC positivos presenta valores medios significativamente más elevados en comparación con cada uno de los tres otros grupos ($p < 0,05$).

A continuación detallamos los resultados obtenidos en las dos poblaciones específicas evaluadas, para precisar si alguno de los resultados apreciados en el conjunto de los pacientes podría ser matizado por el tipo de paciente.

Grupo 2- Pacientes hemodializados

En este grupo hemos analizado 391 sueros de 183 pacientes, 76 mujeres y 107 varones, con edades comprendidas entre los 19 y 93 años, con una edad media de $65,31 \pm 15,99$ años y cuyos resultados exponemos de la siguiente manera:

- En la Tabla R.2.1 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de Anti-VHC de muestras pertenecientes a pacientes hemodializados.

Tabla R.2.1			
Comparación de resultados de Ag VHC y Anti-VHC			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
Anti-VHC +	15	14	29
Anti-VHC -	3	359	362
TOTAL	18	373	391

- En la Tabla R.2.2 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de PCR en aquellas muestras pertenecientes a pacientes hemodializados.

Tabla R.2.2			
Comparación de resultados de Ag VHC y PCR			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
PCR +	4	1	5
PCR -	3	3	6
TOTAL	7	4	11

En términos globales se observan resultados concordantes en el 95,65% (merced a 374 de 391 muestras) y en un 63,63% de las muestras en las que se determinó Ag VHC y ARN viral (7 de 11 sueros). Por el contrario, el 4,35% (17 sueros de los citados 391 con determinación de Ag VHC y Anti-VHC) y el 36,37% (4 sueros de 11 con determinación de antigenemia VHC y PCR) respectivamente presentaron resultados discordantes. Cabe destacar que de las seis muestras con patrón Ag VHC + / PCR - observadas en el estudio global, tres correspondieron a este grupo.

A continuación se desglosan los diferentes patrones en función de sus valores de antigenemia (discerniendo entre resultados de Ag VHC positivos, negativos y aquellos cuyos valores en un primer análisis resultaron en el rango de la Zona Gris por lo que requirieron repetir la técnica) y Anti-VHC.

2.1 Ag VHC + Anti-VHC +

Se obtuvieron 15 sueros (3,83%), con este patrón analítico. El valor mínimo de Ag VHC ha sido de 7,17, mientras que el máximo ha sido de 10.531,55 con una media de $3272,96 \pm 3779,74$ fmol/L, frente a un valor S/CO mínimo de Anti-VHC de 11,12 y máximo de 14,84; media $15,06 \pm 1,48$. En la Tabla R.2.3 se desglosan los resultados de los sueros con patrón Ag VHC + / Anti-VHC +.

Tabla R.2.3
Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC +	Ag VHC ^{1*} Zgrp	Ag VHC ^{2*} Zgr
Anti-VHC +	LIA+	14	1
	LIA-	0	0
	LIA IND	0	0
TOTAL	14	1	0

^{1*} Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos. ^{2*}Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

Una única muestra presentó un patrón con Anti-VHC + con valores de Ag VHC en el primer análisis en Zona Gris (Zgr) y posteriormente se confirmó como positiva. Dicha muestra pertenece a MANA, varón de 61 años procedente de Guinea Ecuatorial y cuyos diferentes análisis se exponen en la Tabla R.2.4.

Tabla R.2.4

Diferentes análisis a los que ha sido sometido el paciente MANA

Fecha	Ag VHC	1ºAnálisis	2ºAnálisis	Anti-VHC	LIA	*PCR	* ² ALT
19/02/2010	NEG	1,22	-	POS	16,17	POS	$7,83 \times 10^3$
08/05/2012	POS	146,42	-	POS	15,52	POS	$3,73 \times 10^4$
06/11/2012	Zgrp	7,17	5,65	POS	16,41	POS	$4,62 \times 10^3$
12/11/2013	POS	11,45	-	POS	14,68	POS	ND

*Carga viral expresada en UI/mL; ²*Valores ALT expresados en UI/mL.

Analizando la evolución de los diversos patrones de este paciente, podemos deducir que, coincidiendo con niveles de carga viral moderadamente bajos (en dos de los tres análisis se cifró por debajo de 10^4 UI/mL, valor que se estima como el límite de detección de la técnica para la determinación de la antigenemia según la literatura consultada), en una de las determinaciones de antigenemia, el resultado fue falsamente negativo mientras que en el otro presentó el ya mencionado patrón de Ag VHC en Zona Gris en un primer análisis que posteriormente se confirmaría como positivo. En todo momento sus valores de ALT permanecieron dentro del rango de la normalidad.

2.2 Ag VHC - Anti-VHC -

Se obtuvieron 359 sueros (91,81%) con este patrón analítico. El valor mínimo, máximo y medio de Ag VHC han sido 0, 1,76 y $0,26 \pm 0,68$ fmol/L respectivamente frente a unos valores S/CO de Anti-VHC de 0,22, 0 y $0,1 \pm 0,04$ respectivamente. En la Tabla R.2.5 se desglosan los resultados de los sueros con patrón Ag VHC - / Anti-VHC -.

Tabla R.2.5

Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC -	Ag VHC *Zgr
Anti-VHC -	LIA+	0
	LIA-	0
	LIA ND	354
TOTAL	354	5

* Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

En las muestras que han presentado este patrón solo destacan las cinco (1,39% respecto a todas las muestras encontradas con este perfil) que mostraron valores en Zona Gris en un primer análisis (ver Tabla R.2.6).

Tabla R.2.6

Pacientes con el patrón Ag VHC Zgr / Anti-VHC -

Nombre	ED	*Ag VHC	1ºAnálisis	2ºAnálisis	3ºAnálisis	Anti-VHC	PCR	ALT* ⁴
EPR	62	Zgr	4,40	0,06	0,03	NEG / 0,06	* ³ ND	16
FCJ	85	Zgr	9,93	0,57	0,08	NEG / 0,03	ND	10
FLJ	61	Zgr	3,49	0,00	0,03	NEG / 0,04	ND	14
MLMP	42	Zgr	5,99	0,56	0,30	NEG / 0,08	NEG	12
PRF	64	Zgr	5,71	0,00	1,13	NEG / 0,08	NEG	11

*Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

*²NS: No hubo volumen suficiente de suero para nueva determinación. *³ND: No determinada. *⁴ALT expresado en UI/mL

Siendo en todos los casos el resultado concordante con los resultados de Anti-VHC hallados, en dos casos (MLMP y PRF) se pudo realizar la PCR, siendo esta igualmente negativa y confirmándose, así, la negatividad de la infección actual. No se dispusieron de determinaciones de la carga viral en el resto de pacientes con este patrón analítico.

2.3 Ag VHC + Anti-VHC -

Se obtuvieron tres sueros de dos pacientes con este patrón analítico. En la Tabla R.2.7 se desglosan los resultados de los sueros con patrón Ag VHC + / Anti-VHC -.

Tabla R.2.7

Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC +	Ag VHC *Zgrp
Anti-VHC -	LIA+	0
	LIA-	0
	LIA ND	1
TOTAL	1	2

* Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos

Los datos correspondientes a cada uno de los análisis se reflejan en la Tabla R.2.8.

Tabla R.2.8

Pacientes con el patrón Ag VHC + / Anti-VHC -

Nombre	ED	Ag VHC	1a Análisis	2ºAnálisis	Anti-VHC	PCR	ALT* ³
BOS	33	POS	11,65	-	NEG	0,15	NEG
		Zgrp	9,32	5,54	NEG	0,16	NEG
LAJP	72	Zgrp	3,98	4,07	NEG	0,22	NEG

* Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

*²Carga viral en UI/mL. *³ALT expresado en UI/mL

Se analizaron las tres muestras mediante PCR resultando esta negativa, lo cual sugiere un falso positivo al Ag VHC. Destaca los patrones que presentó el paciente BOS, con dos muestras, quien en su primer análisis mostraba una positividad cercana al límite superior de la Zona Gris (11,65 fmol/L), mientras que en una segunda muestra analizada dos semanas después los valores fueron ligeramente inferiores pero, en cualquier caso, no lo suficiente como para resultar negativos, por lo que, tras contrastar con la determinación de la carga viral ambos sueros, se confirmaron como un patrón de falsa positividad. Respecto al paciente LAJP, su determinación de Ag VHC resultó positiva tras obtener repetidamente valores de antigenemia en Zona Gris y en ambos casos con valores cercanos al límite inferior de ésta. En las tres muestras los valores de Anti-VHC fueron negativos con valores S/CO muy bajos.

2.4 Ag VHC - Anti-VHC +

Se obtuvieron 14 sueros con este patrón analítico. Los valores de Ag VHC han estado comprendidos entre 0 y 2,07, media de $0,42 \pm 0,68$ fmol/L, frente a unos valores máximo y mínimo de S/CO de Anti-VHC de 1,26 y 16,17, media $6,14 \pm 5,09$. En la Tabla R.2.9 se desglosan los resultados de los sueros con patrón Ag VHC - / Anti-VHC +.

Tabla R.2.9
Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC -	Ag VHC *Zgr
Anti-VHC +	LIA+	3
	LIA-	4
	LIA IND	7
TOTAL		14
		0

* Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris
y posteriormente confirmados como negativos

Se pudo realizar PCR a uno de los 14 sueros. Dicho suero perteneció al paciente MANA quien, en este caso, presentaba un patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA + (la evaluación de los resultados de todos los sueros analizados de esta paciente pueden verse en la Tabla R.2.4) resultando la PCR positiva con una carga viral de $7,83 \times 10^3$ UI/mL.

A continuación desglosamos los resultados de las muestras con este patrón y sin determinación de PCR paralela, en función del resultado LIA obtenido (Tabla R.2.10, R.2.12, R.2.13).

A) LIA indeterminado:

Tabla R.2.10						
Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA IND						
Nombre	Ag VHC	Anti-VHC	LIA / Bandas*	ALT* ²		
CGAA	NEG 0,00	POS 6,06	IND / NS3 2+	23		
	NEG 0,00	POS 4,81	IND / NS3 3+	16		
	NEG 0,00	POS 3,75	IND / NS3 2+	7		
	NEG 0,00	POS 3,63	IND / NS3 2+	6		
SEM	NEG 0,42	POS 3,25	IND / NS3 2+	6		
	NEG 0,00	POS 4,20	IND / NS3 2+	5		
	NEG 0,00	POS 4,40	IND / NS3 2+	7		

*Bandas observadas y su intensidad en aquellas muestras con LIA VHC IND (indeterminado). ²ALT expresado en UI/mL

Hubo siete sueros de dos pacientes, una mujer (paciente SEM, cinco sueros) y un varón (paciente CGAA, dos sueros) con una edad de 71 y 45 años respectivamente, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - (valor mínimo 0 fmol/L, máximo 0,42 fmol/L, media $0,06 \pm 0,16$ fmol/L) / Anti-VHC + / PCR ND (no determinada) / LIA IND. Los valores S/CO de Anti-VHC son bajos (mínimo 3,25, máximo 6,06, media $4,36 \pm 1,26$), lo cual acostumbra a traducirse en falsos positivos o pacientes curados que están perdiendo los Anti-VHC. Esto se correlaciona perfectamente con los resultados de LIA indeterminados (Tabla R.2.11) tras cuya determinación únicamente se detectó la banda NS3, la más sensible y específica de todas las bandas LIA.

Tabla R.2.11
Distribución de las bandas LIA VHC y sus Intensidades
en pacientes con patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND /LIA IND

INTENSIDAD	+/-	BANDAS LIA VHC				
		NS3	C1	C2	NS4	NS5
	1+	-	-	-	-	-
	2+	6 (2)	-	-	-	-
	3+	1 (1)	-	-	-	-

*Entre paréntesis el número de pacientes a los que corresponden las muestras descritas

B) LIA positivo

En la Tabla R.2.12 se muestran los dos sueros de dos pacientes (se excluye el análisis del paciente MANA el cual ya ha sido evaluado previamente), una mujer y un varón con unas edades de 68 y 70 años respectivamente, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA +. La diferencia entre los valores de Anti-VHC en cada uno de estos pacientes es notable, siendo dicho valor más alto en el caso del paciente NNA (S/CO= 14,82) mientras que, en el caso del paciente SEM, fue sensiblemente inferior (valor S/CO= 3,77). En esta descripción no está el paciente con este patrón y PCR positiva (paciente MANA).

Tabla R.2.12
Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA +

Nombre	Edad	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	ALT*
NNA	68	NEG 0,00	POS	14,82	POS 17
SEM	70	NEG 1,48	POS	3,77	POS 8

*ALT expresado en UI/mL

C) LIA negativo

En la Tabla R.2.13 se muestran los cuatro sueros de dos pacientes, una mujer (con tres sueros) y un varón con unas edades de 74 y 30 años respectivamente, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA - /PCR ND. Los valores de Anti-VHC son bajos en todos los casos (media S/CO= $2,44 \pm 1,64$) con un valor S/CO máximo de 3,63 frente a un mínimo de 1,27.

Tabla R.2.13
Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA -

Nombre	Edad	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	ALT
CGR	30	NEG 2,07	POS 1,27	NEG 11	
		NEG 0,00	POS 3,12	NEG 13	
GDC	74	NEG 0,00	POS 3,63	NEG 14	
		NEG 0,75	POS 3,6	NEG 12	

*ALT expresado en UI/mL

Todos los sueros fueron considerados como falsos positivos Anti-VHC.

2.5 Ag VHC vs PCR

Se ha determinado la carga viral en 11 muestras de las 391 en las que se ha evaluado la presencia de Ag VHC (2,81% de las muestras). La distribución de los resultados se muestra en la Tabla R.2.14.

Tabla R.2.14
Desglose de resultados de Ag VHC frente a PCR

		Ag VHC +	Ag VHC -	Ag VHC Zgrp	Ag VHC Zgr	TOTAL
PCR+* ²	>10 ⁴ UI/mL	3	0	0	0	3
	<10 ⁴ UI/mL	0	1	1	0	2
PCR-		1	1	2	2	6
PCR ND		11	366	0	3	380
TOTAL		15	368	3	5	391

*Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

*²Carga viral en UI/mL

La concordancia se ha cifrado en un 63,63% merced a siete muestras (tres Ag VHC + / PCR+, un Ag VHC Zgrp / PCR+; uno Ag VHC - / PCR -, dos Ag VHC Zgr / PCR -) de las 11 evaluadas.

Los detalles de las 11 muestras a las que se ha realizado PCR se exponen en la Tabla R.2.15.

Tabla R.2.15
Pacientes en hemodiálisis con determinación paralela de Ag VHC y PCR

Nombre	Sexo	Edad	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	PCR	ALT
BOS	V	33	POS	11,65	NEG	0,15	ND
			Zgrp	9,32	NEG	0,16	ND
FMA	V	67	POS	7557,57	POS	14,84	POS
							$3,11 \times 10^6$
LAJP	V	72	Zgrp	3,98	NEG	0,22	ND
			NEG	1,22	POS	16,17	POS
MANA	V	63	POS	146,42	POS	15,52	POS
			Zgrp	7,17	POS	16,41	POS
MLMP	F	42	Zgr	5,99	NEG	0,08	ND
							NEG
PRF	V	64	Zgr	5,71	NEG	0,08	NEG
SCJA	V	73	NEG	0,96	NEG	0,08	NEG
SCT	F	65	POS	5252,49	POS	14,94	POS
							$2,52 \times 10^7$

*Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

*²Carga viral en UI/mL; ALT en UI/mL

Entre las cinco muestras con PCR positiva, se aprecia como una de estas ha resultado Ag VHC falso negativo, correspondiente al paciente MANA, cuyo caso se ha expuesto en el apartado correspondiente a muestras con patrón Ag VHC + / Anti-VHC + (Tabla R.2.4).

Por otro lado, analizando las seis muestras con PCR negativas, tenemos tres muestras de dos pacientes, BOS y LAJP, que han presentado resultados de Ag VHC discordantes. Ambos casos se exponen en el apartado correspondiente a las muestras con patrón Ag VHC + / Anti-VHC - (Tabla R.2.8).

Tabla R.2.16
Resumen resultados Grupo estudio nº2

Grupo	Nº sueros	Ag VHC			Anti-VHC		
		Máx	Mín	Media	Máx	Mín	Media
Ag VHC + / Anti-VHC +	15	10.531,55	7,17	3.272,96 ± 3.779,74	14,84	11,12	15,06 ± 1,48
Ag VHC - / Anti-VHC -	359	1,76	0	0,26 ± 0,68	0,22	0	0,1 ± 0,04
Ag VHC + / Anti-VHC -	3	11,65	3,98	8,31 ± 3,93	0,22	0,15	0,18 ± 0,03
Ag VHC - / Anti-VHC +	14	2,07	0	0,42 ± 0,68	16,17	1,26	6,14 ± 5,09

*Ag VHC expresado en fmol/L; Anti-VHC expresado en S/CO; NV: Todas las muestras han resultado negativas por lo que no es valorable; Máx= Valor máximo observado; Mín= valor mínimo observado.

En la tabla R.2.16 se expresan los valores de Ag VHC Anti-VHC y PCR en función de los cuatro perfiles serológicos de VHC expuestos al principio. Como puede verse el grupo con Ag VHC y Anti-VHC positivos presenta *valores medios significativamente más elevados* en comparación con cada uno de los tres otros grupos ($p < 0,05$).

Grupo 3- Pacientes incluidos en un programa de trasplantes

En este grupo hemos analizado 315 sueros de 257 pacientes, 63 mujeres y 194 varones, con una edad que va desde los 17 a los 85 años, siendo la media de $57,51 \pm 13,22$. Dichos pacientes se correspondieron con 176 posibles receptores (163 de hígado, 12 riñón y uno corazón) y 81 posibles donantes. Entre los posibles donantes 28 fueron descartados, 27 de ellos presentaron el patrón Ag - / Anti-VHC - mientras que uno de ellos presentó un patrón de infección activa con Ag VHC + / Anti-VHC +, que evaluaremos posteriormente.

- En la Tabla R.3.1 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de Anti-VHC de muestras de pacientes incluidos en el programa de trasplantes.

Tabla R.3.1			
Comparación de resultados de Ag VHC y Anti-VHC			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
Anti-VHC +	76	12	88
Anti-VHC -	6	221	227
TOTAL	82	233	315

- En la Tabla R.3.2 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de Anti-VHC en muestras de pacientes posibles donantes de órganos para analizar la capacidad de ambos indicadores para detectar infección por VHC.

Tabla R.3.2			
Comparación de resultados de Ag VHC y Anti-VHC			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
Anti-VHC +	1	0	1
Anti-VHC -	0	80	80
TOTAL	1	80	81

- En la Tabla R.3.3 se detallan los resultados de la determinación de Ag VHC y de PCR de muestras de pacientes incluidos en el programa de trasplantes, todos ellos posibles receptores.

Tabla R.3.3			
Comparación de resultados de Ag VHC y PCR			
	Ag VHC +	Ag VHC -	TOTAL
PCR +	20	0	20
PCR -	2	3	5
TOTAL	22	3	25

En términos globales se observan resultados concordantes en el 94,29% de las muestras en las que se determinó Ag VHC y Anti-VHC (merced a 297 de 315 muestras) y en un 92,00% de las muestras en las que se determinó Ag VHC y ARN viral (23 de 25 sueros). Por el contrario, un 5,71% (un total de 18 sueros de los citados 315 con determinación de Ag VHC y Anti-VHC) y un 8,00% (2 sueros de 25 con determinación de antigenemia VHC y PCR) respectivamente presentaron resultados discordantes. Cabe destacar que, en el grupo de posibles donantes de órganos, la concordancia entre Ag VHC y Anti-VHC fue del 100%. Todas las discordancias observadas tanto entre Ag VHC y Anti-VHC así como entre Ag VHC y PCR en este grupo poblacional corresponden al grupo de pacientes candidatos a receptores de órganos. En el caso de las PCR, se debe en gran medida a que no se realizó determinación de carga viral alguna en el grupo de posibles donantes por la situación de urgencia.

A continuación se desglosan los diferentes patrones en función de sus valores de antigenemia (discerniendo entre resultados de Ag VHC positivos, negativos y aquellos cuyos valores en un primer análisis resultaron en el rango de la Zona Gris por lo que requirieron repetir la técnica) y Anti-VHC. Igualmente se pormenorizan aquellos resultados con patrones discrepantes.

3.1 Ag VHC + Anti-VHC +

Se obtuvieron 76 sueros (24,12%) con este patrón analítico que han pertenecido a 60 pacientes, 59 posibles receptores (25,21% de los receptores) (58 de hígado, una de riñón) y una posible donante (1,23% de los donantes). Los valores de Ag VHC oscilaron entre 4,12 y 15993,34, media de $2464,79 \pm 3297,50$ fmol/L. Los valores S/CO de Anti-VHC estuvieron comprendidos entre 6,00 y 19,28, media de $13,63 \pm 2,53$. Los valores de la carga viral en aquellas muestras con este patrón donde fue determinada (19 sueros) fueron desde $<1,5 \times 10^1$ UI/mL hasta $6,9 \times 10^7$ UI/mL con un valor medio de $5,73 \times 10^6 \pm 1,64 \times 10^7$ UI/mL. La paciente posible donante fue descartada para tal fin. En la Tabla R.3.4 se desglosan los resultados de los sueros con este patrón.

Tabla R.3.4
Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC +	Ag VHC ^{1*} Zgrp
Anti-VHC +	LIA+	72
	LIA-	0
	LIA IND	0
TOTAL	72	4

^{1*} Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos.

En las cuatro (1,26% de las evaluadas en este grupo) muestras con Anti-VHC + y cuyos valores de Ag VHC resultaron en Zona Gris, los valores presentados de Ag VHC en el primer análisis fueron desde 4,12 a 7,09 fmol/L, siendo la media de $5,12 \pm 1,34$ fmol/L, en el segundo análisis oscilaron entre 6,00 y 8,46 fmol/L, media $6,99 \pm 1,75$ fmol/L. La media de los valores S/CO de Anti-VHC ha sido $12,78 \pm 2,26$. Los datos de las muestras en Zona Gris confirmadas como positivas se exponen en la Tabla R.3.5.

Tabla R.3.5

Pacientes con valores de Ag VHC en Zona Gris

Paciente	Edad	Ag VHC	1ºAnálisis	2º Análisis	Anti-VHC	LIA	*PCR
BMJ	47	Zgrp	7,09	8,46	POS / 12,32	POS	$<1,5 \times 10^1$
CGMT	63	Zgrp	4,12	5,03	POS / 10,71	POS	ND
GMAM	69	Zgrp	4,48	8,49	POS / 16,01	POS	ND
RPCL	47	Zgrp	4,82	6,00	POS / 12,10	POS	ND

*Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos; ²Carga viral en UI/mL.

Se efectuó PCR en una de las cuatro muestras (Tabla R.3.5) mostrando una carga viral prácticamente indetectable (carga viral $<1,5 \times 10^1$ UI/mL), perteneciendo esta muestra a un paciente en tratamiento.

3.2 Ag VHC - Anti-VHC -

Se obtuvieron 221 sueros (70,15%) con este patrón analítico. Los valores de Ag VHC han estado entre 0 y 5,14 fmol/L, media de $0,51 \pm 0,81$ fmol/L y unos valores S/CO de Anti-VHC entre 0 y 0,99, media $0,11 \pm 0,11$. Dentro de este grupo encontramos 80 muestras (98,76%) pertenecientes a otros tantos pacientes posibles donantes, de los cuales 27 fueron descartados por razones médicas, judiciales o familiares. En cuanto a las 141 muestras pertenecientes a candidatos a recibir un trasplante (63,80% de las muestras con este patrón por lo tanto) hubo 129 pertenecientes al programa de trasplante hepático, 11 renales y un cardíaco. En la Tabla R.3.6 se desglosan los resultados de los sueros con este patrón.

Tabla R.3.6

Desglose de resultados, valores de Ag VHC - y LIA

	Ag VHC -	Ag VHC *Zgr
Anti-VHC -	LIA+	0
	LIA-	0
	LIA ND	220
TOTAL	220	1

* Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos.

En las muestras que han presentado este patrón solo destaca la que mostró un valor Ag VHC en Zona Gris en un primer análisis y que pertenecía a la paciente KK. A esta paciente, mujer de 43 años de origen marroquí, se le pudieron analizar tres muestras en el marco de este estudio, así como otra muestra más al margen del mismo (Tabla R.3.7).

Tabla R.3.7

Patrones observados en la paciente KK

Nombre	Fecha	Ag VHC	1ºAnálisis	Repetición	Anti-VHC	PCR	ALT* ⁴
KK	15/04/2009		ND		NEG / 0,12	ND	45
	05/01/2012	Zgrp	3,81	3,87	NEG / 0,14	NEG	54
	16/03/2012	Zgr	5,14	*1,19 / 0,98	NEG / 0,10	NEG	77
	30/03/2012	NEG	0,00	ND	NEG / 0,10	ND	38

Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos; Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos; ND: No determinado; ALT expresado en UI/MI. * Valores correspondientes a 2º y 3º análisis respectivamente.

Una de las muestras seguía el patrón Ag VHC + / Anti-VHC - mientras que en otras dos resultaron Ag - / Anti-VHC - y en la evaluada al margen de nuestro estudio únicamente se determinó la presencia de Anti-VHC siendo la misma negativa. En ninguna de dichas muestras se determinó el LIA. Las dos primeras muestras evaluadas dentro de nuestro estudio (separadas en el tiempo por 70 días) dieron resultados de Ag VHC en Zona Gris. La primera se confirmó positiva tras repetición por duplicado, en contraposición con la determinación de la carga viral que resultó negativa. La segunda muestra se corresponde con la descrita en este apartado, confirmada como negativa tras repetición por duplicado (Tabla R.3.7), y resultando la carga viral negativa de nuevo. El 30 de marzo de 2012 (es decir, 14 días después del anterior análisis), tras ser sometida al trasplante hepático, se recibió una tercera muestra de esta paciente, determinándose negativa la presencia tanto de Ag VHC como de Anti-VHC. Los valores de ALT analizados en las primeras muestras fueron moderadamente elevados mientras que el análisis de la última muestra dio un resultado dentro del rango considerado como normal.

3.3 Ag VHC + Anti-VHC -

Se obtuvieron seis (1,90%) sueros pertenecientes a seis pacientes, con este patrón analítico, todos ellos candidatos a receptor de trasplante hepático. Los valores observados de Ag VHC han estado entre 3,81 y 477,50 fmol/L, con una media de $87,69 \pm 191,27$ fmol/L. Los valores S/CO de Anti-VHC han estado entre 0,02 y 0,33, media de $0,16 \pm 0,11$. En la Tabla R.3.8 se desglosan los resultados de los sueros con este patrón.

Tabla R.3.8

Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

	Ag VHC +	Ag VHC *Zgrp
Anti-VHC -	LIA+	0
	LIA-	0
	LIA ND	2
TOTAL	2	4

* Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris
y posteriormente confirmados como positivos

Se trataron de seis muestras pertenecientes a los seis pacientes reflejados en la Tabla R.3.9.

Tabla R.3.9

Pacientes con el patrón Ag VHC + / Anti-VHC -

Nombre	Edad	Ag VHC	1a Análisis	2ºAnálisis	Anti-VHC	PCR*	ALT* ²
BMFJ	41	Zgrp	3,98	3,42	NEG	0,23	ND 33
CRM	57	Zgrp	4,29	5,90	NEG	0,33	NEG 73
CGJ	48	POS	477,50	-	NEG	0,02	$1,37 \times 10^5$ 53
GVA	58	Zgrp	5,18	12,72	NEG	0,14	ND 13
KK	43	Zgrp	3,81	3,87	NEG	0,14	NEG 54
OLPA	64	POS	31,38	-	NEG	0,10	ND 17

Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

*Carga viral en UI/mL; ²ALT expresado en UI/mL

Se confirmó mediante PCR que dos muestras de dos pacientes, KK y CRM, se trataron de falsos positivos al Ag VHC. Por otro lado las dos muestras con Ag VHC positivas desde el primer análisis correspondieron a los pacientes CGJ y OLPA. CGJ presentó paralelamente una PCR + con una carga viral elevada, siendo valorada como falso Anti-VHC -. OLPA no presentaba determinación de carga viral sobre esa misma muestra. En otras dos muestras no se realizó PCR.

3.4 Ag VHC - Anti-VHC +

Se obtuvieron 12 sueros (3,81%) con este patrón analítico. El valor mínimo de Ag VHC ha sido 0 mientras que el máximo ha sido de 5,81 fmol/L, media de $1,34 \pm 1,67$ fmol/L. Los valores S/CO de Anti-VHC han ido desde 1,10 hasta 15,27 media de $8,41 \pm 5,87$. En la Tabla R.3.10 se desglosan los resultados de los sueros con este patrón.

Tabla R.3.10
Desglose de resultados, valores de Ag VHC y LIA

		Ag VHC -	Ag VHC *Zgr
Anti-VHC +	LIA+	6	1
	LIA-	1	0
	LIA IND	4	0
TOTAL		11	1

* Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

Los detalles de los análisis en los que se observó este patrón se muestran en la Tabla R.3.11.

Tabla R.3.11
Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC +

Nombre	Fecha	SX	ED	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	PCR	ALT
BMJ	23/03/2012	V	47	NEG 2,07	POS 13,52	POS	ND	261
CCR	27/08/2013	V	44	NEG 1,82	POS 1,63	NEG	ND	17
HHMV	21/04/2014	V	57	NEG 0,00	POS 14,43	POS	ND	19
KCK	27/10/2009	F	27	NEG 1,17	POS 1,10	IND	ND	9
LGA	25/01/2013	V	59	NEG 0,00	POS 3,44	IND	ND	14
	13/03/2013			NEG 0,97	POS 6,03	IND	ND	49
PCJ	17/12/2012	F	60	Zgr 3,35	POS 13,14	POS	NEG	28
SAM	13/02/2012	V	56	NEG 0,00	POS 1,92	IND	ND	15
SSDLMF	23/12/2011	V	50	NEG 1,24	POS 14,71	POS	ND	156
UBR	08/01/2014	V	56	NEG 0,00	POS 7,27	POS	ND	18
VBEA	05/01/2012	V	50	NEG 1,61	POS 15,27	POS	ND	218
	09/01/2012			NEG 1,42	POS 15,51	POS	ND	222

Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos; V: Varón, F: Mujer. ND: PCR no determinada; ALT expresado en UI/mL.

Hubo un suero de la paciente PCJ, mujer de 60 años, con diagnóstico previo de infección por VHC genotipo 1a, que presentó un patrón de Ag VHC con un valor en Zona Gris en el primer análisis (3,35 fmol/L), relativizándose en las repeticiones (segundo 1,25 fmol/L, tercero 1,57 fmol/L), con un resultado de Anti-VHC (S/CO= 13,14) y LIA positivos. A esa muestra se le realizó paralelamente una determinación de la carga viral que fue negativa. La paciente había recibido tratamiento frente a la VHC y presentaba un hepatocarcinoma en fase terminal, falleciendo a las pocas semanas.

En los otros 11 sueros no se llevó a cabo la PCR. A continuación desglosamos sus resultados en función del resultado LIA obtenido

A) LIA indeterminado

Hubo cuatro sueros de tres pacientes, (KCK, LGA y SAM) una mujer y dos varones con 27, 59 y 56 años de edad, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA IND / PCR ND (ver Tabla R.3.12). Los valores de Anti-VHC han sido bajos lo cual de por sí sugiere falsa positividad a este marcador o curación en pacientes que están perdiendo los Anti-VHC. Esto se correlaciona perfectamente con los resultados de LIA indeterminados donde se aprecia un predominio de la banda NS3, la banda que si bien mejora la sensibilidad de la técnica, también es la que con más frecuencia genera resultados indeterminados en el RIBA 2 y RIBA 3. Esta banda ha sido detectada en tres de las cuatro muestras con intensidad variable, por encima de las bandas C1 (detectada en la muestra restante).

Tabla R.3.12					
Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA IND					
Nombre	Ag VHC	Anti-VHC	LIA / Bandas*	ALT* ²	
KCK	NEG	1,17	POS 1,10	IND / NS3 +/-	9
LGA	NEG	0,00	POS 3,44	IND / NS3 1+	14
	NEG	0,97	POS 6,03	IND / NS3 2+	49
SAM	NEG	0,00	POS 1,92	IND / C1 1+	15

*Bandas observadas y su intensidad en aquellas muestras con LIA VHC IND (indeterminado). ²ALT expresado en UI/mL

Los tres pacientes con este patrón presentaron, dentro de su historia clínica, determinaciones de carga viral mediante PCR en algún momento. Es de destacar el que todos ellos habían resultado negativos a dicha determinación (previa o posterior al análisis objeto de este estudio). Fueron valorados como falsos positivos al Ag VHC.

B) LIA positivo

En la Tabla R.3.13 se muestran los seis sueros (se excluye el perteneciente a la paciente PCJ, previamente explicado) en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA + / PCR ND. Los valores de Anti-VHC para este patrón de resultados son relativamente elevados en este grupo poblacional (máximo S/CO= 15,51, mínimo S/CO= 7,27, media 13,45 ± 3,10).

Tabla R.3.13

Pacientes con el patrón Ag VHC - / Anti-VHC + / PCR ND / LIA +

Nombre	Ag VHC	Anti-VHC	LIA VHC	ALT*
BMJ	NEG 2,07	POS 13,52	POS	261
HHMV	NEG 0,00	POS 14,43	POS	19
SSDLMF	NEG 1,24	POS 14,71	POS	156
UBR	NEG 0,00	POS 7,27	POS	18
VBEA	NEG 1,61	POS 15,27	POS	218
	NEG 1,42	POS 15,51	POS	222

*ALT expresado en UI/mL

En los cinco pacientes expuestos en la Tabla R.3.13 constaba diagnóstico previo de cirrosis asociada a infección por VHC. El caso pormenorizado del paciente BMJ, varón de 47 años, se ha expuesto previamente en el apartado Ag VHC + / Anti-VHC +, Tabla R.3.5.

C) LIA negativo

Hubo únicamente un paciente con el patrón Ag VHC - (valor 1,82 fmol/L) / Anti-VHC + (S/CO= 1,63) / LIA - / PCR ND. Se trató de la paciente CCR de quien se dispuso de dos muestras. La primera evaluada (objeto de estudio en estos momentos) en agosto de 2013, mientras que la segunda fue analizada en diciembre de ese mismo año, resultando en este caso negativo tanto Ag VHC como anti-VHC (S/CO= 0,34 y Ag VHC 2,5 fmol/L). Finalmente se interpretó como un falso positivo Anti-VHC.

3.5 Ag VHC vs PCR

Se ha analizado la carga viral en 25 muestras de las 315 en las que se ha determinado la presencia de Ag VHC (7,93% de las muestras) pertenecientes a 24 pacientes, todos ellos candidatos a receptor de trasplante ortotópico hepático (TOH). La distribución de los resultados se muestra en la Tabla R.3.14.

Tabla R.3.14

Desglose de resultados de Ag VHC frente a PCR

	Ag VHC +	Ag VHC -	Ag VHC Zgrp	Ag VHC Zgr	TOTAL
PCR+*²	>10 ⁴ UI/mL	19	0	0	19
	<10E ⁴ UI/mL	0	0	1	0
PCR-	0	1	2	2	5
TOTAL	19	1	3	2	25

*Zgrp: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como positivos;

Zgr: Muestras con primer resultado en Zona Gris y posteriormente confirmados como negativos

*²Carga viral en UI/mL.

La concordancia se ha cifrado en un 92,00%, merced a 23 muestras (19 Ag VHC + / PCR+, una Ag VHC Zgrp / PCR+; una Ag VHC - / PCR -, dos Ag VHC Zgr / PCR -) de las 25 evaluadas. Entre las 20 muestras PCR +, el valor mínimo fue $< 1,5 \times 10^1$ UI/mL, máximo $> 6,9 \times 10^7$ UI/mL, media de $5,45 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^7$ UI/mL, no observándose ningún falso negativo Ag VHC. La única con una carga viral por debajo de 10^4 UI/mL ha sido confirmada como Ag VHC positivo tras un primer resultado en Zona Gris. Dicha muestra se correspondió con el paciente BMJ, cuyo caso se ha expuesto en el apartado Ag VHC + / Anti-VHC +, Tabla R.3.5. Por el contrario, sí que hubo dos falsos positivos Ag VHC, una perteneciente a la paciente KK (cuyo caso se ha abordado en el apartado Ag VHC - / Anti-VHC -, Tabla R.3.7) y la otra perteneciente al paciente CRM (caso expuesto en el apartado Ag VHC + / Anti-VHC -, Tabla R.3.9).

Tabla R.3.15
Resumen resultados Grupo estudio nº3

Grupo	Nº sueros (pacientes)	Ag VHC			Anti-VHC			PCR VHC		
		Máx	Mín	Media	Máx	Mín	Media	Máx	Mín	Media
Ag VHC + / Anti-VHC +	76	15993,34	4,12	2464,79 ± 3297,50	19,28	6,00	13,63 ± 2,53	6,9 x 10 ⁷	<15	5,73 x 10 ⁶ ± 1,64 x 10 ⁷
Ag VHC - / Anti-VHC -	221	5,14	0	0,51 ± 0,81	0,99	0	0,11 ± 0,11	0	0	0 ± 0
Ag VHC + / Anti-VHC -	6	477,50	3,81	87,69 ± 191,27	0,33	0,02	0,16 ± 0,11	NV		
Ag VHC - / Anti-VHC +	12	5,81	0	1,34 ± 1,67	15,27	1,10	8,41 ± 5,87	NV		

*Ag VHC expresado en fmol/L; Anti-VHC expresado en S/CO; PCR expresado en UI/mL; NV: Nº de muestras insuficiente por lo que no es valorable; Máx= Valor máximo observado; Mín= valor mínimo observado.

En la tabla R.3.15 se expresan los valores de Ag VHC Anti-VHC y PCR en función de los cuatro perfiles serológicos de VHC expuestos al principio. Como puede verse el grupo con Ag VHC y Anti-VHC positivos presenta valores medios significativamente más elevados en comparación con cada uno de los tres otros grupos ($p < 0,05$).

5.- Discusión

La hepatitis C está producida por un virus ARN cuyas características se han descrito en la introducción.

Se calcula que un 15-20% de los casos de hepatitis C cursan como hepatitis aguda. Tras este cuadro agudo, en torno a un 50-80% evolucionan a una infección crónica. El resto, aproximadamente un 15-45% de los pacientes no tratados, experimentan un aclaramiento espontáneo del virus (101, 140, 141). Estos datos se refrendan mediante diversos estudios transversales que concluyen que no todos los pacientes con Anti-VHC + presentan signos de replicación viral. Esto es importante también en pacientes de alto riesgo, donde se aprecia como una respuesta humoral precoz, si bien no protege frente a reinfecciones, sí que parece predisponer al sujeto a una infección activa de curso más breve (con un aclaramiento del ARN dentro de los 4-6 meses tras la reinfección) (145, 405). Aquellos pacientes con una hepatitis C crónica están en riesgo de padecer esteatosis, fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (223, 225). Estudios epidemiológicos también indican una probable asociación de la

infección por VHC con disfunciones endocrinas como la resistencia insulínica y la diabetes mellitus tipo 2 (405b, 406b).

El virus de la hepatitis C posee ARN monocatenario de polaridad positiva, encerrado en una cápside icosaédrica o core, el cual a su vez está rodeado por una envoltura de naturaleza lipídica. La cápside está formada por la polimerización de la proteína del core (11).

La molécula de ARN posee una región de lectura que codifica para una poliproteína precursora de las proteínas tanto estructurales como no estructurales. La proteína del core del VHC es una fosfoproteína estructural de 21 kD, codificada por el extremo 5' del marco abierto de lectura (ORF) del genoma de VHC. Esta región del genoma, que codifica para los 191 primeros aminoácidos de la poliproteína precursora, se encuentra bien conservada entre los diferentes genotipos de VHC (45).

La proteína del core es antigénica e induce una respuesta específica celular y humoral. Podría jugar un importante papel en la patogénesis de la infección por el VHC al actuar como desencadenante de los mecanismos que llevan a la enfermedad crónica y a los múltiples efectos inmunopatológicos asociados con ella (43b, 406, 407). Se ha comprobado que la proteína del core interactúa con diversas proteínas celulares, tiene un papel en la regulación de la transcripción de genes celulares y virales y parece relacionarse con el control de las señales de traducción, la muerte celular programada (apoptosis) y la inmunomodulación (42, 43, 43b, 406, 408, 409). También es capaz de transformar, *in vitro*, a los fibroblastos de embrión de rata a un fenotipo tumoral e inmortalizar a los hepatocitos humanos (409). En ratas transgénicas puede inducir esteatosis hepática (410) y hepatocarcinoma (54).

En comparación con otras proteínas del VHC, la proteína del core se cree que es la más conservada de todas ellas. Los análisis de su estructura y conformación proteica en diversas cepas de VHC han revelado una homología del 81-88% en la secuencia de nucleótidos y de un 96% en la aminoacídica (408b).

Después de la traducción, una peptidasa del huésped y una proteasa viral cortan, entre otras, la proteína del core de VHC del extremo carboxiterminal de la poliproteína precursora. Su polimerización, en presencia de ácido nucleico viral forma la cápside. La proteína del core concretamente es cortada en un primer momento en el residuo aminoacídico 191 y posteriormente en el residuo 177 (407b) por las peptidasas del hospedador, generando de esta forma la proteína del core madura (amino-ácidos 1-177) y el péptido fragmentado (amino-ácidos 178-191). Se cree que es la proteína madura del core la responsable de producir resistencia insulínica, esteatosis e incluso hepatocarcinoma a través de diversos mecanismos. El péptido (amino-ácidos 178-191) por su parte parece jugar un papel relevante en la respuesta inmune. El polimorfismo de éste péptido se asocia directamente con la producción de esteatosis.

Además del marco de lectura abierta (ORF), en la secuencia de ORF +1 se produce otro ORF que se solapa con la secuencia que codifica para la proteína generando así una proteína codificada por un marco alternativo de lectura (ARFP o core +1). Esta proteína podría ser la responsable de estimular el crecimiento de los hepatocitos y regular el metabolismo férrico (406b).

Se pensaba que la proteína del core se encontraba en el organismo de los huéspedes infectados de dos formas. Por un lado, circulando en sangre formando parte de la nucleocápside de los viriones envueltos infecciosos y, por otro, sin envoltura, en la proximidad de la membrana perinuclear y del retículo endoplásmico (411) y en el núcleo de los hepatocitos (412). Maillard *et al* (407) demostraron que existen partículas virales con propiedades antigénicas, morfológicas y fisicoquímicas de nucleocápsides no envueltas del VHC en el plasma de los sujetos infectados. Estas partículas son de tamaño heterogéneo (con predominio de partículas de 38 a 43 o de 54 a 62 nm de diámetro), tienen una densidad de flotación en cloruro de cesio de 1,32 a 1,34 g/mL y expresan en su superficie epítopos localizados en los aminoácidos 24 a 68 de la proteína del core. Partículas similares aparecen en células de insectos infectadas con Baculovirus recombinantes con ADNc para proteínas estructurales de VHC. Todo esto apunta a que el exceso de producción de nucleocápsides sin envoltura y su liberación a la sangre son rasgos característicos en la

morfogénesis de VHC. Abundando en dicha hipótesis, Schüttler *et al* (413), sostuvieron que tan solo un 18% de las proteínas del core se encontrarían asociadas a partículas con ARN, existiendo por lo tanto estructuras con antígeno del core sin ARN que pudieran estar bien secretadas por la célula infectada, o bien generadas por degradación, *in vivo*, del virión.

El primer ensayo de detección del antígeno del core se trató de un ensayo casero que fue desarrollado en Japón a principios de 1990 (414-416), el cual mostró escasa eficacia para su aplicación clínica debido a su baja sensibilidad. A partir de este ensayo se desarrollaron otros, también en Japón, mejorando su principal problema, la sensibilidad (168, 417). Se trataba de un enzimoinmunoensayo fluorescente de captura de tipo cualitativo realizado en placa de micrométodo. Utilizaba dos anticuerpos monoclonales específicos de diferentes epítopos: 5F11 para capturar el antígeno del core y 5E3 conjugado con β -D-galactosidasa, para reconocer al antígeno capturado. La mayor desventaja de estos ensayos era su complicado protocolo de pretratamiento de las muestras.

En agosto de 2000, la empresa “Ortho-Clinical Diagnostic Inc.” comercializó un enzimoinmunoensayo de primera generación para la detección del antígeno del core del virus de la hepatitis C. Este enzimoinmunoensayo detectaba el antígeno antes, incluso, de la aparición de anticuerpos específicos y, al igual que el anterior ensayo, también utilizaba los anticuerpos monoclonales 5F11 y 5E3 para la captura y la detección. Este método, denominado “ORTHO[®] Antibody to HCV Core Antigen ELISA Test System”, estaba dirigido fundamentalmente al cribado en bancos de sangre de la infección por VHC, por su capacidad de reducir en 40-50 días el periodo de ventana, y por lo tanto reducir la probabilidad de transmisión por transfusiones sanguíneas. Tras la comercialización de este equipo, pronto se diagnosticaron los primeros casos de infección por VHC antes de la seroconversión: Lee *et al* (418), dos casos entre 9133 donantes; Brojer *et al* (419), dos casos en 144000 donantes; Sanz *et al* (420), un caso sobre 29468 pacientes y Letowska *et al* (421), seis casos sobre un total de 133279 donaciones. También se detectaron algunos falsos positivos (especificidad 99,74%) (418).

Para Couroucé *et al* (169) y Peterson *et al* (163) la sensibilidad del nuevo ensayo fue de 88% y 87%, respectivamente, próxima a la de las pruebas de detección de ácido nucleico, con una diferencia media de 1-2 días en el momento de detección. No obstante, el nuevo ensayo presentaba una sensibilidad insuficiente en presencia de Anti-VHC en el suero del paciente (418), aunque parecía útil para el diagnóstico precoz de la infección por VHC durante el periodo de ventana antes de la formación de Anti-VHC.

Por este motivo surge un nuevo ensayo de segunda generación, desarrollado inicialmente por Aoyagi *et al* en 1999 (422), para la detección de Ag VHC en presencia o ausencia de Anti-VHC [Tanaka *et al* (168), Cagnon *et al* (423); Bouvier-Alias *et al* (48)]. Se trató de un ensayo cuantitativo que pretendía ser un indicador de infección en muestras Anti-VHC positivas y, por lo tanto, de ayuda en el diagnóstico de la infección por VHC. Fue el “ORTHO® trak-C™ Assay”. La sensibilidad de la prueba fue mejorada gracias a la incorporación de un nuevo conjugado, con dos anticuerpos monoclonales más, que proporciona una mejor señal de amplificación (423). De esta manera, este ensayo incorporaba notables mejoras teóricas, incluyendo la presencia de cuatro anticuerpos monoclonales, dos de captura (C11-3 y C11-7) y dos para la detección (C11-10 y C11-14), conjugados con peroxidasa de rábano picante así como un paso de pretratamiento para la disociación de inmunocomplejos en la muestra.

No está claro cómo, mediante la disociación de inmunocomplejos, se aumenta la sensibilidad durante la fase de ventana, periodo en que, por definición, no hay anticuerpos. Probablemente en esta fase de seroconversión precoz, los escasos anticuerpos presentes son indetectables por estar formando inmunocomplejos.

Su utilidad fue analizada por diversos autores. Kurtz *et al* (266), utilizaron un prototipo de un enzimoinmunoensayo con sustrato quimioluminiscente con un punto de corte de 200 pg/mL, con él obtuvieron una

sensibilidad del 90%, especificidad del 86%, valor predictivo positivo del 89% y valor predictivo negativo del 86%.

En cuanto a los índices de correlación entre las concentraciones de ARN y de Ag VHC hallados en otros estudios, Cagnon *et al* (423) obtuvieron unos resultados discretos en los tres grupos de pacientes (0,7, 0,67 y 0,58 respectivamente) que estudiaron. Schüttler *et al* (413), concluyeron que los niveles de Ag VHC no se correlacionaban estrictamente con los de ARN VHC, incluso cuando se utilizaba la PCR a tiempo real. Para Bouvier-Alias *et al* (173), el Ag VHC no era un marcador directo de replicación ya que la relación entre Ag VHC y ARN VHC [1 pg/mL (50 fmol/L) equivalía aproximadamente a 8000 UI/mL] tenía ligeras variaciones en los distintos pacientes. Esto sugirió la presencia de ciertas diferencias en la cantidad de proteína del core por molécula de ARN. Si se tiene en cuenta que el número de capsómeros por virión es constante y se entiende que en cada virión hay una única molécula de ARN, estos autores concluyeron que debían existir proteínas del core no asociadas a ARN en sangre periférica, ya que las diferencias en los distintos pacientes no podían ser explicadas únicamente por la existencia de nucleocápsides no envueltas descritas por Maillard *et al* (407).

Omar *et al* (426) objetivaron una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, comparando la prueba de segunda generación con bDNA, en una cohorte de 150 pacientes Anti-VHC positivos. En el mismo estudio informaron que 1 pg/mL (50 fmol/L) de core equivalía a 8000 UI/mL de ARN cuantificado por bDNA y de la utilidad de la prueba de segunda generación para monitorizar el tratamiento combinado. Bouvier-Alias *et al* (173) comunicaban similar equivalencia entre pg/mL de Ag VHC y UI/mL de ARN, independientemente del genotipo. Por el contrario, Lagging *et al* (427), estimaban que 1 pg/mL (50 fmol/L) de Ag VHC equivale a 1000 UI/mL de ARN y que la concentración de antígeno disminuía con el almacenamiento de la muestra. Pradat *et al* (182), observaron que los valores predictivo positivo y negativo de respuesta al tratamiento combinado dependían del genotipo. Rodríguez *et al* (428), observan una mejor correlación en el genotipo 1. Soffredini *et al* (429), encontraron una sensibilidad del 94% para el Ag VHC en

pacientes con hepatitis C crónica y obtuvieron resultados comparables a bDNA con una correlación del 0,75.

Los estudios de mayor relevancia para la evaluación de las distintas pruebas de antigenemia desarrolladas hasta ahora han sido llevados a cabo principalmente en cuatro grupos de pacientes:

- 1) Pacientes en periodo de ventana: Para ello se utilizaron paneles específicos que permitían evaluar la capacidad de la prueba para disminuir el retardo del diagnóstico en ese momento evolutivo de la infección. (170, 418, 430; 424, 431, 432, 465, 499).
- 2) En pacientes sometidos a tratamiento con IFN y RBV: a fin de evaluar su utilidad en la monitorización del mismo, comparándola con las técnicas moleculares para la detección de ácido nucleico (173, 180, 182, 426, 429, 433, 434, 435).
- 3) En receptores de trasplante hepático: lo cual permitía valorar la cinética del antígeno del core antes y después del trasplante (436).
- 4) En pacientes coinfectados VHC / VIH (448).

Posteriormente, se evaluó este ensayo en pacientes no tratados para comprobar su utilidad como marcador de infección activa (177, 431, 432, 437, 438, 439). En este sentido Krajden *et al* (437), obtuvieron una buena especificidad (99%) y correlación (0,95) pero con una peor sensibilidad (90%) comparada con dos métodos de detección de ARN como son el bDNA cuantitativo y la “transcription mediated amplification” (TMA) cualitativa.

De la revisión de la literatura se aprecia que la sensibilidad de la prueba de antigenemia de segunda generación oscilaba entre el 69,4% de Garcinuño *et al* (440), en un grupo de pacientes con coinfección VHC / VIH, y el 99,74% de Laperche *et al* (424), en un grupo de donantes. Así mismo la correlación entre las concentraciones de ARN y Ag VHC oscilaba entre el 0,47 de Fabrici *et al* (441) y el 0,98 de Omar *et al* (426). Aunque la mayoría de los autores no encontraron diferencias significativas en la concentración de Ag VHC en

función del genotipo, algunos detectaron concentraciones más altas en los pacientes infectados con genotipo 2 (429).

Se puede deducir que estos amplios márgenes de variabilidad fueron consecuencia de la falta de homogeneidad respecto a las poblaciones evaluadas en cada estudio (donantes Anti-VHC negativos, pacientes tratados con terapia combinada, hemodializados, etc.), las distintas técnicas de amplificación utilizadas (PCR, bDNA, TMA) y los distintos puntos de corte aplicados a la prueba de antigenemia en cada uno de ellos.

Referente a los puntos de corte, podemos decir que si bien la mayoría utilizaron el recomendado por el fabricante (1,5 pg/mL) (182, 424, 429, 437), otros introdujeron algunas modificaciones. Por ejemplo, Valcavi *et al* (439), utilizaron una Zona Gris entre 1,2 y 1,8 pg/mL y Lagging *et al* (427), utilizaron 1 pg/mL. Este punto es muy importante si tenemos en cuenta que la mayor parte de los resultados discrepantes ocurrieron en muestras con carga viral y antigenemia bajas. Actualmente el equipo “ORTHO[®] trak-C[™] Assay” no está disponible en el mercado. Su retirada fue debida probablemente al tedioso formato de microplacas, la necesidad del pretratamiento para disociar antígeno y anticuerpos y a su insuficiente límite mínimo de detección (443).

El actual ensayo de cuantificación del Ag del core del VHC, desarrollado por Abbott, es una evolución de aquel desarrollado por Aoyagi. Se trata de un ensayo puesto a punto por la empresa Abbott en colaboración con el grupo de investigación Tonen de Japón. El desarrollo implicó una evolución de la técnica previa mediante la utilización de un proceso quimioluminiscente y la incorporación de micropartículas con tres anticuerpos monoclonales nuevos. La limitación de esta última técnica, a pesar de su mejora, sigue siendo la menor sensibilidad frente a la determinación de ARN viral. Aún siendo así, la sensibilidad de la técnica ha llegado hasta 3,00 fmol/L (0,06 pg/ml), lo cual es 25 veces más sensible que aquel ensayo desarrollado en 1999 (posteriormente comercializado bajo la marca Trak-C assay por Ortho Clinical Diagnostics), ya que éste demostró una sensibilidad de 1,5 pg/ml. Así mismo, dicha sensibilidad ha demostrado ser independiente del genotipo y la reproducibilidad ha sido mejorada, cifrando la variabilidad interensayo por debajo del 10% (172-174).

Del mismo modo, hubo numerosos estudios que demuestran una disminución del periodo ventana cuando se compara frente a Anti-VHC (443, 439b) cifrando el retardo frente a ARN detectable entre 2-21 días para el Ag VHC y en no menos de 66 días para Anti-VHC. En concreto Laperche *et al* (440b) publicaron un estudio en el que un 70% de 107 muestras de pacientes en periodo ventana con ARN VHC positivo y Anti-VHC negativo resultó positivo al Ag VHC.

La mayoría de los numerosos estudios que realizados sobre esta técnica, han evaluado la correlación entre los valores de antigenemia y los de ARN viral. Como conclusión se extrae que, a juzgar por dichos estudios, existe una elevada correlación entre ambos parámetros ya que describen valores de r desde 0,7 a 0,98 (442, 443, 444, 475). Otra observación interesante es el que las fluctuaciones en la carga viral apreciadas en determinados pacientes no sometidos a tratamiento antiviral alguno, son menos pronunciadas en los valores de antigenemia que en los del ARN viral (175). Ros *et al* (176) establecieron que la sensibilidad de 3 fmol/L equivalía aproximadamente a 507 UI/mL para el genotipo 1a, 405 UI/mL para el 1b, 600 UI/mL para el 2 y 771 UI/mL para el genotipo 3. Sin embargo describieron que la sensibilidad analítica para poder detectar el 95% de las muestras era ligeramente superior a esos 3 fmol, variando desde los 3,9 fmol del genotipo 3a hasta los 13,5 fmol/L en el genotipo 2a (176). De cualquier manera, estas diferencias parece que no representan ninguna importancia clínica. Resultados de sensibilidad muy superiores han demostrado Long *et al* (448) en su estudio centrado en pacientes coinfectados con VIH-1, donde hablan de una sensibilidad del 100% y unas correlaciones de 0,7 a 0,91 dependiendo del genotipo. Este estudio no es extrapolable al resto, ya que entre sus conclusiones habla de un ratio entre antigenemia y carga viral superior en pacientes coinfectados VHC / VIH-1 frente a pacientes monoinfectados VHC justificando así la mayor sensibilidad detectada.

Globalmente, la bibliografía coincide cifrando el límite de detección por encima de 10^4 UI/ml, considerando que aproximadamente un 90% de las muestras con dicha carga viral resultan positivas (172). Estos datos coinciden con los observados en nuestro estudio, que comentaremos más adelante,

donde un 98,61% de las muestras (71 de 72) con carga viral por encima de 10^4 UI/ml resultaron Ag VHC + frente a un 62,9% de las muestras (39 de 62) con cargas inferiores a dicha cifra, en las que el Ag VHC resultó falsamente negativo.

Se han evaluado más datos bibliográficos, de los cuales hemos analizado aquellos en los que el punto de corte haya sido igual o similar al nuestro (0,06 pg/mL = 3 fmol/L), de tal forma que fueran comparables a los resultados obtenidos en nuestro estudio. En ese sentido Miedouge *et al* (443) observaron una sensibilidad del 100% (sobre un estudio de más de 3000 muestras); Kesli *et al* (446), una sensibilidad del 96,3% (además de un VPP del 100% y un VPN del 89,7% en una población de bajo riesgo); Leary *et al* (447) un 80%; y Medici *et al* (405) una del 95,5% (sobre un estudio de aproximadamente 1500 muestras). Chevaliez *et al* (437b) en un estudio sobre 514 pacientes, 171 de ellos Anti-VHC negativos, cifraban la sensibilidad en 10^3 UI/mL con una buena correlación de 0,88 siendo ambos parámetros independientes del genotipo infectante. Resultados similares exponía el estudio de Florea *et al* (475) en el que fijaban el límite de detección igualmente en 10^3 UI/mL con una sensibilidad del 82,4% con una correlación de 0,98 y un VPN del 80,9% y VPP del 100%. Hadziyannis *et al* (450) en un estudio con menor volumen muestral (105 muestras) hallaron una sensibilidad del 97,7% con una notable correlación de 0,89. En cuanto a la especificidad de la técnica, sobre 5394 muestras, Morota *et al* la han cifrado en un 99,78% (445); Miedouge *et al* (443) hablaban de un 99,2%; Kesli *et al* (446), 100%; Leary *et al* (447), un 99%; Medici *et al* (405), un 99,8%; Chevaliez *et al* (437b), del 100%; Florea *et al* (475), del 100% y Hadziyannis *et al* (450), un 100%. En estudios con menor número de muestras (176), donde se evaluaron en total 420 muestras de 100 personas, no se halló ninguna muestra falsamente positiva.

Globalmente en nuestro estudio ha habido en total 175 muestras, de 329 Anti-VHC + (un 53,19%), que han resultado Ag VHC + (cercano a los valores que exponen en otros estudios como los de Medici *et al* (405) que habla de un 50%). Las discordancias Ag VHC / Anti-VHC respondieron principalmente al patrón de Ag VHC - / Anti-VHC +, siendo un 93,90% de las muestras

discordantes (154 de 164 muestras discordantes observadas). Se pudo determinar la carga viral en 61 de estas 154 muestras, resultando 23 de ellas negativas y otras 37 mostraban cargas virales inferiores a 10^4 UI/mL, tan solo una estuvo por encima de ese límite presentando Ag VHC negativo. Dicho patrón mayoritario atendía en definitiva a la falta de sensibilidad de la técnica para cifras de carga viral inferiores a 10^4 UI/mL y que está descrita en la bibliografía (172, 424, 429, 437, 437b, 439,475).

Por lo tanto, si bien no es algo frecuente, sí que hay determinados estudios en los que se describe una correlación imperfecta entre carga viral y antigenemia. Esta situación es similar a la descrita por otros autores en donantes de sangre, hemodializados y pacientes en periodo de ventana (424), poblaciones que presentan notables diferencias respecto a las expuestas en otros estudios centrados en poblaciones que, por su propia idiosincrasia, presentaron cargas virales superiores (448). En todo caso, también se han descrito discrepancias entre PCR y antígenos virales en otras enfermedades víricas como la hepatitis B. Al respecto, Bullard *et al* (449), describen situaciones de falta de correlación entre ADN de VHB y HBeAg. Si en esta imperfecta correlación ha influido también la existencia de proteínas del core no asociadas a ARN, como proponen Schüttler *et al* (413), quedaría por determinar si este fenómeno podría contribuir a explicar los perfiles de antigenemia positiva con PCR y/o anticuerpos negativos detectados en algunos estudios (en el nuestro únicamente hemos encontrado un caso que cumpla con esos parámetros y se trató de un falso positivo al Ag VHC). La degradación del ARN, descrita por Nakamuta *et al* (451); Lagging *et al* (427) y Tanaka, *et al* (452), como causa de descenso de la carga viral por mala conservación de la muestra o por envejecimiento de la misma, no creemos que haya afectado a nuestras muestras por haber sido conservadas a -80°C inmediatamente tras su alicuotado.

Entre los objetivos de nuestro estudio, hemos pretendido averiguar la utilidad del marcador Ag VHC sobre una amplia población heterogénea (grupo 1) así como en pacientes que presuntamente pueden plantear problemas diagnósticos por urgencia o por presencia de concentraciones bajas del virus

en sangre, como son los pacientes hemodializados y los incluidos en algún programa de trasplante de órganos o tejidos que han sido tratados.

Los pacientes hemodializados han estado incluidos en nuestro grupo de estudio 2. Su importancia radica a que en las unidades de hemodiálisis las enfermedades infecciosas, especialmente las que se transmiten a través de la vía hemática, representan un grave problema por la gran facilidad de propagación que presentan, tanto entre los pacientes, como entre el personal sanitario. Además, debido a las características propias de la enfermedad, los pacientes sometidos a este tratamiento pueden considerarse como inmunodeficientes. En el contexto de dicha situación, las enfermedades infecciosas pueden tener consecuencias graves o incluso fatales en la evolución de su enfermedad.

La prevalencia de VHC en pacientes hemodializados se estima que es un 10-20% superior al de la población general, sin embargo la variación de un país a otro no es desdeñable, por lo que globalmente el rango es amplio y se cifra entre un 2-68% (485). García-Agudo *et al* (485b) llevaron a cabo un estudio para el “Grupo de virus C en diálisis” de la Sociedad Española de Nefrología, en el que participaron 187 unidades de hemodiálisis (71 hospitalarias) en España y estimaron la prevalencia del VHC en el 5,6 %. A pesar de los intentos de concentrar a los pacientes VHC-positivos en unidades específicas, el 75,9 % (485b) de los centros de hemodiálisis en España tiene al menos un paciente con hepatitis C crónica, por lo que siguen existiendo fuentes de infección que obligan a hacer esfuerzos sobre las medidas de profilaxis del contagio, más que sobre la distribución de los pacientes. De cara a minimizar los riesgos y mejorar en la profilaxis del contagio, cobra especial importancia no solo el diagnosticar la infección por VHC, sino el poder diferenciar entre una infección activa o una infección pasada y curada. Esto permite al personal de la unidad de hemodiálisis distribuir a sus pacientes en diferentes sistemas extracorpóreos, separando los pacientes sanos o curados de los enfermos con infección activa. Hasta el momento, dicha diferenciación tan solo podía hacerse valiéndonos de la PCR.

La carga viral presenta variaciones significativas si se determina previamente o posteriormente a una sesión de hemodiálisis. Un estudio llevados a cabo por Vidales-Braz *et al* (513) presentó una carga viral media antes de una sesión de hemodiálisis de $4,4 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^5$ UI/mL frente a unos valores de $3,4 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^5$ UI/mL una vez llevado a cabo la misma. Esto indicaría una probable destrucción o la adherencia de las partículas virales a la membrana del equipo de diálisis, como ya indicaban tanto Noiri *et al* (514) como Fabrizi *et al* (515) en sus estudios. En este sentido faltan estudios que demuestren la cinética del antígeno del core VHC antes y después de estas sesiones de forma que se corrobore si la evolución es paralela a la de la carga viral.

Nosotros, con este estudio, hemos pretendido evaluar la capacidad de prever, mediante la antigenemia, el estado de la infección lo que puede ser muy útil por la inmediatez del resultado así como por su menor coste económico. Si bien la correlación entre los niveles de ARN y los de Ag VHC no son perfectos, la positividad del antígeno si que nos permite vaticinar una carga viral relativamente elevada y por lo tanto una infección activa. En cambio, si la antigenemia fuera negativa, esto no nos permitiría descartar una infección activa ya que también podría tratarse de una infección con una carga viral baja (hemos constatado que con cargas virales por debajo de 10^4 UI/mL la antigenemia pierde fiabilidad) y, por lo tanto, puede ser indetectable.

En el estudio sobre pacientes hemodializados llevado a cabo por Fabrizi *et al* (464) sobre 289 pacientes, los autores informaron de una correlación significativa entre Ag VHC y los niveles de ARN obtenidos mediante PCR en tiempo real. Mehdi *et al* (465) encontraron la prueba de determinación de Ag VHC adecuado para la detección temprana de la infección en pacientes hemodializados y Li Cavoli *et al* (467) cifraron el valor predictivo positivo del 100%. Moini *et al* (454) por su parte desarrollaron un estudio en pacientes hemodializados con Anti-VHC negativos, obteniendo resultados de Ag VHC con una buena correlación con la PCR. Concretamente evaluó 181 pacientes Anti-VHC negativos y obtuvieron una sensibilidad del 90,9%, especificidad del 98,2%, VPP del 76,9% y un VPN del 99,4%. Este último índice, el VPN, es lo

más destacado por los autores, ya que se basan en él para afirmar que la prueba es apropiada a la hora de excluir la presencia de infección en pacientes hemodializados.

Otra población que pudiera plantear problemas diagnósticos, como ya hemos mencionado previamente, sería la conformada por pacientes incluidos en algún programa de trasplante de órganos o tejidos. Esta población es la que conforma nuestro grupo 3 de estudio. A este respecto, existe escasa bibliografía que evalúe la determinación de la antigenemia mediante enzimoinmunoensayo de última generación en ellos. La literatura encontrada a este respecto se refiere al ensayo de primera generación (Dickson *et al*, 436). No obstante, sí que se han descrito situaciones de discordancia entre PCR y Ag VHC en pacientes en tratamiento y que por ello presentaron carga viral baja. Esta situación es plausible encontrarla con cierta frecuencia en este tipo de pacientes, en quienes está indicado el tratamiento previo al trasplante a fin de minimizar la varga viral en ellos en el momento de la intervención. Entre los estudios referidos a este tipo de pacientes, Zanetti *et al* (433), no detectaron Ag VHC en 21 (26%) de 82 muestras de pacientes ARN positivos (<48600 UI/mL) antes, durante y después del tratamiento. Soffredini *et al* (429), encuentran que un 6,3% de sus pacientes fueron ARN VHC positivos y Ag VHC negativos. Dichos pacientes tenían una media de carga viral de 15016 UI/mL. Krajden *et al* (437), obtuvieron 20 muestras Ag VHC negativo que luego resultaron ser PCR positivas. La carga viral de estas 20 muestras oscilaba de 704 a 55000 UI/mL, concluyendo que el Ag VHC no era detectable con valores inferiores a 55000 UI/mL y proponiendo que toda muestra con Ag VHC negativo se debería confirmar con una técnica de detección y/o amplificación de ARN. En nuestro caso, dentro del grupo de trasplantados, tan solo ha habido una muestra (paciente BMJ) con cargas virales $<10^4$ UI/mL, genotipo 1a y ha sido Ag VHC +. No obstante, la utilidad más importante sería en situaciones de urgencia, para el cribado de pacientes donantes de órganos o tejidos donde habitualmente no se disponen de serologías previas ni de datos sobre conductas de riesgo por lo que esta técnica nos permite mejorar la rapidez así como disminuir el periodo ventana.

A continuación pasamos a discutir los resultados globales, es decir, los abordados en el grupo 1 de estudio que engloba a todos los sueros evaluados en este estudio.

Analizando, en conjunto, los resultados obtenidos en los 952 sueros incluidos en nuestro estudio, hemos podido detectar 164 con resultados discrepantes entre Anti-VHC (el marcador diagnóstico más habitual para la hepatitis C) (1, 148, 245) y el antígeno del core de la hepatitis C. Estos sueros discrepantes muestran dos tipos de perfiles: el constituido por Ag VHC + / Anti-VHC - (10 muestras) y Ag VHC - / Anti-VHC + (154 muestras).

Las 10 muestras con el perfil Ag VHC + / Anti-VHC - correspondieron a nueve pacientes. Sus resultados pudieron interpretarse de diferente manera:

- Dos de ellas fueron infecciones por virus de la hepatitis C, como lo prueba el hecho de que la PCR fue positiva con cargas virales de 5 logaritmos. Estas dos muestras (pacientes CGJ y MOAI) son las que mostraron concentraciones de Ag VHC más elevadas (477,50 y 4154,85 fmol/L). Se trata, por lo tanto, de dos infecciones por el virus de la hepatitis C que hubieran pasado desapercibidas con una prueba de cribado exclusivo con Anti-VHC, máxime cuando sus valores S/CO de Anti-VHC eran inferiores a 0,3.

El paciente CGJ es un varón español, de profesión fresador, de 43 años, con antecedentes de linfoma no Hodking B, diagnosticado en el año 1999, trasplantado de médula ósea en el año 2000, seguido de tratamiento con terapia R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona). El linfoma remitió completamente. Otros antecedentes posteriores fueron colitis ulcerosa tratada y episodio de tuberculosis pulmonar en el año 2000. El paciente presentada una hipogammaglobulinemia intensa desde el año 2000 y no declaró hábitos tóxicos ni conductas de riesgo. Fue incluido en lista de trasplante hepático por presentar una descompensación de su cirrosis hepática (Child B, MELD 15, con biopsia que objetivaba fibrosis moderada) por infección por VHC genotipo 1b. El paciente presentó resultados de Anti-VHC negativo desde el año 2000 y hasta la actualidad mientras que hemos

detectado una inexplicable mala correlación entre la carga viral y el Ag VHC ($1,37 \times 10^5$ UI/mL y 477,50 fmol/L). En el año 2010 había sido tratado con interferón pegilado y ribavirina durante 32 semanas, negativizando la carga viral, pero la misma se repositivizó tras la suspensión del tratamiento (sufriendo un fracaso viral secundario). El perfil de este paciente lo interpretamos como consecuencia de una inmunotolerancia secundaria al tratamiento de su linfoma, situación descrita en la literatura por diversos autores como Miles *et al* (249), Mitsufumi *et al* (511) o Horwitz *et al* (512). La inmunosupresión es una circunstancia descrita como productora de resultados indeterminados o negativos con RIBA de tercera generación (200, 506) y es especialmente relevante en este caso, al tratarse de un paciente incluido en el programa de trasplante hepático.

La tolerancia al virus por parte del sistema inmune puede desencadenarse a raíz de diversas situaciones, incluidos los recién nacidos hijos de madres infectadas por VHC. Numerosos estudios, como los llevados a cabo por Durand *et al* (423b), Laperche *et al* (424), Benito *et al* (468) o Pitart *et al* (468b) han sido publicados al respecto, concluyendo todos ellos que la detección de Ag VHC puede ser útil para el diagnóstico de la infección por VHC en casos de inmunotolerancia.

En los pacientes incluidos en programa de trasplante, es muy importante que no se escapen casos de infección por VHC sin Anti-VHC, por lo que la introducción de este marcador es trascendental con este objetivo, especialmente en los donantes de órganos y tejidos.

El segundo caso (MOAI) mujer española, de 44 años, residente en un centro para indigentes, expresidiaria, politoxicómana desde los 12 años, exADVP desde hace ocho años (en tratamiento con metadona) y con antecedentes patológicos de infección VIH diagnosticada y en tratamiento desde 1988, de infección por VHC desde 1988 no tratada y de EPOC. La paciente había presentado múltiples infecciones oportunistas (Citomegalovirus, *Coxiella burnetti*, virus de Epstein Barr, infecciones respiratorias por *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. glabrata*). En el momento del análisis la paciente se encontraba en un estadio avanzado de la infección por VIH. El Ag

p24 había resultado positivo, siendo en determinaciones previas negativo, la carga viral de VIH era elevada ($3,49 \times 10^5$ UI/mL), presentaba unas cifra de linfocitos CD4 de $182/\text{mm}^3$ y la historia clínica manifestaba una repetida falta de adherencia al tratamiento frente a la infección (en el momento del análisis consistente en tenofovir, emtricitabina, lopinavir y ritonavir). Así mismo, presentaba infección por VHC no genotipada y no tratada, con buena correlación entre carga viral y Ag VHC ($5,96 \times 10^5$ UI/mL, 4154,85 fmol/L), con valores de ALT normales (13 UI/mL). Se trataría de una paciente cuyo perfil Ag VHC + / Anti-VHC - sería consecuencia de la importante inmunodeficiencia causada por la infección VIH. A este respecto, Long *et al* (448) indican un incremento en el cociente Ag VHC / carga viral en pacientes coinfectados VHC / VIH y es mayor a medida que la situación inmunológica del paciente está más deteriorada. La hipótesis para dicho razonamiento se basaría en la dificultad de los pacientes inmunodeprimidos para producir anticuerpos anti-antígeno del core del VHC por lo que los niveles circulantes del citado antígeno libre en plasma serían superiores que en aquellos pacientes monoinfectados. Otra posible causa, descrita por Mussini *et al* (478), Buchacz *et al* (479), Brenchley *et al* (480) y Juang *et al* (481) sería la presencia, en pacientes con infección VIH en un estadio avanzado, de elementos bacterianos circulantes (como ARNsas bacterianas) probablemente derivados del tracto gastrointestinal, que el organismo no es capaz de aclarar y que tendrían poder lítico sobre el ARN viral, disminuyendo sus niveles. El citado estudio de Long *et al* (448) refuerza la utilidad de la detección del antígeno del core en este tipo de poblaciones, ya que, fruto del citado aumento en la ratio, la sensibilidad de la técnica se incrementó hasta un 100%. Este mismo estudio evaluó el comportamiento de los Anti-VHC en pacientes monoinfectados y en pacientes coinfectados (129 y 98 pacientes respectivamente), comprobando que el título de anticuerpos, en los pacientes coinfectados con niveles de linfocitos T CD4 por debajo de $500/\text{mm}^3$, fue inferior al de los pacientes con linfocitos TCD4 superiores a $500/\text{mm}^3$ y al de los pacientes monoinfectados. Este mismo patrón se observó en los resultados del ensayo RIBA confirmatorio, donde la respuesta inducida por las proteínas Core, NS3, NS4 y NS5 fue más intensas en los pacientes monoinfectados y en los coinfectados con niveles superiores de linfocitos T CD4, que en aquellos con los linfocitos T CD4 por debajo de $500/\text{mm}^3$.

Esta circunstancia (Ag VHC + / Anti-VHC -) ha sido previamente descrita en estudios que evaluaban la utilidad del Ag VHC en el diagnóstico de la infección durante el periodo ventana, siendo la mayor parte de estos estudios sobre muestras de pacientes donantes de sangre. Concretamente, Schreiber *et al* (495) cifraban el riesgo de que un suero pertenezca a un paciente infectado por VHC en periodo ventana en 1/103.000 donaciones de sangre; Bruhn *et al* (496), a partir de un estudio sobre 10.897.105 donaciones, hallaron 30 sueros en periodo ventana (1/363.237 donaciones); Zou *et al* (498) la estimaron en 1/270.000 donaciones; Contreras *et al* (497) no hallaron ningún caso de periodo ventana sobre su estudio de 47.847 donaciones, al igual que Gorodin *et al* (499) e Icardi *et al* (170), que no hallaron ningún caso sobre 2810 y 2586 donaciones, respectivamente.

Sobre otras poblaciones, Gorodin *et al* (499), encontraron cinco sobre 686 muestras de pacientes con elevada sospecha de padecer VHC (sospechas clínicas, pacientes expuestos en las tres semanas previas al VHC), cuatro sobre 950 muestras pertenecientes a pacientes con conductas de riesgo (pacientes con VIH, parejas de pacientes con VIH y pacientes ADVP) y una sobre 1445 muestras de población general. Icardi *et al* (170) por su parte, sobre un total de 3144 sueros (de los cuales 500 pertenecían a población general y 58 muestras a poblaciones con diversas patologías, como disproteinemia, lupus eritematoso sistémico o hepatitis autoinmune) no encontraron ninguna muestra con patrón compatible con estadío en periodo ventana. Medhi *et al* (465) detectó 13 sueros en periodo ventana sobre un estudio de 250 muestras pertenecientes a pacientes hemodializados en la India.

Como puede observarse, la frecuencia de este perfil verdadero positivo, descrita en la literatura, es baja y muy dependiente del tipo de población analizada, así como del origen geográfico de la misma.

En nuestro estudio, la frecuencia de este perfil con PCR +, también es baja (0,21%), pero no debe de ser despreciada por la posibilidad de que afectase, como en nuestro caso, a pacientes en programa de trasplantes, a pacientes inmunodeprimidos estudiados por primera vez o a pacientes inmunotolerantes.

Por otra parte, estudios focalizados sobre muestras de pacientes con patrón PCR + / Anti-VHC - conocido arrojaban diversas valoraciones. Por un lado Peterson *et al* (163), sobre una población de 24 pacientes que habían mostrado un patrón PCR + / Anti-VHC -, y que posteriormente habían experimentado una seroconversión, observaron un 83% de concordancia entre PCR y Ag VHC. Icardi *et al* (170), en el estudio previamente mencionado, evaluaron paralelamente 170 sueros con el mencionado patrón PCR + / Anti-VHC -, de las cuales el 95,29% presentaron Ag VHC+. Lee *et al* (418) observaron un buen comportamiento del Ag VHC en pacientes en periodo ventana, siendo detectable en 120 de los 128 sueros PCR + / Anti-VHC - pertenecientes a donantes de sangre. En cuanto al retardo entre la aparición del Anti-VHC tras la positivización del Ag VHC, Icardi *et al* (170) lo estimaron en 33 días, Widell *et al* (430), entre 23 y 46 días, Lee *et al* (424), en 55 y Peterson *et al* (163), en 60 días. Todos ellos mostraban un retardo mínimo entre la positivización del ARN viral y la del Ag VHC, siendo la misma entre 0,4 y un día. Esto es coherente con el curso de la infección, ya que la misma cursa con elevadas cargas virales en su inicio (499).

En todo caso, la existencia de un porcentaje de bajo de resultados discrepantes entre Ag VHC, Anti-VHC y PCR no debe de extrañar, puesto que las tres pruebas miden cosas distintas: antígeno del core, anticuerpos y ARN.

- Otras cinco muestras de cuatro pacientes (BOS, CRM, KK, LAJP) fueron interpretadas como falsos positivos al Ag VHC por tener una PCR negativa, incluso de forma persistente en el paciente BOS (dos muestras) y no presentar clínica compatible con infección por VHC. El valor medio de Ag VHC de estas muestras es bajo ($7,31 \pm 3,67$ fmol/L) pero repetidamente positivo.

El paciente con dos muestras, BOS, es un varón de 33 años, con antecedentes de hiperparatiroidismo, anemia falciforme, miocardiopatía hipertensiva, endocarditis infecciosa e insuficiencia renal crónica de etiología no filiada, que ha requerido su inclusión en sesiones de hemodiálisis. Presentó en su primer análisis una positividad cercana al límite superior de la Zona Gris (11,65 fmol/L), mientras que en una segunda muestra, analizada dos semanas

después, los valores fueron inferiores pero, en cualquier caso, no lo suficiente como para resultar negativos.

El paciente CRM, por su parte, es un varón de 57 años diagnosticado de cirrosis hepática avanzada (MELD 22) de origen enólico, que fue sometido a trasplante hepático en junio de 2013, durante el cual falleció. Se dispusieron de dos muestras para su evaluación, la primera, correspondiente a enero de 2013, mostraba un patrón de negatividad tanto para Ag VHC como Anti-VHC, con unos valores de ALT de 49 UI/mL; en cuanto a la muestra que nos ocupa, evaluada en junio de 2013, se valora como falso positivo, basándonos en el resultado negativo de la determinación de la carga viral realizada paralelamente, así como en los datos de su historia clínica donde no se objetiva sospecha alguna de la infección.

La paciente KK, mujer de 43 años de origen marroquí, con un diagnóstico de cirrosis hepática autoinmune, presentó un episodio de hemorragia digestiva alta por varices esofágicas y descompensación edematoascítica, que propició su inclusión en lista de trasplantes, que se materializó en el año 2012. Se pudieron analizar tres muestras de esta paciente en el marco de este estudio, así como otra muestra más al margen del mismo. Una de las muestras seguía el patrón Ag VHC + / Anti-VHC - mientras que en otras dos resultaron Ag VHC - / Anti-VHC - y, en la evaluada al margen de nuestro estudio, únicamente se determinó la presencia de Anti-VHC siendo la misma negativa. En ninguna de dichas muestras se determinó el LIA. Las dos primeras muestras evaluadas dentro de nuestro estudio (separadas en el tiempo por 70 días) dieron resultados de Ag VHC en Zona Gris. La primera se confirmó positiva tras repetición por duplicado (valor inicial de 3,87 fmol/L y posterior de 3,81 fmol/L), en contraposición con la determinación de la carga viral que resultó negativa. La segunda muestra se corresponde con la descrita en este apartado, confirmada como negativa tras repetición por duplicado (valores de 5,14, 1,19 y 0,98 fmol/L respectivamente), y resultando la carga viral negativa de nuevo. El 30 de marzo de 2012 (es decir, 14 días después del anterior análisis), tras ser sometida al trasplante hepático, se recibió una tercera muestra de esta paciente y determinándose negativa la presencia tanto de Ag VHC como de Anti-VHC. Los valores de ALT analizados en las primeras

muestras fueron moderadamente elevados (45, 54 y 77 UI/mL), mientras que el análisis de la última muestra dio un resultado dentro del rango considerado como normal (38 UI/mL).

Por último, el paciente LAJP, varón de 72 años, presentaba antecedentes de miocardiopatía hipertensiva, adenoma de próstata e insuficiencia renal, motivo por el cual está siendo sometido a sesiones de hemodiálisis. En ningún caso presentaba una historia clínica sugestiva de infección por VHC.+

- Se observaron tres pacientes con este patrón en los que no se dispuso de determinación de carga viral paralela (BMFJ, GVA y OLPA). Dos de ellos (BMFJ, GVA) presentaron un valor de Ag VHC en zona gris en un primer análisis, confirmándose el mismo como positivo tras repetición por duplicado (en estos pacientes el valor medio de Ag VHC ha sido de $4,58 \pm 0,81$ fmol/L para el primer análisis y de $8,07 \pm 6,57$ fmol/L en el segundo). El tercero (OLPA) presentó unos valores de antigenemia inequívocamente positivos. Los tres casos fueron considerados falsos positivos.

Los dos pacientes con un primer resultado en Zona Gris eran pacientes sometidos a evaluación pre-trasplante hepático, con un cuadro similar que invitaba a pensar en falsas positividades Ag VHC. El paciente BMFJ, varón de 41 años con un diagnóstico de cirrosis enólica (estadío B de CHILD) desde 2011, presentó diversos episodios de descompensación desde entonces, motivo por el cual fue incluido en la lista de espera de trasplante. En la ecografía realizada para el estudio pre-trasplante se detectó la presencia de una estenosis aórtica grave que contraindicaba la realización del mismo. Finalmente el paciente falleció seis meses después de éste análisis. En el caso de GVA, varón de 58 años, igualmente estaba diagnosticado de cirrosis enólica en este caso desde 2012. Tras un episodio de descompensación ascítica fue incluido en la lista de trasplante, pero una posterior mejoría de la función hepática hizo posponer el proceso, evaluando periódicamente su evolución. Clínicamente se descartó la presencia de infección por VHC.

La interpretación de falsa positividad para estos dos pacientes, se basó en los valores límite de antigenemia dentro del rango de la Zona Gris, en la negatividad de los Anti-VHC en diversos sueros, en la normalidad de sus valores de transaminasas en todo momento y en su historia clínica.

El paciente restante, OLPA, es un varón de 64 años con antecedentes de hipertensión arterial, pancitopenia secundaria a hiperesplenismo, insuficiencia renal, ascitis y encefalopatía hepática. En febrero de 2013 se diagnostica una cirrosis hepática alcohólica, motivo por el cual se incluye en la lista de trasplante hepático, llevándose a cabo el mismo en enero de 2014. Se dispusieron de dos sueros de este paciente con una separación de cuatro meses en los que se determinó tanto Ag VHC como Anti-VHC. En el primero sus resultados fueron negativos a ambos marcadores mientras que en el segundo, enmarcado en el análisis previo a la realización del trasplante, presentó el patrón de discordancia mencionado. Así mismo este paciente contaba con dos análisis anteriores, en los que únicamente se había determinado la presencia de Anti-VHC, resultando ésta negativa. El paciente no presentaba conductas de riesgo que pudieran conllevar un contagio de la infección. Atendiendo a estos datos así como a su historia clínica, este paciente fue considerado un falso positivo Ag VHC.

Según estos datos, hemos encontrado una tasa de falsos positivos con este perfil del 0,84% (8 muestras de 952). Es una tasa baja, pese a que nuestro estudio incluye muchas muestras de pacientes complicados como hemodializados y los relacionados con el trasplante de órganos.

El fenómeno de falsa positividad, si bien no es frecuente, si que ha sido descrito a lo largo de la literatura, encontrándose tasas de especificidad que oscilan entre el 49% y el 100%. En cualquier caso, la mayoría de los estudios realizados en población general publicados hasta la fecha han cifrado esta especificidad por encima del 90% [Agha *et al* (432), 100%; Courouce *et al* (169), 100%; Laperche *et al* (424), 100%; Zanetti *et al* (433), 100%; Krajden *et al* (437), 99%; Netski *et al* (438), 94%; Valcavi *et al* (439), 100%, Long *et al* (448), 100%]. Si bien como decimos, son casos poco frecuentes, diversos autores han descrito situaciones de falsa positividad al antígeno por

discordancia frente a la PCR. Cano *et al* (431), en su estudio observaron cuatro casos repetidamente Ag VHC positivos con ARN negativo en un grupo de 1070 donantes de sangre sanos. Igualmente, Gaudy *et al* (452b) hallaron el patrón de falsa positividad Ag VHC + / PCR - en 17 (0,7%) de 3295 pacientes Anti-VHC negativos sometidos a un cribado rutinario. Krajden *et al* (437), como ya se ha citado previamente, describieron tres casos, en este caso sobre un estudio de 1964 muestras de donantes de sangre con dicho patrón (en este caso determinando el ARN mediante bDNA), al igual que Widell *et al* (430) sobre 502 muestras de pacientes de población general sin factores de riesgo. Datos similares pueden observarse en el trabajo de Medici *et al* (405), quienes describen 11 casos Ag VHC positivo con PCR negativo, que interpretan provisionalmente como artefactos.

No obstante, algunos autores describen porcentajes más bajos de especificidad, pero utilizando técnicas caseras de detección de Ag VHC, como Aoyagi *et al* (422) (especificidad del 84%) y el equipo ELISA Hunan Jynda® (Hunan Jynda Bioengineering Group Co., Changsha, China), como Zhang *et al* (486) (especificidad del 85%), Ouyang *et al* (487) (especificidad del 49%), en 189 pacientes con hepatitis C crónica, hepatitis B crónica y sanos o Lu *et al* (488) (especificidad del 72%), en 191 pacientes de población general. En este sentido, el metaanálisis sobre comparación de técnicas para detección de antígeno del core de la hepatitis C realizado por Gu *et al* (501) entre los años 1999 y 2010 atribuye estas discrepancias a la utilización de estos tres equipos, ya que no aparecen cuando se tienen en cuenta únicamente los datos de las técnicas de los ELISA de Ortho.

Aunque el patrón Ag VHC + / ARN - no ha sido frecuente, como ya fue comunicado por nosotros (471) en el XVIII congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica celebrado en Valencia en el año 2014, este tipo de sueros deben ser sometidos a estudios más profundos, por si no siempre correspondieran con falsas positividades Ag VHC.

Nosotros hemos tenido la oportunidad de observar este patrón de falsa positividad en la paciente II, mujer rumana de 42 años, que presentó un patrón concordante Ag VHC + (10,81 fmol/L) / Anti-VHC + (S/CO 11,59) / LIA + (se

abordará posteriormente en el apartado referido a muestras concordantes Ag VHC + / Anti-VHC +), que sin embargo fue discordante respecto a la carga viral, que fue negativa. Esta paciente, infectada por el genotipo 1b, fue tratada con PegIFN y ribavirina en 2009 presentando carga viral negativa en nueve determinaciones efectuadas desde entonces hasta enero de 2014. En este último análisis se ha apreciado la discordancia Ag VHC + / Anti-VHC + / PCR -, siendo el Ag VHC repetidamente positivo. Este tipo de casos, como describen en un estudio Quiroga *et al* (503), pueden corresponderse con una infección oculta con una localización limitada a nivel hepático o a nivel de las células monocíticas y que cursa con viremia negativa, lo cual solo sería demostrable mediante el análisis de una biopsia hepática o de sangre completa. En este caso concreto pensamos que se trata de un falso positivo Ag VHC ya que parece poco probable que en esta paciente el virus persistiera en el hígado en ausencia de viremia por los repetidos controles PCR negativos a lo largo de cinco años, pero no podemos afirmarlo con seguridad.

En nuestro estudio hemos observado que los pacientes con este patrón, presente en 10 sueros, estaban incluidos en el programa de (seis casos: BMFJ, CRM, CGJ, GVA, KK, OLPA), en programa de hemodiálisis [dos casos: BOS (dos muestras) y LAJP] y en una inmunodeprimida (MOAI).

De estos 10 sueros, ocho han sido considerados falsos positivos, lo que tiene especial trascendencia en pacientes posibles donantes de órganos y en pacientes hemodializados, ya que puede ser un condicionante importante en su manejo (470). La presencia de estos falsos positivos podría obligar a descartar a un donante o condicionar la asignación del paciente a un riñón artificial inadecuado. En todo caso, pensamos que la frecuencia es baja, y que por el contrario, la utilización de este marcador proporciona una mayor garantía de seguridad para trasplantes y para hemodiálisis.

Por el contrario, no hay que olvidar que dos pacientes con este perfil eran verdaderos positivos, lo que resalta la importancia práctica de este marcador y especialmente en el grupo de inmunodeprimidos al que pertenecían los dos pacientes mencionados.

En relación con los hemodializados con este perfil, hemos encontrado en la literatura casos de verdaderos positivos [Li Cavoli *et al* (467); Medhi *et al* (465)] y de falsos positivos [Reddy *et al* (466), Moini *et al* (454), Miedouge *et al* (443)]. Por ello, en estos pacientes es útil este marcador para diagnosticar casos en periodo de ventana y para diferenciar casos con infección activa de casos curados.

En cuanto al segundo patrón de discordancia observado, el más frecuente, Ag VHC - / Anti-VHC +, se obtuvieron 154 sueros que se interpretaron de forma diversa.

- La negatividad de la PCR confirmó que 23 muestras fueron verdaderos negativos para Ag VHC.
 - Hubo 13 sueros de 13 pacientes, en los que el LIA VHC fue positivo, todos ellos fueron interpretados como una infección pasada y resuelta.
 - Se pudo determinar que nueve de dichos pacientes con LIA + (LPMA, MGM, MRR, NMV, HRF, DCSIJ, GGA, JBE, RGO) fueron tratados con diversas pautas de PegIFN-RBV (uno de ellos (NMV) tras reinfección posterior a trasplante hepático) y todos ellos se confirmaron como respuesta viral sostenida.
 - Otro caso (PCJ), cuyos análisis por duplicado de Ag VHC confirmaron la negatividad (tras primer análisis con valores de Ag VHC en Zona Gris, 3,35 fmol/L), era una mujer de 60 años igualmente tratada, en este caso con PegIFN, RBV y telaprevir, tras lo que negativizó la PCR hasta ocho meses después de finalizar el mismo. La paciente falleció a consecuencia de un hepatocarcinoma en fase terminal.
 - En otros tres (GMMI, OLA, RRF) no consta tratamiento alguno, por lo que posiblemente se tratan de aclaramientos espontáneos.
 - Hubo otros dos sueros en los que el patrón fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA - / PCR -. Dichos sueros pertenecieron a la paciente FUC, mujer de 55 años, y a la paciente LPS, mujer de 40 años. FUC era una paciente en tratamiento por una neoplasia de mama a la que se pudo realizar PCR cinco

meses después del análisis objeto de este estudio, con resultado negativo. La paciente LPS había presentado un patrón de Anti VHC + / LIA - dos años antes en el marco de un embarazo, realizándose entonces una PCR que resultó negativa. Desde entonces se han realizado cuatro análisis más, incluido el objeto de este análisis, resultando el patrón idéntico en todos los casos. Ninguna de estas dos pacientes presentaron signos ni clínica indicativa de infección por VHC. A la luz de la clínica, así como de su resultado LIA - y sus bajos valores S/CO de Anti-VHC (5,06 y 5,70 respectivamente), ambos sueros fueron interpretados como falso positivo del Anti-VHC.

- Por último, se observaron ocho sueros de siete pacientes (ALF, ACR, BGJA, EKH, MRJA, OSM, YR) con antígeno negativo confirmado tras PCR, y Anti-VHC + con LIA VHC indeterminado.
 - Cinco de los pacientes, (ALF, EKH, ACR, MRJA e YR), a tenor de las cifras bajas de su índice S/CO (entre 1,17 y 4,33), así como del cuadro clínico que presentaron, se interpretaron como falsos positivos Anti-VHC.

El paciente ALF, varón español de 53 años, había presentado otro análisis dos años antes con un patrón idéntico (LIA indeterminado merced a la positividad de NS4 con intensidad 1+), en ese caso sin PCR ni Ag VHC realizados. No constaba haber recibido tratamiento alguno frente a la infección.

La paciente EKH, mujer marroquí de 22 años, con dos muestras en este estudio con este patrón, presentaba cinco sueros analizados entre 2009 y 2014 en los que se repetía el patrón Anti-VHC + / LIA indeterminado (en este caso la banda positiva se trataba la C1 con intensidad variable 1+ o 2+) pero en los que se apreciaba una evolución a la negatividad en el índice S/CO. Finalmente en junio y julio de 2014 pudo confirmarse la negatividad Anti-VHC en sendos análisis. No consta haber recibido tratamiento frente a la infección.

El paciente ACR, varón español de 49 años, presentaba antecedentes de dislipemia, hipertensión arterial, hábito enólico importante e infarto cerebral. Ante la ausencia de datos sugestivos de infección por VHC, así como de conductas de riesgo para infectarse, este patrón con PCR negativa, que se repitió en el intervalo de un mes (con la única diferencia de que en el segundo

análisis la intensidad de la única banda LIA positiva, la NS3, fue +/- frente al 1+ del primero), se interpretó como un falso positivo Anti-VHC.

El paciente MRJA era un varón español de 20 años sin antecedentes clínicos de interés. Presentaba conducta sexual de riesgo en el momento del análisis, motivo por el cual se le efectuaron análisis microbiológicos para descartar ITS, resultando todos ellos negativos. Este patrón, que se repitió en el intervalo de cuatro meses (con la única diferencia de que en el segundo análisis la intensidad de la única banda LIA positiva, la NS3, fue 1+ frente al +/- del primero). El patrón presentado coincide con el de un falso positivo Anti-VHC, ya que de haber sufrido un contagio relacionado con esa conducta, la carga viral hubiera acabado siendo positiva (y ha sido negativa) y elevada de tal forma que la antigenemia presumiblemente hubiera sido detectable.

Por último, la paciente YR se trataba de una mujer China de 36 años que, en el momento del análisis, estaba embarazada. Esta paciente contaba con otros dos análisis correspondientes al segundo y tercer trimestre del embarazo en los que presentaba exactamente el mismo perfil, incluido LIA indeterminado con la única positividad de la banda NS3 una intensidad 1+. Igualmente se realizó una PCR paralela en la muestra objeto de estudio en este apartado, así como en otra posterior al embarazo, siendo la misma negativa, por lo que los resultados de los citados tres análisis, llevados a cabo durante el embarazo, se interpretaron como un falso positivo a Anti-VHC. Los resultados serológicos en las embarazadas son objeto de un profundo debate. La literatura describe casos de determinaciones tanto de IgM como de IgG frente a ciertos patógenos falsamente positivos en pacientes embarazadas, situación que se da con mayor frecuencia en situaciones de multiparidad. Estos escenarios están recogidos en estudios como el de Hook *et al* (489) o de Larsen *et al* (490), quienes focalizaban este tipo de respuesta para pruebas no treponémicas en el diagnóstico de la sífilis. Alanen *et al* (491) describieron una tasa de falsos positivos en IgG del virus del virus de la varicela no excesivamente llamativa, del 1,5% sobre 558 pacientes embarazadas. Abolghasem *et al* (492), por su parte, describieron la presencia en embarazadas de falsos positivos IgM frente a toxoplasmosis y asociaron este fenómeno a desordenes reumatólogicos en estas pacientes. De Carolis *et al*

(493) centraban las falsas positividades observadas en IgM de citomegalovirus en pacientes embarazadas con síndrome anti-fosfolípido. En el caso de esta paciente los valores S/CO de Anti-VHC han resultado bajos (4,33, 4,08 y 3,40), lo cual, a pesar de la indeterminación de la prueba confirmatoria y más específica como es el LIA, habla a favor de una falsa positividad. En cualquier caso la negatividad de tanto el Ag VHC realizado en las tres muestras, así como de la PCR en todo momento, nos confirman la ausencia de una infección activa.

○ Hubo un paciente, BGJA, varón de 50 años, interno en una prisión, exadicto a drogas de administración parenteral y coinfectado por VHB, VIH (en tratamiento con ritonavir, darunavir y galantamina) y VHC (genotipo 3) tratado previamente al análisis (en otra comunidad autónoma) con PegIFN y ribavirina en 2010. Este perfil, observado en el año 2013, podría deberse bien a la ausencia de infección activa por VHC tras el tratamiento (situación en la que podría objetivarse una RVS, pero que es difícil de confirmar ante la falta de análisis en nuestro centro, correspondientes al periodo durante el cual fue tratado), y/o a la inmunosupresión derivada de la infección VIH. El valor bajo de S/CO de Anti-VHC (3,18; y en su caso el LIA indeterminado con solo la banda NS3 de 2+) apuntan a la primera posibilidad. La cifra de linfocitos T CD4 (1144,17/mm³) parece descartar la segunda. Sin embargo, Long *et al* (448) describieron títulos de anticuerpos inferiores en pacientes coinfectados VHC / VIH frente a pacientes monoinfectados por VHC. En cualquier caso, ante la ausencia de más análisis en nuestro centro no se pudo realizar una interpretación sólida de este patrón, más allá de confirmar la ausencia de infección activa.

○ El paciente OSM, varón español de 42 años de edad, con antecedentes de adicción a drogas parenterales, esquizofrenia controlada, trombocitopenia y cirrosis hepática de origen mixto (alcohol y VHC), que motivó TOH en octubre de 2008. Tras el trasplante presentó un episodio de rechazo agudo en el contexto de un mal cumplimiento involuntario del tratamiento inmunosupresor, que fue tratado con corticoides. En enero de 2009, ante la ausencia de mejoría analítica se realizó nueva biopsia hepática que mostró datos de recidiva de la infección VHC en el injerto, sin signos de rechazo,

motivo por el que en marzo de ese mismo año se inició tratamiento con interferón pegilado y ribavirina. Ante el rechazo crónico del injerto, no controlable con tratamiento, en julio de 2009 se realizó retrasplante. En enero de 2010 se observan múltiples abscesos hepáticos secundarios a trombosis de la arteria hepática por lo que es retransplantado. Desde el punto de vista serológico este paciente ha presentado PCR sucesivamente negativas desde su tratamiento frente a la infección en 2009 (9 PCR negativas desde entonces) por lo que se objetiva una RVS. En este paciente se puede achacar sus resultados LIA y Anti-VHC a curación e inmunosupresión post-trasplante con aclaramiento progresivo de los anticuerpos.

- La positividad de la PCR confirmó que 38 muestras fueron falsos negativos para el Ag VHC. En el caso de estos 38 sueros se realizó determinación paralela de PCR. Todos ellos, salvo una muestra (MZJL), presentaron una carga viral por debajo de 10^4 UI/mL (concretamente se observó un valor máximo de $6,25 \times 10^4$ UI/mL, mínimo de 15 UI/mL, media de $2,54 \times 10^3 \pm 9.86 \times 10^3$ UI/mL), por lo que todos ellos se interpretaron como falsos negativos de Ag VHC, asociados a la falta de sensibilidad de la técnica. Dicha falta de sensibilidad en pacientes con cargas virales inferiores a 10^4 UI/mL ha sido descrita por numerosos estudios como Laperche *et al* (424), Soffredini *et al* (429), Krajden *et al* (437), Valcavi *et al* (439). Uno de los más recientes, publicado por Chevaliez *et al* (437b) cifraban el límite de sensibilidad en 1000 UI/mL, mientras que Florea *et al* (475) observaban el límite de detección entre 3 o 3,5 logaritmos. Esta consideración de falsa negatividad Ag VHC cobra más fuerza, si cabe, dado que todos ellos presentaban una infección conocida y tratada frente a el VHC, lo que descarta posibles falsos positivos de la PCR.

El paciente MZJL, varón español de 40 años, presentó la mencionada carga viral de $6,25 \times 10^4$ UI/mL. Este paciente, adicto a drogas de vía parenteral e interno en una prisión, se encontraba coinfecado con VHC (genotipo 4c/4d), VIH (en tratamiento) y HTLV-2. Presentaba unos niveles de linfocitos T CD4 de $1196,17/\text{mm}^3$, transaminasas normales (21 UI/mL) y estaba siendo sometido a tratamiento con PegIFN y RBV frente a la infección por VHC, negativizando su carga viral tres meses después y confirmándose posteriormente una RVS. Los

valores de Ag VHC (2,89 fmol/L) presentados por este paciente fueron cercanos al límite inferior de detección. En cualquier caso se trata de una falsa negatividad Ag VHC relacionada con la falta de sensibilidad y probablemente influenciada por la complicada situación fisiopatológica del paciente con una coinfección múltiple y deterioro de su sistema inmune.

En otros 93 sueros no se llevó a cabo la PCR por lo que no se pudo realizar una interpretación precisa de este perfil basada en su situación replicativa. Por ello, esta interpretación debió hacerse en función de los resultados del LIA y de los antecedentes clínicos.

- Observamos 45 sueros de 32 pacientes, en los que este patrón se dio con LIA indeterminado. Los valores de Anti-VHC fueron bajos (siempre inferiores a un índice S/CO < 10), lo cual suele corresponder a falsos positivos o pacientes curados que están perdiendo los Anti-VHC. Esto concuerda perfectamente con el hecho de que en estos pacientes predomina la banda NS3, banda que si bien mejora la sensibilidad de la técnica (504), también es la que con más frecuencia genera resultados indeterminados en los RIBA 2 y 3 (502, 505).

De los 32 pacientes con este patrón, destaca la presencia de seis embarazadas (BMAM, GGML, HS, MFN, PIY, YR), tres en programa de trasplantes (KCK, LGA, SAM) y dos hemodializados (CGAA, SEM).

- En 14 de los 32, disponíamos de resultados de PCR realizada en algún momento de su evolución pero no coincidente con el suero que nos ocupa. Los 14 habían resultado negativos a dicha determinación, lo cual refuerza la sospecha de paciente curado o de falsa positividad Anti-VHC.

En seis (ACR, CGAA, MGD, SEM, SSJ, YR) de estos 14 pacientes se había realizado más de un análisis de Anti-VHC en los que se obtuvo el mismo patrón Anti-VHC + / LIA IND. Ante la dificultad que implica objetivar una infección con un patrón persistente como éste, se tuvo que recurrir a la PCR con los resultados negativos ya mencionados.

Atendiendo a sus historias clínicas, en 10 de esos 14 pacientes no se registró en ningún momento el diagnóstico de infección por VHC mientras que en los otros cuatro (CRL, CGAA, CCG, KCK), sí que figuraba dicho diagnóstico.

- Entre aquellos cuatro diagnosticados de la infección, observamos un paciente neonato y tres tratados.

El paciente (CRL) es hijo de madre española infectada por VHC sin determinación de carga viral durante el embarazo. Si analizamos sus resultados se puede deducir que este paciente no presentaba una infección activa y se encontraba en una fase de aclaramiento de los anti-cuerpos maternos. Si bien este niño tenía 12 meses de edad en el momento del análisis, diversos trabajos como el publicado por Solís *et al* (473), indican la existencia de casos de persistencia de anti-VHC + hasta los 24 meses de edad en hijos no infectados de madres VHC positivas.

Tres pacientes (CCG, KCK y CGAA) habían sido sometidos a tratamiento lo que había disminuido la carga viral hasta niveles indetectables.

En definitiva, atendiendo a las determinaciones de la carga viral en análisis diferentes a los que son objeto de este estudio, podemos confirmar la ausencia de una enfermedad actual en todos estos pacientes. Este patrón en pacientes curados fue descrito por Rouet *et al* (472) en un paciente con negatividad de Ag VHC y ARN frente a Anti-VHC positivo con valores bajos y LIA indeterminado.

- En cuanto a los 10 pacientes (ACR, LGA, MGD, MFMA, PLF, SEM, SSJF, SAM, SSJ, YR) con PCR negativa previa o posterior al análisis, sin diagnóstico previo de infección por VHC, persistía la duda entre una posible infección asintomática curada espontáneamente o una falsa positividad Anti-VHC. Cabe destacar que los valores S/CO de Anti-VHC estuvieron en un rango bajo (entre 6,03 y 1,24, media de $3,21 \pm 1,36$), lo que en ausencia de historia clínica sugestiva de infección por VHC nos lleva a interpretarlos como falsos positivos Anti-VHC. En cualquier caso se puede afirmar que no existe una infección activa.

- Por otro lado, hubo 18 pacientes que no presentaban ninguna determinación de la carga viral previa ni posterior a los análisis evaluados.
 - En siete de ellos (ATC, BM, LOT, MRJA, NFA, NCAJ, UPJM) su historia clínica reflejaba un diagnóstico de la infección por VHC previa. Dado que no constan haber recibido tratamiento en ningún momento, en todos estos casos podría deducirse que se trataría de casos en remisión espontánea y en fase de aclaramiento de los Anti-VHC [Gerlach *et al* (141)].
 - Entre los 11 sin diagnóstico previo de infección por VHC (AK, BMAM, EPME, GGML, GDMDC, HS, JMMG, LEVM, MGEJ, MFN, PIY), encontramos cinco (BMAM, GGML, HS, MFN, PIY) cuyos análisis se habían realizado en el marco de un embarazo.
- Estas cinco pacientes junto con la previamente mencionada YR hacen que el grupo poblacional mayoritario con este patrón de discordancia Ag VHC - / Anti-VHC + y LIA indeterminado sea el de las pacientes gestantes. Esta situación fisiológica podría justificar la aparición y persistencia de falsos positivos a Anti-VHC en todas ellas. En este sentido, como ya se ha descrito anteriormente para el caso de YR, la literatura describe casos en las que se considera el embarazo como inductor de falsos positivos en la serologías de determinadas enfermedades infecciosas (489, 490, 491, 492, 493).
- En cuanto a los seis pacientes restantes hubo una paciente, EPME, mujer española de 64 años, quien había presentado patrones de Anti-VHC exactamente iguales en repetidas ocasiones, sin determinación de la carga viral ni diagnóstico clínico previo que pueda ayudar a discernir el motivo de esta positividad. Del mismo modo, hubo otros cuatro pacientes (AK, GDMDC, JMMG, LEVM) que únicamente presentaron el análisis objeto de este estudio y dentro de su historia clínica no presentaron antecedente alguno; en todos ellos ha resultado imposible responder con certeza sobre la presencia de infección por VHC. Sin embargo, a la luz de dichos datos, así como de sus valores S/CO bajos de Anti-VHC (concretamente entre 3,14 y 1,42, media $2,24 \pm 0,65$), puede deducirse que se tratan de falsos positivos Anti-VHC. Hubo otro paciente el paciente (MGEJ), varón español de 38 años con antecedentes de

enfermedad de Crohn estenosante diagnósticada hace 26 años, intervenido quirúrgicamente en tres ocasiones desde entonces y con tratamiento farmacológico. Se le realizaron dos determinaciones de Anti-VHC en el periodo de un año con patrones idénticos de Anti-VHC + (S/CO 7,28) / LIA IND NS3 3+ y el segundo Anti-VHC + (S/CO 2,17) / LIA IND NS3 1+. Si bien en su primer análisis los valores S/CO de Anti-VHC fueron ligeramente más elevados a los observados en el resto de pacientes con este cuadro, lo que nos podría llevar a pensar en un verdadero positivo y en la necesidad de llevar a cabo un análisis de PCR para confirmar la presencia de una infección activa con cargas virales bajas, la evolución de sus valores S/CO en el segundo análisis nos lleva a interpretarlo una vez más como un falso positivo Anti-VHC.

La literatura habla de que casi todos los falsos positivos para Anti-VHC tienen un índice S/CO menor a 10. En ese sentido Moretti *et al* (474) a partir de un estudio de 12.800 sueros, indicaron que todas aquellas muestras con índice S/CO por debajo de 10,3 en un ensayo de quimioluminiscencia para anticuerpos VHC, deben ser confirmadas mediante RIBA o LIA, siendo el resultado de esta última técnica la que definirá la interpretación. Para aquellas muestras con S/CO superior a 10,3 cifró el VPP en 95% y el VPN igualmente en 95%. Como ya expusimos en el XVIII congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica desarrollado en Valencia en 2014, el Ag VHC puede ser una alternativa al LIA máxime cuando se trata de una prueba más rápida, más barata y más fácil de realizar (468). En nuestro caso, los falsos positivos tienen un índice de Anti-VHC < 10, pero los verdaderos, lo tienen por endima y por debajo de la mencionada cifra.

- Por otro lado, en este estudio se incluyen 25 sueros de 23 pacientes en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA + sin PCR determinada paralelamente. Se trataba de pacientes pertenecientes a los grupos de riesgo incluidos en nuestro estudio o a la población general, tratados, con infección previa conocida por el virus de la hepatitis C en los que no procedía la realización de la PCR en este momento o lactantes no infectados hijos de madres con infección activa. No incluyen a ningún posible donante de órganos.

- Por último, observamos 23 sueros de 21 pacientes, en los que el patrón obtenido fue Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA - sin PCR paralela determinada. Es remarcable el hecho de que en este grupo los valores de Anti-VHC resultaron bajos (media S/CO= 2,54 ± 1,73). A tenor de estos datos, todos los sueros en este grupo fueron considerados como falsos positivos Anti-VHC.

Entre estos pacientes es destacable que 10 de ellos presentaban comorbilidades o procesos fisiológicos compatibles con alteraciones inmunológicas origen de falsos positivos, como son embarazos, hemodializados, en tratamiento quimioterápico oncológico, coinfetados VIH / ADVP. No obstante queremos destacar que en la literatura se describen otras causas de falsos positivos Anti-VHC. Concretamente Dos Santos *et al* (477), Gross *et al* (482), Lunel *et al* (483) y Trepo *et al* (484) explicaban como había ciertos aspectos, como presencia de hipergammaglobulinemia, enfermedades hepáticas, desórdenes autoinmunes u otras infecciones virales, que podían ocasionar la aparición de falsos positivos Anti-VHC mediante determinación por EIA. También, en referencia a estos falsos positivos, Berger *et al* (476) publicaban en su estudio como los valores Anti-VHC S/CO entre 1,3 y 3 se correlacionaban con una elevada proporción de falsos positivos Anti-VHC no confirmados mediante RIBA o LIA. Dicho estudio, sin embargo, cifraba en un 99,41% la especificidad de la determinación de Anti-VHC mediante el equipo Architect utilizado en nuestro estudio, dicha especificidad aumentaba hasta un 99,68% tras la implementación del Inno-LIA confirmatorio.

En análisis de este perfil discrepante remarca que la positividad de Anti-VHC, confirmada con LIA o RIBA no indica necesariamente infección actual por VHC. Este perfil puede representar un resultado falso positivo o infecciones previas por VHC curadas. En definitiva, un resultado Anti-VHC positivo debe interpretarse, en sentido estricto, exclusivamente como un contacto previo con el virus

Los falsos positivos pueden suponer un problema en donantes de órganos o tejidos o en hemodializados.

En los pacientes donantes, este perfil (Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA - sin PCR) podría ocasionar el rechazo del donante, pero sucedería lo mismo si no se hubiera hecho el antígeno. En nuestro caso, de los cuatro sueros con resultado falso positivo Anti-VHC de los pacientes en programa de trasplante, ninguno se ha producido en donantes. En los receptores este perfil supone un problema menor porque hay tiempo suficiente para estudios ulteriores que aclaren su significado.

En los pacientes hemodializados, este perfil (Ag VHC - / Anti-VHC + / LIA - sin PCR) podría condicionar el manejo de los mismos, pero los 10 falsos positivos detectados podrían a ser estudiados con mayor profundidad y descartar la presencia de infección activa. En todo caso, la utilización del marcador Ag VHC permitiría diferenciar una infección actual (Ag VHC +) de una curada (Ag VHC -), lo cual podría aconsejar una nueva valoración de los pacientes Ag VHC - / Anti-VHC +, pasando a ser considerados sujetos no infectados.

La falsa positividad Anti-VHC no parece representar un fenómeno muy frecuente en poblaciones de pacientes hemodializados según la literatura revisada. En definitiva las valoraciones efectuadas por dichos autores pasan por equiparar esta situación a la observada en la población general y que la literatura describe ampliamente [Berger *et al* (476), Dos Santos *et al* (477), Gross *et al* (482), Lunel *et al* (483) y Trepo *et al* (484)].

En cuanto a los patrones de resultado concordantes, se obtuvieron 175 sueros pertenecientes a 145 pacientes con patrón de positividad tanto para Ag VHC como para Anti-VHC y 613 negativos a ambos parámetros.

Entre aquellos positivos a ambos marcadores, hubo 19 muestras cuyos valores de Ag VHC en un primer análisis resultaron en Zona Gris (Zgr), posteriormente confirmados como positivos. Se efectuó PCR en paralelo a 16 de estas 19 muestras y 15 de ellas mostraron niveles de carga viral por debajo de 10^4 UI/mL, valor por debajo del cual desciende considerablemente la sensibilidad de la técnica, según la literatura consultada [Laperche *et al* (424), Krajden *et al* (437), Valcavi *et al* (439), Soffredini *et al* (429), Chevaliez *et al*

(437b), Florea *et al* (475)]. Por lo tanto, cargas virales inferiores a 10^4 se suelen asociar con valores de Ag VHC negativos o en Zonas Gris

Entre los pacientes incluidos en el grupo con patrón concordante Ag VHC + / Anti-VHC + / LIA + encontramos un caso especial. Se trató de la paciente II, mujer española de 42 años, que presentó el citado patrón concordante que, sin embargo, fue discordante respecto a la carga viral, que fue negativa. Su caso ha sido comentado previamente. Esta paciente, infectada por el genotipo 1b, fue tratada con PegIFN y ribavirina en 2009, presentando carga viral negativa en nueve determinaciones efectuadas desde entonces hasta enero de 2014. En ese último análisis se ha apreciado la discordancia Ag VHC + / Anti-VHC + / PCR -. Como ya hemos destacado previamente, creemos que se trata de un falso positivo Ag VHC ya que parece poco probable que en esta paciente el virus persistiera en el hígado / monocitos en ausencia de viremia, por los repetidos controles PCR negativos a lo largo de cinco años.

Por otro lado, se observaron cinco muestras de cinco pacientes (CSL, CBJ, MV, SCF y NGE) con Anti-VHC + / LIA indeterminado y Ag VHC +. Los valores observados de Ag VHC fueron elevados (media de $5857,13 \pm 4396,35$ fmol/L), mientras que los valores de Anti-VHC fueron moderadamente bajos (media S/CO= $8,58 \pm 4,64$). Se realizó PCR en cuatro de estas muestras con unas cargas virales elevadas ($5,35 \times 10^6 \pm 1,02 \times 10^7$ UI/mL). Todas las muestras resultaron LIA indeterminado merced a la positividad de la banda NS3, banda que, si bien mejora la sensibilidad de la técnica (504), también es la que con más frecuencia genera resultados indeterminados en los RIBA 2 y 3 (502, 505).

El paciente CSL, varón español de 54 años, presentaba antecedentes de cirrosis hepática por VHC (genotipo 1a, tratado con IFN en 1997 sin resultado), trombopenia autoinmune secundaria a VHC, que requirió esplenectomía en 1997, y dos ciclos de Rituximab entre 2000 y 2005. En 2008 se le diagnosticó linfoma de Hodking, del que es tratado con seis ciclos de CHOP, seguidos de remisión. Desde entonces, presentó hipogammaglobulinemia, afectando a IgG, IgA e IgE, con cuadros de sinusitis crónica, aftas orales candidásicas e infecciones respiratorias de repetición, que requirieron infusiones mensuales de Ig. Serológicamente el análisis objeto de estudio se efectuó el 25/03/2013, con

el consabido patrón Ag VHC + (11893,21 fmol/L) / Anti-VHC + (S/CO 1,29) / LIA IND (NS3 +/-). Previamente a este análisis, se evaluaron tres sueros, entre 2008 (año en el que el paciente recibió los seis ciclos de CHOP) y 2012, siendo en todos ellos el patrón Anti-VHC + / LIA IND, con una evolución tanto de los valores S/CO (7,01; 5,44 y 1,7) como del LIA (NS3 +2; NS3+2; NS3+1) a la negatividad. Posteriormente al análisis objeto de estudio, se dispusieron de cuatro determinaciones de la carga viral (entre octubre de 2013 y noviembre de 2014), siendo en todas ellas positivas, con valores superiores a los 6 logaritmos. Así mismo, en septiembre de 2014 se efectuó una determinación de Anti-VHC siendo esta negativa (S/CO 0,31), negatividad que persistía en mayo de 2015, mes en el que el paciente falleció. El resultado observado en este paciente es similar al descrito previamente en el caso del paciente CGJ, y cuadra con la hipogammaglobulinemia derivada de los sucesivos tratamientos inmunosupresores (249, 511, 512). La inmunosupresión es una circunstancia descrita como productora de resultados indeterminados con RIBA de tercera generación (200, 506).

El paciente CBJ se trata de un individuo de 13 años, que adquirió la infección por transmisión vertical, por lo que presenta resultados de PCR positivos desde su nacimiento junto con transaminasas elevadas, Anti-VHC negativos repetidamente al menos hasta los cuatro años de edad. A la luz de que el niño no presentaba ningún tipo de inmunodeficiencia, ya que había experimentado una buena respuesta de anticuerpos tras la administración de la vacuna triple vírica a los 18 meses de edad, Pitart *et al* (468b) etiquetaron este caso como una inmunotolerancia al VHC. En el análisis que se evalúa en estos momentos, cuando el paciente contaba con 12 años de edad, el patrón había cambiado, siendo entonces Ag VHC + (3949,07 fmol/L) / Anti-VHC + (S/CO 13,38) / LIA indeterminado (positividad únicamente para la banda NS3 4+) y transaminasas moderadamente elevadas (49 UI/mL). Se trataría por lo tanto de un paciente que ha perdido la inmunotolerancia inicial frente al VHC y está en fase de seroconversión. Las inmunotolerancias, y específicamente aquellas relacionadas con el VHC, son situaciones repetidamente descritas en la literatura que cursan con ausencia de anticuerpos en presencia del agente

causal de la infección. [Durand *et al* (423b), Laperche *et al* (424), Suzuki *et al* (507), Zanetti *et al* (508) y Sarrión *et al* (509)].

La paciente MV, de 41 años de edad y originaria de Rumania, se corresponde con patrón compatible con una infección inicial. En un análisis realizado un año antes, la determinación de Anti-VHC resultó negativa (S/CO 0,09), en el análisis objeto de estudio en estos momentos presentó un patrón de Ag VHC + (5704,4 fmol /L) / Anti-VHC (S/CO 7,47) / LIA indeterminado (únicamente banda NS3 2+); por último en otro análisis realizado año después, las cifras de Ag VHC fueron de 1354,00 fmol/L, las de S/CO de Anti-VHC fueron de 15,03 y el LIA resultó positivo merced a la presencia de las bandas NS3, NS4 y NS5, todas ellas con una intensidad de 4+. Todo apunta a que se ha tratado de una seroconversión, coincidiendo el segundo análisis con el periodo ventana para el LIA, motivo por el cual el LIA aún no resultó positivo en ese momento. Este paciente, que se encuentra en periodo de ventana no hubiese sido diagnosticado sin la prueba de Ag VHC ya que ante un índice S/CO de anti-VHC moderado y LIA indeterminado podría haber sido interpretado como falso positivo Anti-VHC o, en el mejor de los casos, haberse solicitado una nueva determinación serológica de hepatitis C con posterioridad, lo que implica un retraso diagnóstico y el riesgo potencial de pérdida del paciente.

Del paciente SCF, varón español de 82 años, se remitió una muestra desde la consulta de digestivo de una localidad perteneciente a nuestra área de salud, por presentar una elevación de las transaminasas (382 UI/mL). A los 10 meses del análisis objeto de estudio se determinó la carga viral siendo la misma de $2,15 \times 10^6$ UI/mL, junto con unos Anti-VHC de nuevo positivos (S/CO 9,33), LIA positivo por presencia de las bandas NS3 3+ y NS4 2+ y ALT de 77 UI/mL. Pensamos que en el momento del análisis que nos ocupa, este paciente presentaba un cuadro agudo en periodo de ventana tardío próximo a la positivización definitiva del LIA.

El periodo serológico de ventana que, en este caso, afecta al LIA y que con las técnicas serológicas de tercera generación se cifran para Anti-VHC entre 60 y 66 días, es una de las debilidades en el diagnóstico de la hepatitis C

[(Icardi *et al* (170) y Marwaha *et al* (439b)]. La técnica de Ag VHC se muestra particularmente útil en los pacientes en periodo de ventana, que pueden ser especialmente peligrosos cuando se trata de donantes de órganos o en programa de diálisis, al provocar una sensible reducción del mismo.

El paciente NGE, varón español de 43 años, presentaba antecedentes de cirrosis hepática enólica y gonorrea. En análisis evaluados en 2010 y 2011 la determinación de anti-VHC resultó negativa, con ALT de 46 y 163 UI/ mL, respectivamente. En 2013 dicha determinación resultó positiva (S/CO de 12,25) al igual que el LIA confirmatorio (bandas C1 4+, C2 2+, NS3 4+ y NS4 1+) con ALT de 105. A los cuatro meses se efectuó el análisis objeto de estudio, con Ag VHC de 41,27 fmol/L, Anti-VHC + (S/CO 11,41), LIA indeterminado (con una única banda positiva, NS3 4+) y una PCR positiva con carga viral < 15 UI/mL. En ese momento sus valores ALT fueron de 30 UI/mL. A los dos meses de dicho análisis la carga viral permanecía en las mismas cifras, para negativizarse cuatro meses más tarde. Un año más tarde de este último análisis la antigenemia resultó negativa y los Anti-VHC positivos, con unas cifras S/CO bajas (2,63) y un LIA indeterminado merced a la positividad única de la banda NS3 1+. Interpretamos que en este caso se trataba de una infección aguda por VHC (periodo de ventana) que se resolvió espontáneamente, probablemente. A este respecto, hay abundante literatura que describe la cinética viral así como de sus marcadores en cuadros de hepatitis C aguda [Pérez-Álvarez *et al* (118), Gerlach *et al* (141) y Cividini *et al* (177)].

La aplicación de la técnica del Ag VHC nos ha permitido diagnosticar diversos casos de infecciones por este virus, que podrían haber pasado desapercibidas sin aplicación de técnicas de biología molecular, como son casos de infección aguda, en periodo de ventana para Anti-VHC y/o LIA, con inmunotolerancia e inmunodeprimidos.

En este sentido, nuestros datos confirmarían los hallazgos e interpretaciones realizadas por diversos autores. En sendos estudios de Pawlotsky *et al* (200, 506) se describían resultados indeterminados en inmunodeprimidos; la situación de inmunotolerante respecto al VHC lo

describían Durand *et al* (423b), Laperche *et al* (424), Suzuki *et al* (507), Zanetti *et al* (508) y Sarrión *et al* (509); en cuanto a la situación del periodo ventana tenemos a Icardi *et al* (170) y Marwaha *et al* (439b), que lo cifran aproximadamente en dos meses; por último, la cinética del VHC en cuadros de hepatitis C aguda lo describen Pérez-Álvarez *et al* (118), Gerlach *et al* (141) y Cividini *et al* (177).

En un estudio publicado por Seiskari *et al* (494), a partir de un estudio sobre 27.454 muestras, pertenecientes a pacientes no diagnosticados previamente, observaron 668 positivas frente a Anti-VHC de las cuales 109 resultaron LIA negativo y 63 indeterminado. Los autores confirmaron la positividad Ag VHC en un 13% de las muestras mientras que el 18% fueron confirmadas mediante técnicas de biología molecular. De este modo, concluían que el uso del Ag VHC, a pesar de su peor sensibilidad en comparación con la PCR, era de gran utilidad a la hora de definir la interpretación de este tipo de patrones analíticos.

En cuanto al otro patrón concordante observado, Ag VHC - / Anti-VHC - , se obtuvieron 613 sueros pertenecientes a 384 pacientes. Con ello se constata que la mayoría de Ag VHC negativos, son Anti-VHC negativos, lo que resalta la bondad del primero de estos marcadores para realizar cribado.

Una posible problemática a la hora de utilizar la detección del Ag VHC puede ser la aparición de resultados en Zona Gris y su interpretación. En total, en nuestro estudio, observamos 33 sueros (3,46%) correspondientes a 32 pacientes con un primer resultado de antigenemia en Zona Gris, para cuya interpretación se determinó la carga viral en 24 de dichos sueros. La Zona Gris es previsible que aparezca en dos tipos de situaciones: falsos positivos y situaciones de antigenemia baja como puede suceder en pacientes infectados tratados o en pacientes que están aclarando espontáneamente el virus (510).

El porcentaje detectado por nosotros no parece excesivo, especialmente si se tiene en cuenta que buena parte de las muestras que

hemos analizado pertenecen a pacientes complicados y/o previamente tratados.

- Hubo 25 (75,76%) sueros en los que, tras repetición, se confirmó el resultado de Ag VHC como positivo, con valores de antigenemia entre 3,02 y 9,32 fmol/L (media: $5,74 \pm 1,81$).

- Entre los confirmados como positivos, se observaron 19 sueros concordantes con Anti-VHC y LIA, 16 de ellos con PCR realizada y que resultó positiva. La carga viral en 15 de estos 16 estuvo por debajo de 10^3 UI/ml, mientras que una única muestra, que perteneció a la paciente SPG, presentó un resultado de $1,95 \times 10^4$ UI/ml.

Dicha paciente (SPG), mujer española de 52 años, presentó valores de Ag VHC cercanos al límite superior de la Zona Gris (8,92 fmol/L y 9,57 fmol/L respectivamente) y en el momento del análisis estaba siendo sometida a tratamiento frente a la infección con PegIFN y RBV resultando finalmente no respondedora a éste.

Hubo tres pacientes más, con este patrón, que no contaron con la ayuda de la PCR para confirmar la positividad del Ag VHC, fueron los pacientes CGMT, GMAM y RPCL.

- Se observaron dos pacientes, GMAM y RPCL, diagnosticados de infección por VHC, con antecedentes de PCR + y ambos en lista de espera pretrasplante hepático. Los dos habían recibido tratamiento previo a dicha intervención con la finalidad de minimizar la carga viral en el momento del trasplante, por lo que interpretamos que la Zona Gris detectada correspondería a un descenso paralelo de la replicación viral.

- La paciente CGMT, mujer española de 63 años, estaba diagnosticada y tratada con PegIFN y ribavirina en 2012, tras lo cual se confirmó una RVS. El análisis, que tuvo lugar el en mayo de 2013, presentaba PCR negativas en mayo de 2012 y abril de 2013 e, igualmente, presentó un resultado de Ag VHC negativo en julio de 2014. Pensamos que el perfil detectado en esta paciente podría corresponderse con un falso positivo o a la

presencia de cápsides virales sin ARN. Esta última situación ha sido descrita por Maillard *et al* (407) y Schutler *et al* (413). En el caso de esta paciente, que previamente era PCR positivo, parece poco prudente interpretar el perfil de una forma simplista, achacándolo a una falsa positividad. Por ello tal vez debería de reinterpretarse este perfil, al igual que el descrito en la paciente II (grupo concordante Ag VHC + / Anti-VHC + / LIA + pero discordante con PCR -), cuando se dispongan de más conocimientos sobre el proceso replicativo de la VHC (19, 19b).

- En seis (21,21%) sueros (pacientes BMFJ, BOS, CRM, GVA, KK, LAJP) confirmados tras repetición como positivos, se observó una discordancia respecto al Anti-VHC. Los valores de Ag VHC en este caso oscilaron entre 3,81 y 9,32 (media= $4,99 \pm 1,96$) y en cuatro de ellos se pudo realizar PCR con resultado negativo interpretándose como falsa positividad al Ag VHC. En los dos sueros restantes no se dispuso de determinación paralela de la carga viral (pacientes BMFJ y GVA), ya que no hubo muestra suficiente. Estos dos casos se han expuesto previamente en la discusión sobre muestras discordantes Ag VHC + / Anti-VHC -, siendo la interpretación final para ambos de falsa positividad al Ag VHC.
- En cuanto a los ocho (24,24%) sueros restantes en Zona Gris, confirmados como negativos, siete resultaron Anti-VHC negativos, considerándose todos ellos verdaderas negatividades del Ag VHC. Hubo, además, tres sueros de estos siete en los que se pudo realizar PCR confirmando la misma la verdadera negatividad. Es destacable que seis de las ocho muestras con este resultado pertenecieron a pacientes hemodializados, por lo que los resultados de este tipo de paciente deberían ser objeto de especial atención.

Las cuatro muestras con este patrón sin PCR paralela determinada pertenecieron a los pacientes EPR, FCJ, FLJ y LLD. Ninguno de ellos presentaba antecedentes de especial relevancia más allá de su patología de base.

Por último, el suero restante de este grupo, perteneció a la paciente PCJ y presentó valores positivos para Anti-VHC y LIA siendo en este caso la PCR negativa. Se trataba de una mujer de 60 años tratada previamente a este análisis con PegIFN, RBV y Telaprevir. En el momento del análisis acababa de finalizar dicho tratamiento y había negativizado la PCR. Esta situación persistió hasta ocho meses después de finalizar el citado tratamiento, momento en el que la paciente falleció a consecuencia de un hepatocarcinoma en fase terminal. La negatividad del Ag VHC en este perfil es achacable al tratamiento.

Uno de los posibles inconvenientes de la técnica de Ag VHC es la detección de resultados en Zona Gris, que puede acabar correspondiendo a verdaderos positivos o a falsos positivos, según sean los resultados del protocolo de repeticiones, anteriormente señalado. Aunque la repetición de la prueba, y/o, en su caso, la PCR, aclararán la interpretación en la mayoría de los caos, estos resultados pueden tener una importante repercusión en situaciones de donación de órganos o en pacientes en programa de hemodiálisis, especialmente por la dificultad en la relación del diagnóstico molecular en situaciones de urgencia.

En nuestra experiencia, el resultado en Zona Gris ha sido poco frecuente (3,46%), pese a que nuestro estudio incluye un número importante de pacientes tratados. Hadziyannis *et al* (450) encontraron Zona Gris en el 3,81% de 105 muestras con Anti-VHC+. Este porcentaje es similar al descrito por nosotros. Así mismo, las cargas virales observadas en dicho estudio (10^3 y 10^4 UI/mL) fueron similares a las observadas en el nuestro para las muestras con este patrón.

Hasta la fecha existen pocos estudios que hablen de resultados en Zona Gris, y ninguno valora su influencia en la utilidad del equipo de detección del Ag VHC.

Hemos constatado que la mayoría de las Zonas Grises se confirman como verdaderos positivos y que se dan en pacientes con carga viral inferior a 4 logaritmos. En efecto, hemos encontrado que el 75,76% (25 muestras de las 33 con un primer análisis en Zona Gris) son verdaderos positivos. No obstante,

hay que señalar que no se apreció relación con la concentración de Ag VHC en los casos en Zona Gris. Ésto obliga a repetir necesariamente los resultados en Zona Gris.

La repetición de las Zonas Grises plantea dos problemas, el coste de tiempo y de dinero y, en el caso de donantes de sangre o de órganos, el no poder tomar una decisión de urgencia sobre la utilización de los mismos. En todo caso, la repetición garantiza seguridad en los resultados ya que no es factible realizar técnicas de PCR de rutina o de urgencia, salvo cuando así lo especifica la legislación, como es el caso de los bancos de sangre.

Pensamos, por lo tanto, que la repetición, tras un resultado en Zona Gris, es necesaria en aras de la exactitud diagnóstica y que el coste económico y de tiempo son asumibles, incluso en el caso de que se optara por realizar la determinación de Ag VHC junto con los demás marcadores de hepatitis y no después de realizadas las operaciones de mantenimiento recomendadas por el fabricante de los reactivos utilizados por nosotros.

Todo esto ratifica nuestras conclusiones expuestas el XIX Congreso de la sociedad española de Microbiología y Enfermedades Infecciosas en 2015 (510).

Otro de los problemas que plantea la prueba Ag VHC es una sensibilidad mejorable en muestras con carga viral menor a 10^4 UI/mL, rango por debajo del cual la bibliografía habla de sensibilidades que oscilan entre un 20,83% y un 88,80% (424, 437, 439, 429, 437b, 475), inferiores a las detectadas para cargas virales superiores, cifradas por encima del 98% en todos los casos. En nuestra serie la sensibilidad de la prueba Ag VHC en muestras con carga viral inferior a dicha cifra ha sido del 37,10% mientras que, en los pacientes con carga viral por encima de 10^4 UI/mL, ha sido del 98,61%.

En relación con la magnitud del problema que supondría el déficit de sensibilidad en pacientes con carga viral baja, hemos constatado, analizando las muestras recibidas en nuestro laboratorio entre 2010 y 2014, que las cargas virales menores a 10^4 UI/mL solo ocurren en el 5,48% de los sueros y que al menos en el 94,86% pertenecían a pacientes tratados frente a la hepatitis C.

En el 5,14% restante no hemos podido averiguar este dato por ser pacientes sin historia clínica en nuestro centro.

Observamos pues, que la posibilidad de falsos negativos por carga viral menor a 10^4 UI/mL muy probablemente solo ocurre en pacientes tratados, circunstancia que es perfectamente conocida por el facultativo que interpreta el resultado del laboratorio resultado.

En nuestro estudio los falsos negativos Ag VHC han sido atribuibles a bajas cargas virales observables en infecciones debidas a cualquiera de los genotipos. En definitiva, dicho fenómeno no guarda relación estadísticamente significativa con el genotipo infectante.

En los sueros con carga viral superior a 10^4 UI/mL la sensibilidad de la antigenemia es superponible a la PCR ya que solo hemos detectado un suero (paciente MZJL) con $6,25 \times 10^4$ UI/mL y Ag VHC -, cuyas circunstancias han sido previamente descritas.

Por todo ello, habría pocas objeciones a la recomendación de utilizar la detección de Ag VHC en el cribado de la hepatitis C en sustitución del Anti-VHC, cuya positividad no siempre refleja infección actual como ya hemos reflejado previamente.

Sobre la utilidad de Ag VHC en los pacientes en hemodiálisis debemos destacar que la técnica de Ag VHC ha proporcionado resultados falsos positivos en 3 muestras (dos de un mismo paciente) (0,76%), cifra similar a la de la población global de nuestro estudio, y resultados negativos en 14 muestras con anticuerpos positivos (9 de pacientes curados espontáneamente o con tratamiento, 4 de pacientes con falso positivo Anti-VHC y una de un paciente con carga viral de 3 logaritmos, del que no hemos podido averiguar si había recibido tratamiento o no). De ser así, el resultado de este paciente no sería de extrañar porque ya hemos señalado la falta de sensibilidad de la técnica de Ag VHC en pacientes tratados con carga viral baja, lo que puede suponer un problema en pacientes hemodializados.

Existe una circunstancia adicional descrita en pacientes hemodializados descrita por diversos autores (513-515), y ya comentada en esta discusión, como es la reducción de la carga viral que se produce tras la hemodiálisis y que podría haberse dado en nuestro paciente anterior y que no sabemos si podría afectar también a la concentración de Ag VHC, en tanto no se determine la causa de este descenso en la carga viral, que afectaría, al menos en parte, a la concentración de Ag VHC (hay que recordar que el Ag VHC puede encontrarse en el suero formando parte del virión y en forma libre). Debemos tener en cuenta que se podría sumar el efecto reductor de un tratamiento con el debido a la diálisis y que no sabemos la duración del efecto reductor tras una sesión de diálisis.

Estos datos nos llevarían a recomendar el cribado con Ag VC más Anti-VHC a los pacientes que en programa de hemodiálisis, aunque los pacientes nuevos no habrán sufrido este fenómeno antes de la diálisis y conoceremos la situación de los pacientes antiguos.

En relación con el papel del Ag VHC en los programas de trasplantes de órganos podemos decir que este marcador nos ha permitido detectar sin problemas la única infección por VHC existente en nuestros pacientes. Es cierto que también lo ha hecho Anti-VHC, pero como hemos comentado antes, el Ag VHC, a diferencia de Anti-VHC, nos habría permitido detectar la infección en pacientes en periodo de ventana, en inmunotolerantes y en inmunodeprimidos, lo cual confiere mayor seguridad al cribado en el programa de trasplantes. Por otro lado, en los posibles donantes no se ha producido ningún falso positivo, ni ningún falso negativo.

Desde otro punto de vista, a corto plazo, se va a disponer en el mercado de diversas opciones de tratamiento con respuestas cercanas al 100%. En esta tesitura, deberá valorarse el tratar a todos aquellos pacientes diagnosticados de la infección, sea cual fuere su situación fisiopatológica, a fin de erradicar el virus o al menos minimizar su presencia a nivel global.

En este sentido, un aspecto no analizado en nuestro estudio es el papel del Ag VHC en el control del tratamiento, utilidad que debe ser objeto de

estudios más amplios. Desafortunadamente, los datos de los que se dispone a fecha de hoy son muy limitados para poder efectuar recomendaciones sólidas y menos aún en el caso de los nuevos tratamientos. Se han publicado diversos estudios en pacientes tratados con regímenes de PegIFN y ribavirina en los que se sugiere que este marcador puede detectar respuesta a partir del 3º día (455) post-tratamiento, de la primera (455-458) o de la segunda semanas (455, 458-461). Cuando se utiliza el criterio del descenso de dos logaritmos en la carga viral para cesar el tratamiento en la 12ª semana, Ross *et al* (176) sugieren que, la falta de descenso de los citados dos logaritmos en el nivel de Ag VHC, refleja una ausencia de respuesta al tratamiento en 10 de 10 pacientes. Florea *et al* (475) hablaban de un descenso en la sensibilidad de la técnica desde un 98,5% en el cribado de pacientes no tratados, frente a un 50% en pacientes tratados. Dicho estudio también concretaba en 48 y 72 semanas, tras iniciar el tratamiento, el periodo en el que la técnica resulta más fiable, con unas sensibilidades del 88,2% y 96,1% respectivamente (notablemente superior a la hallada a las 12 y 24 semanas que fue de un 52,1% y 48,1% respectivamente).

En estos momentos, con la incorporación de los nuevos antivirales de acción directa que actúan sobre la maduración y replicación del VHC, el antígeno del core del virus puede presentar incluso valores superiores al ARN VHC. Este hecho se basa en que estos antivirales evitan la formación del virus mientras el antígeno está aún siendo producido por lo que se correlaciona mejor con un posible aclaramiento (172). En cualquier caso, aún no se han publicado datos en relación a este marcador y su relación con la respuesta viral sostenida.

Según los datos actuales de la literatura, el uso del Ag VHC puede ser de utilidad en el marco del inicio del tratamiento, ya que nos permite corroborar un descenso en la carga viral, manifestando así la adherencia al tratamiento por parte del paciente, pero que una vez finalizado el tratamiento su eficacia debería ser constatada mediante métodos moleculares.

La técnica Ag VHC de Abbott presenta, desde nuestro punto de vista, algunos aspectos que pueden ser mejorados por el fabricante y que señalamos a continuación:

- Dificultades en la calibración con algunos lotes de reactivos. Este problema se soluciona con una sustitución del lote, pero puede suponer un problema de retraso de resultados.
- Recomendación por el fabricante de procesar la técnica de forma separada de la determinación de Anti-VHC, bien en un autoanalizador diferente o bien después de realizar el mantenimiento del autoanalizador tras haber realizado la prueba Anti-VHC. Esto es consecuencia de que podrían aparecer falsos positivos al Ag VHC con valores bajos, cuando ésta prueba se realiza inmediatamente después de haber realizado un anti-VHC con resultado positivo por un fenómeno de arrastre. En este caso pueden aparecer valores de Ag VHC superiores a los reales en una magnitud de aproximadamente 4 fmol/L, que podrían hacer que resultados negativos aparecieran como Zona Gris o resultados en Zona Gris como positivos. Creemos que la recomendación del fabricante ofrece mayor seguridad, pero resulta poco operativa en la rutina habitual. El asunto planteado supone un problema menor ya que, en caso de no seguir la recomendación del fabricante, los posibles Zonas Grises resultantes (falsos positivos) serían detectados con la repetición de los positivos, al menos de los que tuvieran un valor inferior a 15 fmol/L. Por otra parte, la probabilidad de que esto suceda la circunstancia señalada (procesamiento de Ag VHC inmediatamente después de un Anti-VHC positivo) parece muy baja. En caso de situaciones de urgencia (trasplantes) fuera de la rutina diaria, ya se habrá hecho el mantenimiento al final de la jornada y el procesamiento por duplicado de la determinación de Ag VHC permitirá valorar adecuadamente el resultado de la prueba. En todo caso en esa tanda se habrá procesado también el Anti-VHC y se conocerá su resultado.

- El intervalo de resultados en Zona Gris que obliga a la repetición de la prueba para ver si el resultado se mantiene o modifica. Esta circunstancia es poco frecuente y fácilmente aclarable, pero puede suponer un problema en el caso de los donantes de órganos. En realidad supondría un pequeño retraso en el resultado definitivo, que creemos que no resta valor a la prueba.
- El precio de la determinación es todavía alto, lo que afecta a su implementación en el cribado rutinario. No obstante, hay que tener en cuenta que evitaría muchas determinaciones de Anti-VHC y de RIBA o LIA.

A pesar de los aspectos mejorables señalados, creemos que la técnica es útil en el diagnóstico de la infección por VHC, ya que, además de poder ser aplicada en situaciones rutinarias de cribado, permite detectar situaciones de infección durante el periodo de ventana, en pacientes con inmunodeficiencia o inmunosuprimidos, en pacientes inmunotolerantes y diferenciar infección actual de infección pasada. En todas estas situaciones supera con claridad al Anti-VHC. Además, la técnica de Ag VHC permite obtener resultados de forma rápida, es automatizable y aplicable a situaciones de urgencia.

Las limitaciones que pueden suponer su falta de sensibilidad en pacientes con carga viral menor a cuatro logaritmos, las Zonas Grises o los falsos positivos son fáciles de solucionar.

Creemos que la técnica de Ag VHC puede jugar un papel similar al del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en el cribado rutinario y en el diagnóstico de la hepatitis C, y muy especialmente en centros donde no se han introducido las técnicas de biología molecular.

6.- Conclusiones

1. La técnica del Ag VHC es apta para cribado rutinario, ya que permite diagnosticar infección actual.
2. La aplicación de la técnica del Ag VHC nos ha permitido diagnosticar diversos casos de infecciones por este virus que podrían haber pasado desapercibidas sin aplicación de técnicas de biología molecular, como son casos de infección aguda, en periodo de ventana para Anti-VHC y/o LIA, con inmunotolerancia e inmunodeprimidos.
3. Los resultados en Zona Gris son poco frecuentes, la mayoría de las veces corresponden a verdaderos positivos y aparecen en pacientes con carga viral baja. En todo caso, deben ser confirmados por repetición.
4. La tasa de resultados falsos positivos ha sido muy muy baja, por lo que no afecta a la utilidad de prueba.
5. La técnica puede no ser suficientemente sensible en CV inferiores a 4 logaritmos, pero esta circunstancia solo se es habitual en pacientes tratados.
6. En los pacientes posibles donantes de órganos, la técnica se ha mostrado segura en el diagnóstico de las infecciones VHC: ha detectado todas las infecciones y no ha mostrado ningún falso positivo.
7. Recomendamos un protocolo diagnóstico para diagnóstico de la infección por VHC basado en la detección de Ag VHC, complementado en algunos pacientes, como los hemodializados, con Anti-VHC/LIA.

7.- Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with Hepatitis C infection. Ginebra: OMS; Abril 2014.
2. Simon MA. Epidemiología de la Hepatitis C en España. Jornadas de otoño AEEH en Hepatitis C. II conferencia de consenso del tratamiento de la infección por Virus C. 2014 Nov 21-22, Sevilla. <http://www.javierpazo.com/articulos/aeeh/1.swf>
3. García-Fulgueiras A, García-Pina R, Morant C, García-Ortuzar V, Génova R, Álvarez E. Hepatitis C and Hepatitis B-related mortality in Spain. Eur J Gastroenterol Hepatol 2009; 21: 895-901.
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico. PT-daclatasvir/v1/20022015. Madrid: AEMPS; Febrero 2015.
- 4b. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico. PT-ledipasvir/sofosbuvir/v1/20032015. Madrid: AEMPS; Febrero 2015.

5. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico. PT-simeprevir/v1/01112014. Madrid: AEMPS; Noviembre 2014.
- 5b. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico. PT-ombitasvir/paritaprevir/rito_dasabuvir/v1/20032015. Madrid: AEMPS; Abril 2015.
6. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico. PT-sofosbuvir/V1/01112014. Madrid: AEMPS, Noviembre 2014.
7. Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology* 1975; 69: 1278-1285.
8. Hollinger FB, Mosley JW, Smuress W, Aach RD, Peters RL, Stevens C. Transfusion-transmitted viruses study: experimental evidence for two non-A, non-B, hepatitis agents. *J Infect Dis* 1980; 142: 400-407.
9. Choo QI, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 359-362.
10. Kuo G, Choo GL, Alter HJ, Gitnick GL, Redecker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of a human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
11. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-2455.
- 11b. Henderson L. Threedimensional model of HCV. *Physicians Research Network* 2001; 6.

12. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23: 205-209.
- 12b. Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994; 75: 1755-1760.
13. Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrener P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulates nucleoside triphosphate and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J virol* 1993; 67: 6152-6158.
14. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M. Variable and hypervariable domains are found in the regions of VHC corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.
15. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/> (consultado Noviembre 2014)
16. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1: 564-569.
17. Theodore LS. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus. *Hepatology* 1997; 25: 1285-1286.
18. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017.

19. Manzanares M. Estudio de genética del virus de la hepatitis C en cultivos celulares. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2011; 5: 11-35.
- 19b. Gerold G, Pietschmann T. The HCV Life Cicle: In vitro tissue Culture Systems and Terapeutic Targets. *Dig Dis* 2014; 32: 525-537.
20. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941.
21. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bienasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007; 446: 801-805.
22. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457: 882-886.
23. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009; 83: 2011-2014.
24. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Doffoel M, Royer C, Soulier E, Schvoerer E, Schuster C, Stoll-Keller F, Bartenschlager R, Pietschmann T, Barth H, Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 2007; 46: 1722-1731.
25. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006; 80: 5308-5320.

26. Sourisseau M, Michta ML, Zony C, Israelow B, Hopcraft SE, Narbus CM, Parra Martín A, Evans MJ. Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003244.
27. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, Crota S. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 2008; 82: 8316-8329.
28. Farquhar MJ, Hu K, Harris HJ, Davis C, Brimacombe CL, Fletcher SJ, Baumert TF, Rappoport JZ, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol* 2012; 86: 4305-4316.
29. Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT, Schoggins JW, Catanese MT, Burton DR, Law M, Rice CM, Ploss A. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 2011; 474: 208-211.
30. Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, Vanwolleghem T, Desombere I, Reiser H, Leroux-Roels G. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology* 2008; 48: 1761-1768.
31. Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, Sheahan T, Grzyb K, Cortese R, Rice CM, Leroux-Roels G, Nicosia A. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* 2012; 55: 364-372.
32. Lacek K, Vercauteren K, Grzyb K, Naddeo M, Verhoye L, Słowikowski MP, Fafi-Kremer S, Patel AH, Baumert TF, Folgori A, Leroux-Roels G, Cortese R, Meuleman P, Nicosia A. Novel human SR-BI antibodies prevent infection and dissemination of HCV in vitro and in humanized mice. *J Hepatol* 2012; 57: 17-23
33. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other *Flaviviridae* viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12766-12771.

34. Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M Jr. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 2009; 394: 99-108.
35. Sainz B Jr, Barreto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann- Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012; 18: 281-285.
36. Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 10777-10782.
37. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus ARN replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 2003; 77: 5487-5492.
38. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K.. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76: 5974-5984.
39. Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol* 2013; 87: 10612-10627.
40. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1003056.
41. Quinkert D, Bartenschlager R, Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* 2005; 79: 13594-13605.

42. Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, Farese RV Jr, Ott M. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med* 2010; 16: 1295-1298.
43. Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S, Gentzsch J, Kaderali L, Bartenschlager R, Pietschmann T. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002829.
- 43b. Tereza A. Pathogenesis of hepatitis C: HCV consensus 2007. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: S14-S19.
44. Cuarterolo M, Lopez S, Ciocca M. Infección por virus de la hepatitis C en niños. *Arch Argent Pediatr* 2011; 109: 245-250
45. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-388.
46. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int J Med Sci* 2006; 3: 29-34.
47. Wang C, Srnaow P, Siddiqui A. A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus ARN. *J Virol* 1994; 68: 7301-7307.
48. Wang C, Siddiqui A. Structure and function of the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 203: 99-115.
49. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4942-4946.
50. Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *The*

- International VHC Collaborative Study group. *J Gen Virol* 1995; 76: 1749-1761.
51. Wakita T, Wands JR. Specific inhibition of hepatitis virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence. *J. Biol Chem* 1994; 269: 14205-14210.
 52. Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo QL, Houghton M. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral ARN: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1711-1715.
 53. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994; 68: 3631-3641.
 54. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1067.
 55. Matsuura Y, Suzuki T, Suzuki R, Sato M, Aizaki H, Saito I, Miyamura T. Processing of E1 and E2 glycoproteins of hepatitis C virus expressed in mammalian and insect cells. *Virology* 1994; 205: 141-150.
 56. Ralston R, Thudium K, Berger K, Kuo C, Gervase B, Hall J, Selby M, Kuo G, Houghton M, Choo QL. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 1993; 67: 6753-6761.
 56. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M. Variable and hypervariable domains are found in the regions of VHC corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.

57. Taniguchi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, Munekata E, Muchmore EE, Peterson DA, Mishiro S. A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 195: 297-301.
58. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993; 67: 2832-2843.
59. Lin C, Thomson JA, Rice CM. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol* 1995; 69: 4373-4380.
60. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996; 87: 343-355.
61. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 77-81.
62. Chung RT, Kawashima T, Kaplan LM. Expressed hepatitis C virus NS5B exhibits ARN-dependent ARN polimerasa activity (Abstract). Third International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses Gold Coast 1995.
63. Quer J, Esteban JI, Cos J, Sauleda S, Ocaña L, Martell M, Otero T, Cubero M, Palou E, Murillo P, Esteban R, Guàrdia J. Effect of bottlenecking on evolution of the nonstructural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *J Virol* 2005; 79: 15131-15141.

64. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J. Hepatitis C virus (VHC) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of VHC genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
65. Domingo E, Holland JJ. Mutation rates and rapid evolution of ARN viruses. In: Morse SS, editor. *Evolutionary biology of viruses*. New York: Raven Press 1994; 161-184.
66. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 2006; 439: 344-348.
67. Márquez-Rosales MG, Santoscoy-Tovar FA, Montoya-Fuentes H. Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55: 79-87.
68. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-3188.
69. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A. Classification nomenclature and database development for hepatitis C virus and related viruses: proposals for standardization. *Arch Viral* 1998; 143: 2493-2503.
70. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42; 962-973.
71. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 223-235.

72. Holland PV, Barrera JM, Ercilla MG, Yoshida CF, Wang Y, de Olim GA, Betlach B, Kuramoto K, Okamoto H. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996; 10: 2372-2378.
73. JI Esteban, S Sauleda, J Quer. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 2008; 48: 148-162.
74. Tokita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakata S, Chosa T, Iizuka H, Mishiro S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth and ninth major genetic groups. *Proc Nati Acad Sci USA* 1994; 91: 1122-1126.
75. Echevarría JM, León P, Pozo F, Avellón A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotype in Spain during a nine year period (1996-2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 20-25.
76. Bruggmann P, Berg T, Øvrehus AL, Moreno C, Brandão Mello CE, Roudot-Thoraval F, Marinho RT, Sherman M, Ryder SD, Sperl J, Akarca U, Balık I, Bihl F, Bilodeau M, Blasco AJ, Buti M, Calinas F, Calleja JL, Cheinquer H, Christensen PB, Clausen M, Coelho HS, Cornberg M, Cramp ME, Dore GJ, Doss W, Duberg AS, El-Sayed MH, Ergör G, Esmat G, Estes C, Falconer K, Félix J, Ferraz ML, Ferreira PR, Frankova S, García-Samaniego J, Gerstoft J, Giria JA, Gonçales FL Jr, Gower E, Gschwantler M, Guimarães Pessôa M, Hézode C, Hofer H, Husa P, Idilman R, Kåberg M, Kaita KD, Kautz A, Kaymakoglu S, Krajden M, Krarup H, Laleman W, Lavanchy D, Lázaro P, Marotta P, Mauss S, Mendes Correa MC, Müllhaupt B, Myers RP, Negro F, Nemecek V, Örmeci N, Parkes J, Peltekian KM, Ramji A, Razavi H, Reis N, Roberts SK, Rosenberg WM, Sarmento-Castro R, Sarrazin C, Semela D, Shiha GE, Sievert W, Stärkel P, Stauber RE, Thompson AJ, Urbanek P, van Thiel I, Van Vlierberghe H, Vandijck D, Vogel W, Waked I, Wedemeyer H, Weis N, Wiegand J, Yosry A, Zekry A, Van Damme P, Aleman S, Hindman SJ. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat* 2014; 21: 5-33.

77. Razavi H, Waked I, Sarrazin C, Myers RP, Idilman R, Calinas F, Vogel W, Mendes Correa MC, Hézode C, Lázaro P, Akarca U, Aleman S, Balık I, Berg T, Bihl F, Bilodeau M, Blasco AJ, Brandão Mello CE, Bruggmann P, Buti M, Calleja JL, Cheinquer H, Christensen PB, Clausen M, Coelho HS, Cramp ME, Dore GJ, Doss W, Duberg AS, El-Sayed MH, Ergör G, Esmat G, Falconer K, Félix J, Ferraz ML, Ferreira PR, Frankova S, García-Samaniego J, Gerstoft J, Giria JA, Gonçales FL Jr, Gower E, Gschwantler M, Guimarães Pessôa M, Hindman SJ, Hofer H, Husa P, Kåberg M, Kaita KD, Kautz A, Kaymakoglu S, Krajden M, Krarup H, Laleman W, Lavanchy D, Marinho RT, Marotta P, Mauss S, Moreno C, Murphy K, Negro F, Nemecek V, Örmeci N, Øvrehus AL, Parkes J, Pasini K, Peltekian KM, Ramji A, Reis N, Roberts SK, Rosenberg WM, Roudot-Thoraval F, Ryder SD, Sarmento-Castro R, Semela D, Sherman M, Shiha GE, Sievert W, Sperl J, Stärkel P, Stauber RE, Thompson AJ, Urbanek P, Van Damme P, van Thiel I, Van Vlierberghe H, Vandijck D, Wedemeyer H, Weis N, Wiegand J, Yosry A, Zekry A, Cornberg M, Müllhaupt B, Estes C. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* 2014; 21: 34-59.
78. Pol S, Thiers V, Nousbaum JB, Legendre C, Berthelot P, Kreis H, Brechot C. The changing relative prevalence of hepatitis C virus genotypes: Evidence in hemodialyzed patients and kidney recipients. *Gastroenterology* 1995; 108: 581-583.
79. Brechot C. Hepatitis C virus genetic variability: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S41-S47.
80. Bruno S, Silini E, Crosignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997; 25: 754-758.

81. Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G, Di Bisceglie AM, Vergalla J, Hoofnagle JH, et Sallie R. Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology* 1994; 20: 1405-1411.
82. Benvegnù L, Pontisso P, Cavallo D, Novetta F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997; 211-215.
83. Alonso Alonso P, Orduña A, San Miguel A, Domínguez E, Gutiérrez P, Lorenzo B, Zarzosa P, Angel Bratos M, Rodríguez Torres A. Genotypes of hepatitis C virus; their relationship with risk factors, the severity of liver disease, and the serologic response. *Med Clin* 1998; 110: 681-686.
84. López-Labrador FX, Ampurdanés S, Forns X, Castells A, Sáiz JC, Costa J, Bruix J, Sánchez Tapias JM, Jiménez de Anta MT, Rodés J. Hepatitis C virus (VHC) genotypes in Spanish patients with VHC infection: relationship between VHC genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 27: 959-965.
85. Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Brechot C. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France And Italy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 1995; 122: 161-168.
86. Barnes E, Webster G, Whalley S, Dusheiko G. Predictors of a favorable response to alpha interferon therapy for hepatitis C. *Clin Liver Dis* 1999; 3: 775-791.
87. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10: 553-562.
88. Xia GL, Liua CB, Caoa HL, Bia SL, Zhana MY, Sub CA. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in the general Chinese population: results from a nationwide cross-sectional seroepidemiological study of hepatitis A, B, C, D, and E virus infection in China, 1992. *Intermat Hepatol Commun* 1996; 5: 62-73.

- 88b. Mujeeb SA, Shahab S, Hyder AA. Geographical display of health information: study of hepatitis C infection in Karachi, Pakistan. *Public Health* 2000; 114: 413-415.
89. Law MG, Dore GJ, Bath N, Thompson S, Crofts N, Dolan K, Giles W, Gow P, Kaldor J, Loveday S, Powell E, Spencer J, Wodak A. Modelling hepatitis C virus incidence, prevalence and long-term sequelae in Australia, 2001. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 717-724.
90. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006; 144: 705-714.
91. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS.. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341: 556-562.
92. Abdel-Aziz F, Habib M, Mohamed MK, Abdel-Hamid M, Gamil F, Madkour S, Mikhail NN, Thomas D, Fix AD, Strickland GT, Anwar W, Sallam I. Hepatitis C virus (HCV) infection in a community in the Nile Delta: population description and HCV prevalence. *Hepatology* 2000; 32: 111-115.
93. Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, Fàbregas S, Vega R, Salmerón J, Diago M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M; Spanish Acute HCV Study Group. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol* 2008; 48: 20-27.
94. Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillion JF, Flisiak R, Forns X, Frankova S, Goldis A, Gouli I, Halota W, Hunyady B, Lagging M, Largen A, Makara M, Manolakopoulos S, Marcellin P, Marinho RT, Pol S, Poynard T, Puoti M, Sagalova O, Sibbel S, Simon K, Wallace C, Young K, Yurdaydin C, Zuckerman E,

- Negro F, Zeuzem S. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int* 2011; 31: 30-60.
95. Solà R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardí R, Sunyer J, Covas MI, Marrugat J. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study. *Med Clin (Barc)* 2002; 119: 90-95.
96. Arroyo Fernández A, Carbone Cote MT. Hepatitis C serology: prevalence study in postmortem population. *An Med Interna*. 2006; 23: 260-263.
97. Saiz de la Hoya P, Bedia M, Murcia J, Cebria J, Sanchez-Paya J, Portilla J. Predictive markers of VIH and VHC infection and co- infection among inmates in a Spanish prison. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2005; 23: 53-57.
98. DaCosta M, Yuan Y, Wagner JS, Gilbert J, Lescrauwaet, B, Langley P. The burden of viral hepatitis C in Europe: a propensity analysis of patient outcomes. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2012; 24: 869-877.
99. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538.
100. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R; HCV RESPOND-2 Investigators. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 1207-1217.
101. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341: 556-562.

102. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 1-16.
103. Farrell GC, Weltman M, Dingley J, Lin R. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *Gastroenterol Jpn* 1993; 28 Suppl 5: 32-36.
104. Tanaka E, Kiyosawa K, Sodeyama T, Hayata T, Ohike Y, Nakano Y, Yoshizawa K, Furuta S, Watanabe Y, Watanabe J, Nishioka K. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Japanese schoolchildren: comparison with adult blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 460-464.
105. Cachafeiro S, Del Amo J, Iribarren JA, Salavert Lleti M, Gutiérrez F, Moreno A, Labarga P, Pineda JA, Vidal F, Berenguer J, Moreno S. Cohorts of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS and CoRIS-MD). Decrease in serial prevalence of coinfection with hepatitis C virus among HIV-infected patients in Spain, 1997-2006. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1467-1470.
106. 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: 568-573.
107. Fabrizi F, Martin P, Dixit V, Brezina M, Russell J, Conrad A, Schmid P, Gerosa S, Gitnick G. Detection of de novo hepatitis C virus infection by polymerase chain reaction in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1999; 19: 383-388.
108. Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M, Costantino A, Kondili LA, Menniti-Ippolito F, Caroleo B, Costa C, Griffó G, Loiacono L, Pisani V, Focà A, Piazza M. Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology* 1997; 26: 1006-1011.

109. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171: 1607-1610.
110. Chiaramonte M, Stroffolini T, Lorenzoni U, Minniti F, Conti S, Floreani A, Ntakirutimana E, Vian A, Ngatchu T, Naccarato R. Risk factors in community-acquired chronic hepatitis C virus infection: a case-control study in Italy. *J Hepatol* 1996; 24: 129-134.
111. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000; 355: 887-891.
112. El-Ray A, Romeih M, Saber M. Reuse of disposable variceal injection sclerotherapy needles and risk of hepatitis C virus transmission. *Endoscopy* 2001; 33: 816-817.
113. Bronowicki JP, Venard V, Botté C, Monhoven N, Gastin I, Choné L, Hudziak H, Rihn B, Delanoë C, LeFaou A, Bigard MA, Gaucher P. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med* 1997; 337: 237-240.
114. Esteban JI, Gómez J, Martell M, Cabot B, Quer J, Camps J, González A, Otero T, Moya A, Esteban R, Guardia J. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996; 334: 555-560.
115. Ross RS, Viazov S, Gross T, Hofmann F, Seipp HM, Roggendorf M. Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med* 2000; 343: 1851-1854.
116. Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 1991; 325: 454-460.

117. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77: 214-224.
118. Pérez-Álvarez R, García-Samaniego J, Solá R, Pérez-López R, Bárcena R, Planas R, Cañete N, Manzano ML, Gutiérrez ML, Morano L, Rodrigo L. Acute hepatitis C in Spain: a retrospective study of 131 cases. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104: 21-28.
119. Mitsui T, Iwano K, Masuko K, Yamazaki C, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Mishiro S. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology* 1992; 16: 1109-1114.
120. Polish LB, Tong MJ, Co RL, Coleman PJ, Alter MJ. Risk factors for hepatitis C virus infection among health care personnel in a community hospital. *Am J Infect Control* 1993; 21: 196-200.
121. Lanphear BP. Trends and patterns in the transmission of bloodborne pathogens to health care workers. *Epidemiol Rev* 1994; 16: 437-450.
122. Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of VIH and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control* 1995; 23: 273-277.
123. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, Hollinger FB, Davenny K, Riley L, Diaz C, Tang HB, Quinn TC. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 1998; 177: 1480-1488.
124. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, Alter MJ. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 2005; 192: 1880-1889.

125. Yeung LT, King SM, Roberts EA. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 2001; 34: 223-229.
126. Benova L, Awad SF, DeWolfe F, Abu-Raddad LJ. Estimation of hepatitis C virus infections resulting from vertical transmission in Egypt. *Hepatology* 2015; 61:834-842.
127. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, Hollinger FB, Davenny K, Riley L, Diaz C, Tang HB, Quinn TC. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 1998; 177: 1480-1488.
128. Granovsky MO, Minkoff HL, Tess BH, Waters D, Hatzakis A, Devoid DE, Landesman SH, Rubinstein A, Di Bisceglie AM, Goedert JJ. Hepatitis C virus infection in the mothers and infants cohort study. *Pediatrics* 1998; 102: 355-359.
129. Manzini P, Saracco G, Cerchier A, Riva C, Musso A, Ricotti E, Palomba E, Scolfaro C, Verme G, Bonino F. Human immunodeficiency virus infection as risk factor for mother-to- child hepatitis C virus transmission; persistence of anti-hepatitis C virus in children is associated with the mother's anti-hepatitis C virus immunoblotting pattern. *Hepatology* 1995; 21: 328-332.
130. Kumar RM, Shahul S. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infants of VHC-infected mothers. *J Hepatol* 1998; 29: 191-197.
131. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, Quinn TC. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995; 171: 768-775.
132. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, Gish RG, Busch MP, Reingold AL, Alter MJ. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: The HCV partner study. *Hepatology*, 2013; 57: 881-889.

133. Marincovich B, Castilla J, del Romero J, García S, Hernando V, Raposo M, Rodríguez C. Absence of hepatitis C virus transmission in a prospective cohort of heterosexual serodiscordant couples. *Sex Transm Infect.* 2003; 79: 160-162.
134. Urbanus AT, van Keep M, Matser AA, Rozenbaum MH, Weegink CJ, van den Hoek A, Prins M, Postma MJ. Is Adding HCV Screening to the Antenatal National Screening Program in Amsterdam, The Netherlands, Cost-Effective? *PLoS ONE* 2013; 8: e70319.
135. Danta M, Brown D, Bhagani S, Pybus OG, Sabin CA, Nelson M, Fisher M, Johnson AM, Dusheiko GM. HIV and Acute HCV (HAAC) group. Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *AIDS.* 2007; 21: 983-991.
136. Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: S66-S70.
137. Buscarini E, Tanzi E, Zanetti AR, Savi E, Sbolli G, Civardi G, Di Stasi M, Fornari F, Buscarini L. High prevalence of antibodies to hepatitis C virus among family members of patients with Anti-VHC-positive chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 343-346.
138. van de Laar T, Pybus O, Bruisten S, Brown D, Nelson M, Bhagani S, Vogel M, Baumgarten A, Chaix ML, Fisher M, Gotz H, Matthews GV, Neifer S, White P, Rawlinson W, Pol S, Rockstroh J, Coutinho R, Dore GJ, Dusheiko GM, Danta M. Evidence of a large, international network of HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men. *Gastroenterology* 2009; 136: 1609-1617.
139. Fierer DS, Uriel AJ, Carriero DC, Klepper A, Dieterich DT, Mullen MP, Thung SN, Fiel MI, Branch AD. Liver fibrosis during an outbreak of acute hepatitis C virus infection in HIV infected men: a prospective cohort study. *J Infect Dis* 2008; 198: 683-686.

140. Thomson EC, Fleming VM, Main J, Kleinerman P, Weber J, Eliaho J, Smith J, McClure MO, Karayiannis P. Predicting spontaneous clearance of acute hepatitis C virus in a large cohort of HIV-1 infected men. *Gut* 2011; 60: 837-845.
141. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechtler M, Backmund M, Pape GR. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125: 80-88.
142. Morishima C, Gretch DR. Clinical use of hepatitis C virus test for diagnosis and monitoring during therapy. *Clin Liver Dis* 1999; 3: 717-740.
143. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: antigens, antibodies and viral genomes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 1031-1048.
144. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2012; 55: S43-S48.
145. European association for the study of the liver: EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J hepatol* 2011, 55: 245-264.
146. Roberts EA YL. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002; 40: 4407-4412.
147. Di Domenico C, Di Giacomo C, Marinucci G, Di Paolo A. Vertical transmission of HCV infection: prospective study in infants born to HIV-1 seronegative women. *Ig Sanita Pubbl* 2006; 62: 129-42.
148. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for disease control and prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003; 52: 1-13.
149. Gertch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 43S-47S.

150. Busch MP, Korelitz JJ, Kelinman SH, Lee SR, AuBochon JP, Schreiber GB. Declining value of alanine aminotransferase in screening of blood donors to prevent transfusion hepatitis B and C virus infection. The Retrovirus Epidemiol Donor Study Transfusion 1995; 35: 903-910.
151. Alter MJ. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. Hepatology 1992; 15: 350-353.
152. Bonacini M, Lin HJ, Hollinger FB. Effect of coexisting HIV-1 infection on the diagnosis and evaluation of hepatitis C virus. J Acquir Immune Defic Syndr 2001; 26: 340-344.
153. George SL, Gebhardt J, Klinzman D, Foster MB, Patrick KD, Schmidt WN, Alden B, Pfaller MA, Stapleton JT. Hepatitis C virus viremia in HIV-infected individuals with negative HCV antibody tests. J Acquir Immune Defic Syndr 2002; 31: 154-162.
154. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, Lee SR. Improved detection of Anti-VHC in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. Vox Sang 1995; 68: 15-18.
155. Corouge AM PJ. Transfusion-transmited viral infections. Retrovirus and viral hepatitis working groups of the French Society of blood transfusion. N Engl J Med 1996; 335: 1198-1202.
156. Kao JH, Lai MY, Hwang YT, Yang PM, Chen PJ, Sheu JC, Wang TH, Hsu HC, Chen DS. Chronic Hepatitis C without anti-hepatitis C antibodies by second generation assay: a clinicopathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. Dig Dis Sci 1996; 41: 161-165.
157. Pawlotsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, Darthuy F, Remire J, Duval J, Buffet C, Etienne JP, Dhumeaux D, Dussaix E. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. J Clin Microbiol 1997; 35: 1734-1739.

158. Seiskari T, Horsti J, Aittoniemi J. The value of HCV antigen test with reference to PCR in confirming infection in cases with indefinite antibody test result. *J Clin Virol* 2011; 51: 90-91.
159. Sagnelli E, Coppola N, Marrocco C, Covello G, Rossi G, Battaglia M, Sagnelli C, Messina V, Tonziello A, Scolastico C, Filippini P. Diagnosis of hepatitis C virus related acute hepatitis by serial determination of IgM Anti-VHC titres. *J Hepatol* 2005; 42: 646-651.
160. Yuki N, Hayashi N, Ohkawa K, Hagiwara H, Oshita M, Katayama K, Sasaki Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. The significance of immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 402-406.
161. Benito R, Barrao F, Ramirez de Ocáriz I, Ducons J, Gil J, Barrao ME, Oscariz J, Rubio MC. IgM Anti-VHC en hepatitis crónica C (HCC) frecuencia y comportamiento tras el tratamiento con interferón. VI congreso de la SEIMC Libro de Comunicaciones 1994: 136, 314.
162. Kang SM, Rhee JK, Kim EJ, Han KH, Oh JW. Bacterial cell surface display for epitope mapping of hepatitis C virus core antigen. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 226: 347-353.
163. Peterson J, Green G, Iida K, Caldwell B, Kerrison P, Bernich S, Aoyagi K, Lee SR. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative "window" phase of hepatitis C infection. *Vox Sang* 2000; 78: 80-85.
164. Hijikata M, Shimizu YK, Kato H, Iwamoto A, Shih JW, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol* 1993; 67: 1953-1958.
165. Grant PR, Sims CM, Tedder RS. Quantification of VHC ARN levels and detection of core antigen in donations before seroconversion. *Transfusion* 2002; 42: 1032-1036.

166. Nübling CM, Unger G, Chudy M., Raia S. Lower J. Sensitivity of VHC core antigen and VHC ARN detection in the early infection phase. *Transfussion*.2002; 42: 1037-1045.
167. Muerhoff AS, Jiang L, Shah DO, Gutierrez RA, Patel J, Garolis C, Kyrk CR, Leckie G, Frank A, Stewart JL, Dawson GJ. Detection of VHC core antigen in human serum and plasma with an automated chemiluminiscent immunoassay. *Transfussion* 2002; 42: 349-356.
168. Tanaka T, Lau JY, Mizokami M, Orito E, Tanaka E, Kiyosawa K, Yasui K, Ohta Y, Hasegawa A, Tanaka S, Kohara M. Simple fluorescent enzyme immunoassay for detection and quantification of hepatitis C viremia. *J Hepatol* 1995; 23: 742-745.
169. Couroucé AM, Le Marrec N, Bouchardieu F, Razer A, Maniez M, Laperche S, Simon N. Efficacy of VHC core antigen detection during the pre-seroconversion period. *Transfussion* 2000; 40: 1198-1292.
170. Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, de Luigi C, Crovari P. Novel approach to reduce the hepatitis C virus VHC window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for VHC core antigen. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3110-3114.
171. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S.. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1802-1808.
172. Tillmann HL. Hepatitis C virus core antigen testing: Role in diagnosis, disease monitoring and treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6701-6706.
173. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beacourt S, Larderie P, Blat L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann AU, McHutchison JG, Pawlotsky JM. Clinical utility of total VHC core antigen quantification: a new indirect marker of VHC replication. *Hepatology* 2002; 36: 211-218.

174. Veillon P, Payan C, Picchio G, Maniez-Montreuil M, Guntz P, Lunel F. Comparative evaluation of the total hepatitis C virus core antigen, branched-DNA, and amplicor monitor assays in determining viremia for patients with chronic hepatitis C during interferon plus ribavirin combination therapy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3212-3220.
175. Mederacke I, Wedemeyer H, Ciesek S, Steinmann E, Raupach R, Wursthorn K, Manns MP, Tillmann HL. Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV-core antigen assay. *J Clin Virol* 2009; 46: 210-215.
176. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1161-1168.
177. Cividini A, Cerino A, Muzzi A, Furione M, Rebucci C, Segagni L, Gatti M, Barnaba V, Mondelli MU. Kinetics and significance of serum hepatitis C virus core antigen in patients with acute hepatitis C. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2144-2146.
178. Tillmann HL, Anderas J, Glomb I, Picchio G, Manns MP. Correlation between VHC core Ag and VHC-ARN levels using different commercial assay. *Journal of Hepatology* 2003; 38: 177.
179. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1554-1568.
180. Maynard M, Pradat P, Berthillon P, Picchio G, Voirin N, Martinot M, Marcellin P, Trepo C. Clinical relevance of total VHC core antigen testing for hepatitis C monitoring and predicting patients response to therapy. *J Viral Hepat* 2003; 10: 318-323.
181. Rebucci C, Cerino A, Cividini A, Timo L, Furione M, Mondelli MU. Monitoring response to antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C virus infection by a core-antigen assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3881-3884.

182. Pradat P, Maynard M, Buti M, Berthillon P, Picchio G, Tillmann HL, Wiegand J, Voirin N, Manns MP, Esteban JI, Martinot M, Marcellin P, Trepo C. The predictive value of core antigen for the management of hepatitis C patients receiving pegylated interferon/ribavirin treatment. *J Med Virol* 2004; 73: 392-396.
183. González V, Padilla E, Diago M, Giménez MD, Solà R, Matas L, Montoliu S, Morillas RM, Pérez C, Planas R. Total VHC core antigen correlates with VHC ARN, and predicts sustained virological response (SVR) to peginterferon α 2-A (PEG-IFN) and ribavirin (RIB) therapy in chronic hepatitis C (CHC). *J Hepatol* 2005; 42: 481-487.
184. Lunel F, Veillon P, Fouchard-Hubert I, Loustaud-Ratti V, Abergel A, Silvain C, Rifflet H, Blanchi A, Causse X, Bacq Y, Payan C; Fontevraud Study Group. Antiviral effect of ribavirin in early non-responders to interferon monotherapy assessed by kinetics of hepatitis C virus ARN and hepatitis C virus core antigen. *J Hepatol* 2003; 39: 826-833.
185. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon α -2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965.
186. Buti M, Valdes A, Sanchez-Avila F, Esteban R, Lurie Y. Extending combination therapy with peginterferon α -2b plus ribavirin for genotype 1 chronic hepatitis C late responders: a report of 9 cases. *Hepatology* 2003; 37: 1226-1227.
187. Lunel F, Pivert A, Payan C. Comparison of VHC ARN and VHC core antigen kinetics in the follow up of the therapeutic protocol in VHC-VIH co-infected patients (RIBAVIC). *J Hepatol* 2004; 40: 144-145.
188. Ji W, Kim DS, Jung SW, Yu YD, Suh SO. Pre-emptive therapy for the cytomegalovirus infection after liver transplantation in endemic areas and its optimal diagnostic method. *Transplant Proc* 2013; 45: 3065-3068.

189. Marchetti S, Santangelo R, Manzara S, D'onghia S, Fadda G, Cattani P. Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants. *New Microbiol* 2011; 34: 157-164.
190. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 408-411.
191. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013, 62: 362-365.
192. Klevens RM, Miller J, Vonderwahl C, Speers S, Alelis K, Sweet K, Rocchio E, Poissant T, Vogt TM, Gallagher K. Population-based surveillance for hepatitis C virus, United States, 2006-2007. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1499-1502.
193. Moorman AC, Gordon SC, Rupp LB, Spradling PR, Teshale EH, Lu M, Nerenz DR, Nakasato CC, Boscarino JA, Henkle EM, Oja-Tebbe NJ, Xing J, Ward JW, Holmberg SD. Chronic Hepatitis Cohort Study Investigators. Baseline characteristics and mortality among people in care for chronic viral hepatitis: The Chronic Hepatitis Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 40-50.
194. Rein DB, Wagner D, Brown KL. Hepatitis C antibody testing and follow-up in primary care settings: a retrospective study of four large, primary care service centers. Programs and abstracts of the National Summit on HIV and Viral Hepatitis Diagnosis, Prevention and Access to Care 2012, November 26-28, Washington, DC.
195. McGibbon E, Bornschlegel K, Balter S. Half a diagnosis: gap in confirming infection among hepatitis C antibody-positive patients. *Am J Med* 2013; 126: 718-722.
196. Thio CL, Nolt KR, Astemborski J, Vlahov D, Nelson KE, Thomas DL. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 575-577.

197. Bryan Cobb, Gabrielle Heilek, Regis A Vilchez. Molecular diagnostics in the management of chronic hepatitis C: key considerations in the era of new antiviral therapies. *Infectious Diseases* 2014, 14: S8 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/S5/S8>. (Consultado Noviembre 2014)
198. Davis GL. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med* 1999; 107: S21-S26.
199. Lee JH, Roth WK, Zeuzem S. Evaluation and comparison of different hepatitis C virus genotyping and serotyping assays. *J Hepatol* 1997; 26: 1001-1009.
200. Pawlotsky JM. Use and interpretation of Virological Tests for Hepatitis C. *Hepatol* 2002; 36: S65-S73.
201. Bouchardou F, Cantaloube JF, Chevaliez S, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, Pawlotsky JM, De Micco P, Laperche S.. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1140-1145.
202. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD. Liver biopsy. *Hepatology* 2009; 49: 1017-1044.
203. Strader DR, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. AASLD Practice Guidelines: Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-1171.
204. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007; 47: 598-607.
205. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.
206. Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1670-1681.

- 206b. Documento del II Consenso español sobre tratamiento de la hepatitis C. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid, Abril 2015.
207. Martinez SM, Crespo G, Navasa M, Forns X. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 325-335.
208. Sandrin L1, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol.* 2003; 29: 1705-1713.
209. Carrion JA. Utility of Fibroscan in the evaluation of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 32: 415-423.
210. Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54.
211. Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. *J Hepatol.* 2008; 48: 835-847.
212. Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, Ziol M, Wendum D, Chazouillères O, de Lédinghen V, Dhumeaux D, Marcellin P, Beaugrand M, Poupon R. Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology* 2006; 43: 1118-1124.
213. Carrión JA, Torres F, Crespo G, Miquel R, García-Valdecasas JC, Navasa M, Forns X. Liver stiffness identifies two different patterns of fibrosis progression in patients with hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Hepatology* 2010; 51: 23-34.
214. Carrión JA, Navasa M, Buti M, Torras X, Xiol X, Vergara M, Planas R, Solà R, Forns X. Hepatic elastography. Position paper of the Catalan Society of Gastroenterology *Gastroenterol Hepatol* 2011; 34: 504-510.

215. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut* 2007; 56: 968-973.
216. Cordero-Ruiz P, Carmona-Soria I, Caunedo-Álvarez A, Herreras-Gutiérrez J.M, Vilches-Arenas A. Impacto del tratamiento combinado en la historia natural de la hepatitis C. *Revista Andaluza de Patología Digestiva Online* 2013; 36: 2.
217. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-344.
218. Spiegel BM, Younossi ZM, Hays RD, Revicki D, Robbins S, Kanwal F. Impact of hepatitis C on health related quality of life: A systematic review and quantitative assessment. *Hepatology* 2005; 41: 790-800.
219. Rodger AJ, Jolley D, Thompson SC, Lanigan A, Crofts N. The impact of diagnosis of hepatitis C virus on quality of life. *Hepatology* 1999; 30: 1299-1301.
220. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 2000; 132: 296-305.
221. Poynard, T, Bedossa, P, Opolon, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINICIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-832
222. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999; 340: 1228-1233.
223. Levine RA, Sanderson SO, Ploutz-Snyder R, Murray F, Kay E, Hegarty J, Nolan N, Kelleher D, McDonald G, O'Keane JC, Crowe J. Assessment of fibrosis progression in untreated irish women with chronic hepatitis C

- contracted from immunoglobulin anti-D. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1271-1277.
224. Bonkovsky HL, Banner BF, Rothman AL. Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997; 25: 759-768.
225. Pietrangelo A. Hemochromatosis gene modifies course of hepatitis C viral infection. *Gastroenterol* 2003; 124: 1509-1523.
226. Guyader D, Thirouard AS, Erdmann L, Rakba N, Jacquelinet S, Danielou H, Perrin M, Jouanolle AM, Brissot P, Deugnier Y. Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007; 46: 587-595.
227. Bréchot C1, Jaffredo F, Lagorce D, Gerken G, Meyer zum Büschenfelde K, Papakonstantinou A, Hadziyannis S, Romeo R, Colombo M, Rodes J, Bruix J, Williams R, Naoumov N. Impact of VHB, VHC and GBV/HGV on hepatocellular carcinoma in Europe. Results of a European concerted action. *J Hepatol* 1998; 29: 173-183.
228. Hu KQ, Tong, MJ. The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus- related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology* 1999; 29: 1311-1316.
229. Planas R, Ballesté B, Alvarez MA, Rivera M, Montoliu S, Galeras JA, Santos J, Coll S, Morillas RM, Solà R. Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. *J Hepatol* 2004; 40: 823-830.
230. Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic VHC infection. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007; 16: 65-73.
- 230b. Restrepo JC, Toro AI. Hepatitis C. *Medicina & Lab* 2011; 17: 9-11.
231. Aguilera V, Berenguer M. Virus de la hepatitis y fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 402-414.

232. Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. The Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* 1997; 26: 485-490.
233. Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: S21-S28.
234. García-Samaniego J, Soriano V, Castilla J, Bravo R, Moreno A, Carbó J, Iñiguez A, González J, Muñoz F. Influence of hepatitis C virus genotypes and VIH infection on histological severity of chronic hepatitis C. The Hepatitis/VIH Spanish Study Group. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1130-1134.
235. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341: 22-26.
236. Soto B, Sánchez-Quijano A, Rodrigo L, del Olmo JA, García-Bengoechea M, Hernández-Quero J, Rey C, Abad MA, Rodríguez M, Sales Gilabert M, González F, Mirón P, Caruz A, Relimpio F, Torronteras R, Leal M, Lissen E. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1-5.
237. Feld JJ, Liang TK. Hepatitis C Identifying Patients with Progressive Liver Injury. *Hepatology* 2006; 43: 194-206.
238. Harris DR, Gonin R, Alter HJ, Wright EC, Buskell ZJ, Hollinger FB, Seeff LB; National Heart, Lung, Blood Institute Study Group. The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med* 2001; 134: 120-124.
239. Ostapowicz G, Watson KJR, Locarnini SA, Desmond PV. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1998; 27: 1730-1735.

240. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Martinot-Peignoux M, Degott C, Valla D, Erlinger S, Rueff B. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus ARN and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27: 1717-1722.
241. Pessione F, Degos F, Marcellin P, Duchatelle V, Njapoum C, Martinot-Peignoux M, Degott C, Valla D, Erlinger S, Rueff B. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 63-71.
242. Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158: 1473-1481.
243. Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, Cuccia MC, Gusberti L, Tinelli C, Cividini A, Bruno S, Salvaneschi L, Ideo G, Mondelli MU, Silini EM. Human leukocyte antigen class II and III alleles and severity of hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1999; 29: 1272-1279.
244. Morillas RM. Monitorización y biopsia. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 121-24.
245. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 216-230.
246. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355.
247. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 225-230.

248. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS, IDEAL Study Team. *N Engl J Med* 2009; 361: 580-593.
249. Miles SA, McGratten M. Persistent panhypogammaglobulinemia after CHOP-Rituximab for HIV-related lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 247-248.
250. Ruiz-Sancho A, Soriano V. HIV and HCV Coinfection. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* 2006; 24: 335-345.
251. Manns M, McHutchison JG, Gordorn S, Rustgi V, Lee MV, Ling ML. Pegylated interferon alpha 2b (PEG IFN) plus ribavirin (R) for treatment of chronic hepatitis C: Optimization of ribavirin dose. *J Hepatol* 2001; 34: 236-236.
252. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon α -2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-982.
253. Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-García J, Lazzarin A, Carosi G, Sasadeusz J, Katlama C, Montaner J, Sette H Jr, Passe S, De Pamphilis J, Duff F, Schrenk UM, Dieterich DT; APRICOT Study Group. Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection in HIV-infected Patients. *N Engl J Med* 2004. 351: 438-450.
254. Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A, Morand P, Goujard C, Pialoux G, Piroth L, Salmon-Céron D, Degott C, Cacoub P, Perronne C; ANRS HCO2 RIBAVIC Study Team.. Pegylated Interferon Alfa-2b Vs Standard Interferon Alfa-2b, Plus Ribavirin, for Chronic Hepatitis C in HIV-infected Patients: a Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2004. 292: 2839-2848.

255. Castellano G. Tratamiento de la hepatitis crónica C: Optimización. Revista de la ACAD. 2007; 23: 191-195.
256. Lindsay KL. Introduction to therapy of hepatitis C. Hepatology 2002; 36: S114-S120.
257. Bruno S, Stroffolino T, Bollani S, Benvengù L, Persico M, Ascione A. Long term outcome of patients with VHC-related Child's class A cirrhosis treated with interferon alpha (IFN). The impact of sustained virologic response (SVR) on hepatocellular carcinoma (HCC) occurrence and mortality. Program and abstract of the 56th Annual Meeting of the American Hepatology 2005; 42: 229A-230A.
258. Zeuzem S. Heterogeneous virologic response rates to interferonbased therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? Ann Intern Med 2004; 40: 370-381.
259. Hosogaya S, Ozak Y, Enomoto N, Akahane Y. Analysis of prognostic factors in therapeutic responses to interferon in patients with chronic hepatitis C. Transl Res 2006; 148: 79-86.
260. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon α -2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med. 1998; 339: 1485-1492.
261. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). Lancet 1998; 353: 1426-1432.
262. Kogure T, Ueno Y, Fukushima K, Nagasaki F, Kondo Y, Inoue J, Matsuda Y, Kakazu E, Yamamoto T, Onodera H, Miyazaki Y, Okamoto H, Akahane T, Kobayashi T, Mano Y, Iwasaki T, Ishii M, Shimosegawa T.

- Pegylated interferon plus ribavirin for genotype 1b chronic hepatitis C in Japan. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7225-7230.
263. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon α -2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1666-1672.
264. Idrees M, Riazuddin S. A study of best positive predictors for sustained virologic response to interferon alpha plus ribavirin therapy in naïve chronic hepatitis C patients. *BMC Gastroenterol* 2009; 9: 5.
265. Poynard T, Colombo M, Bruix J, Schiff E, Terg R, Flamm S, Moreno-Otero R, Carrilho F, Schmidt W, Berg T, McGarrity T, Heathcote EJ, Gonçales F, Diago M, Craxi A, Silva M, Bedossa P, Mukhopadhyay P, Griffel L, Burroughs M, Brass C, Albrecht J; Epic Study Group. Peginterferon α -2b and Ribavirin: Effective in patients with hepatitis C who failed Interferon- α /Ribavirin therapy. *Gastroenterology* 2009; 136: 1618-1628.
266. Romero-Gómez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, Corpas R, Cruz M, Grande L, Vázquez L, Muñoz-De-Rueda P, López-Serrano P, Gila A, Gutiérrez ML, Pérez C, Ruiz-Extremera A, Suárez E, Castillo J. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636-641.
267. Hoofnagle JH, Wahed AS, Brown RS, Howell CD, Belle SH. Early Changes in Hepatitis C Virus (VHC) Levels in Response to Peginterferon and Ribavirin Treatment in Patients with Chronic VHC Genotype 1 Infection. *J Infect Dis* 2009; 199: 1112-1120.
268. Hsu CS, Liu CH, Liu CJ, Chen CL, Lai MY, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. Factors affecting early viral load decline of Asian chronic hepatitis C patients receiving pegylated interferon plus ribavirin therapy. *Antivir Ther* 2009; 14: 45-54.

269. Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J. High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 639-644.
270. Jeffers LJ, Cassidy W, Howell CD, Hu S, Reddy KR. Peginterferon α -2a (40 kd) and ribavirin for black American patients with chronic VHC genotype 1. *Hepatology* 2004; 39: 1702-1708.
271. Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG. Peginterferon α -2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non Hispanic whites. *N Engl J Med* 2004; 350: 2265-2271.
272. Lichtenstein GR. Genetic Variation in Interleukin-28B predicts Hepatitis C Treatment-Induced Viral Clearance in Genotype 1 Patients: the Dawn of a new era? *Gastroenterology* 2010; 138: 2546-2554.
273. Rauch A, Katalik Z, Descombes P, Cai T, Di Julio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirscher B, Malinvern R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study; Swiss HIV Cohort Study. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-Wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338-1345.
274. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nature Genetics*. 2009; 41: 1100-1104.
275. Ahlenstiel G, Booth D, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol*. 2010; 45: 903-910.
276. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison

- JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461, 399-401.
277. Montes-Cano MA1, García-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. Interleukin-28B Genetic Variants and Hepatitis Virus Infection by Different Viral Genotypes. *Hepatology* 2010; 52: 33-37.
278. Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *Journal of hepatology* 2011; 55: 692-701.
279. Clark PJ, Thompson AJ. Host genomics and HCV treatment response. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27: 212-222.
280. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 138: 447-462.
281. Kieffer TL, Kwong, AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J. Antimicrob. Chemother* 2010; 65: 202- 212
282. Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol* 2012; 26: 487-503.
283. Poveda E, Soriano V. Drug resistance testing in hepatitis C therapy. *Future Virol* 2012; 7: 1-13.
284. Barnard RJ, Howe JA, Ogert RA, Zeuzem S, Poordad F, Gordon SC, Ralston R, Tong X, Sniukiene V, Strizki J, Ryan D, Long J, Qiu P, Brass CA, Albrecht J, Burroughs M, Vuocolo S, Hazuda DJ.. Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical trials. *Virology* 2012; 444: 329-336.
285. Ogert RA, Howe JA, Vierling JM, Kwo PY, Lawitz EJ, McCone J, Schiff ER, Pound D, Davis MN, Gordon SC, Ravendhran N, Rossaro L, Jacobson IM, Ralston R, Chaudhri E, Qiu P, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Barnard RJ, Hazuda DJ, Howe AY. Resistance-associated

- amino acid variants associated with boceprevir plus pegylated interferon-2b and ribavirin in patients with chronic hepatitis C in the SPRINT-1 trial. *Antivir Ther* 2013; 18: 387-397.
286. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* 2011; 55: 192-206.
287. Poveda E, García F. Telaprevir resistance. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2013; 31: 26-32.
288. Lenz O, Vijgen L, Berke JM, Cummings MD, Fevery B, Peeters M, De Smedt G, Moreno C, Picchio G .Virologic response and characterization of HCV genotype 2-6 in patients receiving TMC435 (study TMC435-C202). *J Hepatol* 2013; 58: 445-451.
289. De Nicola, S, Aqhemo A. Second wave anti-HCV protease inhibitors. Too little too late? *Liver Int* 2014; 34: 168-170.
290. Manns M, Vierling JM, Bacon BR. High sustained viral response at 12- and 24-week follow-up of MK-5172 with pegylated interferon alfa-2b and ribavirin in HCV genotype 1 treatment-naïve non-cirrhotic patients. In: 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL 2013), 24-28 April, 2013, Amsterdam, Netherlands.
291. Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges A, Dierynck I, Spanks J, Dorrian J, Jiang M, Adiwijaya B, Ghys A, Beumont M, Kauffman RS, Adda N, Jacobson IM, Sherman KE, Zeuzem S, Kwong AD, Picchio G. Hepatitis C Viral evolution in genotype 1 treatment-naïve and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy clinical trials. *PLoS One* 2012; 7: e34372.
292. Treviño A, de Mendoza C, Parra P, Rodríguez C, Madejón A, Plaza Z, del Romero J, Poveda E, Soriano V. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against hepatitis C virus (HCV) in newly diagnosed HIV/HCV-coinfected patients in Spain. *Antivir Ther* 2011; 16, 413-416.

293. Trimoulet P, Belzunce C, Faure M, Wittkop L, Reigadas S, Dupon M, Ragnaud JM, Fleury H, Neau D. HCV protease variability and anti-HCV protease inhibitor resistance in HIV/HCV-coinfected patients. *HIV Med* 2011; 12: 506-509.
294. Lenz O, Fevery B, Vijgen A. TMC-435 in patients infected with HCV genotype 1 who failed previous pegylated interferon/ribavirin treatment: virologic analyses of the ASPIRE trial. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2013 Abril 18-22, Barcelona, España. (Abstract 1329).
295. Fabrycki J, Patel D, Yang G. Characterization of HCV NS3 protease variants from patients enrolled in a 28-day phase 2a trial of ACH-1625 daily dosing plus pegIFN-alpha 2a/RBV. 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2013 Abril 18-22, Barcelona, España. (Abstract 1182).
296. Berger KL, Lagacé L, Triki I, Cartier M, Marquis M, Lawetz C, Bethell R, Scherer J, Kukolj G. Viral resistance in hepatitis C genotype-1 infected patients receiving the NS3 protease inhibitor faldaprevir (BI 2011335) in a phase 1b multiple rising-dose study. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4928-4936.
297. Jacobson I, Dore G, Foster G. Simeprevir (TMC435) with peginterferon / ribavirin for treatment of chronic HCV genotype 1 infection in treatment-naïve patients: efficacy in difficult-to-treat patient sub-population in the QUEST-1 and 2 Phase III trials. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. 2013 Noviembre 1-5, Washington DC, USA. (Abstract 1122).
298. De Luca A, Di Giambenedetto S, Prosperi M, Lo Presti A, Torti C, Caudai C, Vicenti I, Saladini F, Almi P, Grima P, Blanc P, Fabbiani M, Rossetti B, Gagliardini R, Cicozzi M, Zazzi M. Two distinct HCV genotype 1a clades: geographical distribution and association with natural resistance mutations to HCV NS3/4A inhibitors. *Antivir Ther* 2013; 18: A47.

299. Pickett BE, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J. Viral Hepat* 2011; 18: 608-618.
300. Lenz O, Fevery B, Verbinnen T. Resistance analyses of HCV isolates from patients treated with simeprevir in Phase IIB/III studies. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. 2013 Noviembre 1-5, Washington DC, USA. (Abstract 1101).
301. Castellano G. Tratamiento de la hepatitis crónica C: Optimización. *Revista de la ACAD* 2007; 23: 191-195.
302. Bruguera M, Bañares R, Córdoba J, Jardí R, González Lahoz J, Ladero JM, Pajares JM, Segura A. Documento de consenso de la AEHH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 216-230.
303. Trapero M, García L, Moreno R. Optimización del tratamiento de la hepatitis crónica C. En: Esteban R, coordinador. *Hepatitis C guía básica*. Barcelona: Publicaciones Permanyer 2007; 37-59.
304. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 1986; 315: 1575-1578.
305. Fried M. TMC435 in Combination with Peginterferon and Ribavirin in Treatmentnaive HCV Genotype 1 Patients: Final Analysis of the PILLAR Phase IIb Study. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011, San Francisco, CA, USA.
306. Hoofnagle JH, Seef LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2006; 355: 2444-2451.
307. Brillanti S, Garson J, Foli M, Whitby K, Deaville R, Masci C, Miglioli M, Barbara L. A pilot study of combination therapy with ribavirina plus interferon for interferon α -resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 812-817.

308. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon α -2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-1492.
309. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon α -2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 353: 1426-1432.
310. Pau AK, McLaughlin MM, Hu Z, Agyemang AF, Polis MA, Kottilil S. Predictors for hematopoietic growth factors use in VIH/VHC-coinfected patients treated with peginterferon α 2b and ribavirin. *AIDS Patient Care STDS* 2006; 20: 612-619.
311. Lee Brunner A., Ladero Quesada JM, López Alonso G, Devesa Medina MJ, Cuenca Alarcón F, Romero Reina AI. Efectos adversos en el tratamiento antiviral combinado con interferón pegilado y ribavirina en la hepatitis crónica por virus C. Semana de las Enfermedades Digestivas, 2008 Junio 5-8, Sitges, España.
312. Di Bisceglie AM, Ghalib RH, Hamzeh FM, Rustgi VK. Early virologic response after peginterferon alpha-2a plus ribavirin or peginterferon alpha-2b plus ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2007; 14: 721-729.
313. Perrillo R, Rothstein KD, Rubin R, Alam I, Imperial J, Harb G, Hu S, Klaskala W. Comparison of quality of life, work productivity and medical resource utilization of peginterferon alpha 2a vs the combination of interferon alpha 2b plus ribavirin as initial treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004; 11: 157-165.

314. Awad T, Thorlund K, Hauser G, Stimac D, Mabrouk M, Gluud C. Peginterferon alpha-2a is associated with higher sustained virological response than peginterferon α -2b in chronic hepatitis C: systematic review of randomized trials. *Hepatology* 2010; 51: 1176-1184.
315. Ghany M, Strader D, Thomas D, Seeff L. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49: 1335-1374.
316. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Consenso para el tratamiento de las hepatitis B y C. Revista on-line 2006. (consultado 04/11/2014). Disponible <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2006/10/Documento-de-ConsensoVHB-VHC.pdf>.
317. Saiz de la Hoya P, Marco A. Grupo de expertos para las recomendaciones sobre diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C en el medio penitenciario. Recomendaciones de expertos sobre el diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C crónica en el medio penitenciario. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 551-559.
318. Ning Q, Brown D, Parodo J, Cattral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998; 160: 3487-3493.
319. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE.. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an ARN virus mutagen. *Nat Med* 2000; 6: 1375-1379.
320. Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, Perelson, AS. Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature* 2004; 432: 922-924.
321. Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, Rassam S, Fryden A, Reesink H, Bassendine M, Norkrans G, Cuypers T, Lelie N, Telfer P, Watson J, Weegink C, Sillikens P, Weiland O. Ribavirin

- treatment for patients with chronic hepatitis C: Results of a placebocontrolled study. *J Hepatol* 1996; 25: 591-598.
322. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain M, Kleiner DE, Mahaney K, Hoofnagle JH. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1995; 123: 897-903.
323. Bodenheimer HC, Lindsay KL, Davis GL, Lewis JH, Thung SN, Seeff LB. Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: A multicenter trial. *Hepatology* 1997; 26: 473-477.
324. Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, Castera L, Dhumeaux D. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2004; 126: 703-714.
325. Brok J, Gluud LL, Gluud C. Ribavirin monotherapy for chronic hepatitis c infection: a cochrane hepato-biliary group systematic review and metaanalysis of randomized trials. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 842-847.
326. Hoofnagle JH, Ghany MG, Kleiner DE, Doo E. Maintenance therapy with ribavirin in patients with chronic hepatitis C who fail to respond to combination therapy with interferon α and ribavirin. *Hepatology* 2003; 38: 66-74.
327. Bronowicki JP, Ouzan D, Asselah T, Desmorat H, Zarski JP, Foucher J, Bourlière M, Renou C, Tran A, Melin P, Hézode C, Chevalier M, Bouvier-Alias M, Chevaliez S, Montestruc F, Lonjon-Domanec I, Pawlotsky JM. Effect of ribavirin in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon α -2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 131: 1040-1048.
328. Jacobson IM, Brown RS Jr, Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, Santoro J, Becker S, Wakil AE, Pound D, Godofsky E, Strauss R, Bernstein D, Flamm S, Pauly MP, Mukhopadhyay P, Griffel LH, Brass CA; WIN-R Study Group. Weight-based ribavirin dosing increases sustained viral

- response in patients with hepatitis C: final results of the WIN-R study, a US community-based trial. *Hepatology* 2005; 42: 749A.
329. Snoeck E, Wade JR, Duff F, Lamb M, Jorga K. Predicting sustained virological response and anaemia in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon α -2a (40KD) plus ribavirin. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62: 699-709.
330. Jacobson IM, Brown RS Jr, McCone J, Black M, Albert C, Dragutsky MS, Siddiqui FA, Hargrave T, Kwo PY, Lambiase L, Galler GW, Araya V, Freilich B, Harvey J, Griffel LH, Brass CA; WIN-R Study Group. Impact of weight-based ribavirin with peginterferon α -2b in African Americans with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology* 2007; 46: 982-990.
331. Maynard M, Pradat P, Gagnieu MC, Souvignet C, Trepo C. Prediction of sustained virological response by ribavirin plasma concentration at week 4 of therapy in hepatitis C virus genotype 1 patients. *Antivir Ther* 2008; 13: 607-611.
332. Dusheiko G, Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, Rassam S, Fryden A, Reesink H, Bassendine M, Norkrans G, Cuypers T, Lelie N, Telfer P, Watson J, Weegink C, Sillikens P, Weiland O. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: Results of a placebocontrolled study. *J Hepatol* 1996; 25: 591-598.
333. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain M, Kleiner DE, Mahaney K, Hoofnagle JH. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1995; 123: 897-903.
334. Fiel MI, Schiano TD, Guido M, Thung SN, Lindsay KL, Davis GL, Lewis JH, Seeff LB, Bodenheimer HC Jr. Increased hepatic iron deposition resulting from treatment of chronic hepatitis C with ribavirin. *Am J Clin Pathol*. 2000; 113: 35-39
335. Ramos C, Pascual A, Fuentes J, Arazo P, Aguirre JM. Protocolo de seguimiento y tratamiento de la hepatopatía aguda y crónica por el virus

- C en la consulta de la unidad de enfermedades infecciosas. Zaragoza: Hospital Miguel Servet, 2008.
336. Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, Buggisch P, Goeser T, Rasenack J, Pape GR, Schmidt WE, Kallinowski B, Klinker H, Spengler U, Martus P, Alshuth U, Zeuzem S. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon- α -2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 130: 1086-1097.
337. Nelson DR, Rustgi V, Balan V, Sulkowski MS, Davis GL, Muir AJ, Lambiase LR, Dickson RC, Weisner RH, Fiscella M, Cronin PW, Pulkstenis E, McHutchison JG, Subramanian GM. Safety and antiviral activity of albinterferon α -2b in prior interferon nonresponders with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 212-218.
338. Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP; SPRINT-2 Investigators. Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *New Engl J Med* 2011; 364: 1195-1206.
339. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R; HCV RESPOND-2 Investigators. Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *New Engl J Med* 2011; 364: 1207-1217.
340. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, Marcellin P, Muir AJ, Ferenci P, Flisiak R, George J, Rizzetto M, Shouval D, Sola R, Terg RA, Yoshida EM, Adda N, Bengtsson L, Sankoh AJ, Kieffer TL, George S, Kauffman RS, Zeuzem S; ADVANCE Study Team. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *New Engl J Med* 2011; 364: 2405-2416.

341. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Müllhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M; REALIZE Study Team. Telaprevir for Retreatment of HCV Infection. *New Engl J Med* 2011; 364: 2417-2428.
342. Marcellin P, Forns X, Goeser T, Ferenci P, Nevens F, Carosi G, Drenth JP, Serfaty L, De Backer K, Van Heeswijk R, Luo D, Picchio G, Beumont M. Telaprevir Is Effective Given Every 8 or 12 Hours with Ribavirin and Peginterferon Alfa-2a or -2b to Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 459-468.
343. Stedman CA. Current Prospects for Interferon-free Treatment of Hepatitis C in 2012. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 38-45.
344. Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, Nelson DR, Sulkowski MS, Everson GT, Fried MW, Adler M, Reesink HW, Martin M, Sankoh AJ, Adda N, Kauffman RS, George S, Wright CI, Poordad F; ILLUMINATE Study Team. Response-guided Telaprevir Combination Treatment for Hepatitis C Virus Infection. *New Engl J Med* 2011; 365: 1014-1024.
345. Gane E, Di Bisceglie AM, Sulkowski M, Jacobson I, Alves K, Margaret J. Vertex QUAD Therapy Yielded 83-93% SVR with 12 Weeks Duration of Therapy: VX-222/telaprevir in combination with peginterferon-alfa-2a and ribavirin in treatment naive genotype 1 HCV patients treated for 12 weeks: ZENITH study, SVR12 interim analysis. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2012, Taipei, Taiwan.
346. Zeuzem S, Berg T, Gane E, Ferenci P, Foster GR, Fried MW, Hezode C, Hirschfield GM, Jacobson I, Nikitin I, Pockros PJ, Poordad F, Scott J, Lenz O, Peeters M, Sekar V, De Smedt G, Sinha R, Beumont-Mauviel M. TMC435 with Peginterferon and Ribavirin in Treatment-experienced HCV Genotype 1 Patients: The ASPIRE Study, a Randomised Phase IIb Trial. 47th EASL Annual Meeting 2012, Barcelona, Spain.

347. Dieterich D, Asselah T, Guyader D, Berg T, Ceausu E, Pretescu L. SILEN-C3: treatment for 12 or 24 weeks with BI201335 combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin (P/R) in treatment-naive patients with chronic genotype 1 HCV infection. *Hepatology* 2011; 54: 378A
348. Terrault N., Cooper C, Balart L, Larrey D, Box T, Yoshida E. High Sustained Virologic Response (SVR24) Rates with Responseguided Danoprevir (DNV; RG7227) Plus PegIFN A-2a (40KD) and Ribavirin (P/R) in Treatment-naive HCV Genotype 1 (G1) Patients: Results from the ATLAS Study. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2011: San Francisco, CA, USA
349. Bronowicki JP, Pol S, Thuluvath P, Larrey D, Martorell CT, Rustgi VK. Asunaprevir (ASV; BMS-650032), an NS3 Protease Inhibitor, in Combination with Peginterferon and Ribavirin in Treatment-Naive Patients with Genotype 1 Chronic Hepatitis C Infection. 47th EASL Annual Meeting 2012, Barcelona, España.
350. Lawitz E, Poordad F, Kowdley KV, Jensen D, Cohen DE, Siggelkow S. A 12-week Interferon-free Regimen of ABT-450/r, ABT-072, and Ribavirin Was Well Tolerated and Achieved Sustained Virologic Response in 91% Treatment-naive HCV IL28B-CC Genotype-1-infected Subjects. 47th EASL Annual Meeting 2012, Barcelona, España.
351. Summa V, Ludmerer SW, McCauley JA, Fandozzi C, Burlein C, Claudio G, Coleman PJ, Dimuzio JM, Ferrara M, Di Filippo M, Gates AT, Graham DJ, Harper S, Hazuda DJ, Huang Q, McHale C, Monteagudo E, Pucci V, Rowley M, Rudd MT, Soriano A, Stahlhut MW, Vacca JP, Olsen DB, Liverton NJ, Carroll SS. MK-5172, a Selective Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3/4a Protease with Broad Activity across Genotypes and Resistant Variants. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2012; 56: 4161-4167.
352. Nelson D, Lalezari J, Lawitz E, Hassanein T, Kowdley K, Poordad F. Once Daily PSI-9777 Plus pegIFN/RBV in HCV GT1: 98% Rapid

- Virologic Response, Complete Early Virologic Response: PROTON Study. 46th EASL Annual Meeting. 2011, Berlin, Alemania.
353. Lawitz E, Lalezari JP, Hassanein T, Kowdley KV, Poordad FF, Sheikh AM, Afdhal NH, Bernstein DE, Dejesus E, Freilich B, Nelson DR, Dieterich DT, Jacobson IM, Jensen D, Abrams GA, Darling JM, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Sulkowski MS, Bzowej NH, Hyland RH, Mo H, Lin M, Mader M, Hindes R, Albanis E, Symonds WT, Berrey MM, Muir A. Once-daily PSI-7977 Plus peg/RBV in Treatment-naive Patients with HCV GT1: Robust End of Treatment Response Rates Are Sustained Post-treatment. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011: San Francisco, CA, USA.
354. Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Kowdley KV, Nelson DR, Dejesus E, McHutchison JG, Cornpropst MT, Mader M, Albanis E, Jiang D, Hebner CM, Symonds WT, Berrey MM, Lalezari J. Sofosbuvir (GS-7977) Plus Peginterferon/ribavirin in Treatment-naive Patients with HCV Genotype 1: A Randomized, 28-day, Dose-ranging Trial. *J Hepatol* 2012; 58: 663-668.
355. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Ding X, Svarovskaia E, Symonds WT, Hindes RG, Berrey MM. Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir Plus Ribavirin for Hepatitis C. *New Engl J Med*, 2013; 368: 34-44.
356. Pockros PJ, Jensen D, Tsai N, Taylor R, Ramji A, Cooper C, Dickson R, Tice A, Kulkarni R, Vierling JM, Lou Munson M, Chen YC, Najera I, Thommes J; JUMP-C Investigators. First SVR Data with the Nucleoside Analogue Polymerase Inhibitor Mericitabine (RG-7128) Combined with Peginterferon/ribavirin in Treatment-naïve HCV G1/4 Patients: Interim Analysis from the JUMP-C Trial. 46th EASL Annual Meeting. 2011, Berlin, Germany.
357. Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, Ipe D, Morcos PN, Baher L, Najera I, Chu T, Lopatin U, Berrey MM, Bradford W, Laughlin M, Shulman NS, Smith PF. Oral Combination Therapy with a Nucleoside Polymerase Inhibitor (RG7128) and Danoprevir for Chronic Hepatitis C Genotype 1 Infection (IFNORM-1): a Randomised, double-

- blind, placebo-controlled, dose-escalation Trial. *Lancet* 2010; 376: 1467-1475.
358. Feld JJ, Jacobson IM, Jensen DM, Foster GR, Pol S, Tam E, Jablkowski M, Berak H, Vierling JM, Yoshida EM, Perez-Gomez HR, Scalori A, Hooper GJ, Tavel JA, Navarro MT, Shahdad S, Kulkarni R, Le Pogam S, Nájera I, Eng S, Lim CY, Shulman NS, Yetzer ES. Up to 100% SVR4 Rates with Ritonavir-boosted Danoprevir (DNVR), Mericitabine and Ribavirin with or Without Peginterferon α -2a (40KD) in HCV Genotype 1-infected Partial and Null Responders: Results from the MATTERHORN Study. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012, Boston, MA, USA.
359. Poordad F, Lawitz E, DeJesus E, Kowdley KV, Gaultier I, Cohen D, Wangang X, Larsen L, Pilot-Matias T, Koev G, Dumas E, Podsadecki T, Bernstein B. ABT-072 or ABT-333 Combined with Pegylated Interferon/ribavirin after 3-day Monotherapy in HCV Genotype 1 (GT1)-infected Treatment-naive Subjects: 12-week Sustained Virologic Response (SVR12). 47th EASL Annual Meeting 2012, Barcelona, España.
360. Poordad F, Lawitz E, Kowdley KV, Everson GT, Freilich B, Cohen D, Siggelkow S, Heckaman M, Menon R, Pilot-Matias T, Podsadecki T, Bernstein B. 12-week Interferon-free Regimen of ABT-450/r + ABT-333 + Ribavirin Achieved SVR12 in more Than 90% of Treatment-naive HCV Genotype-1- infected Subjects and 47% of Previous Non-responders. 47th EASL Annual Meeting 2012, Barcelona, España.
361. Di Bisceglie AM, Sulkowski M, Gane E, Jacobson IM, Nelson D, DeSouza C, Alves K, George S, Kieffer T, Zhang EZ, Kauffman R, Asmal M, Koziel MJ. VX-222, a non-nucleoside NS5B polymerase inhibitor, in telaprevir-based regimens for genotype 1 hepatitis C virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014; 26: 761-773.
362. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, Langley DR, Sun JH, O'Boyle DR 2nd, Lemm JA,

- Wang C, Knipe JO, Chien C, Colonna RJ, Grasela DM, Meanwell NA, Hamann LG. Chemical Genetics Strategy Identifies an HCV NS5A Inhibitor with a Potent Clinical Effect. *Nature*, 2010; 465: 96-100.
363. Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, Martorell C, Everson GT, Ghalib R, Reindollar R, Rustgi V, McPhee F, Wind-Rotolo M, Persson A, Zhu K, Dimitrova DI, Eley T, Guo T, Grasela DM, Pasquinelli C. Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1. *N Engl J Med* 2012; 366: 216-224.
364. Everson GT, Sims KD, Rodriguez-Torres M. An Interferon-free, Ribavirin-free 12-Week Regimen of Daclatasvir (DCV), Asunaprevir (ASV), and BMS-791325 Yielded SVR4 of 94% in Treatment-Naive Patients with Genotype (GT) 1 Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012, Boston, MA, USA.
365. Sulkowski MS1, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, Reddy KR, Hassanein T, Jacobson I, Lawitz E, Lok AS, Hinestrosa F, Thuluvath PJ, Schwartz H, Nelson DR, Everson GT, Eley T, Wind-Rotolo M, Huang SP, Gao M, Hernandez D, McPhee F, Sherman D, Hindes R, Symonds W, Pasquinelli C, Grasela DM; AI444040 Study Group. High Rate of Sustained Virologic Response with the All-oral Combination of Daclatasvir (NS5a Inhibitor) Plus Sofosbuvir (nucleotide NS5b Inhibitor), with or Without Ribavirin, in Treatment-naive Patients Chronically Infected with HCV GT 1, 2, or 3. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012, Boston, MA, USA.
366. Kowdley, K.V., Lawitz E, Poordad F, Gane EJ, Angus P. A 12-week Interferon-free Treatment Regimen With ABT-450/r, ABT 267, ABT-333, and Ribavirin Achieves SVR12 Rates (Observed Data) of 99% in Treatment-naive Patients and 93% in Prior Null Responders With HCV Genotype 1 Infection. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012: Boston, MA, USA.

367. Nakamoto S, Kanda T, Wu S, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C virus NS5A inhibitors and drug resistance mutations. *World J Gastroenterol WJG*. 2014; 20: 2902-2912.
368. Harvoni, Annex 1, Summarý of characteristics. European Medicines Agency. London, UK. 2014
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003850/WC500177995.pdf (Consultada diciembre 2014).
369. Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, Hyland RH, Ding X, Mo H, Symonds WT, McHutchison JG, Membreño FE. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2014; 383: 515-523.
370. Lawitz, E., Sulkowski MS, Ghalib R, Rodriguez-Torres M, Younossi ZM, Corregidor A, DeJesus E, Pearlman B, Rabinovitz M, Gitlin N, Lim JK, Pockros PJ, Scott JD, Fevery B, Lambrecht T, Ouwerkerk-Mahadevan S, Callewaert K, Symonds WT, Picchio G, Lindsay KL, Beumont M, Jacobson IM. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet*, 2014; 15; 384: 1756-1765.
371. Sulkowski MS, Hezode C, Gerstoft J, Vierling JM, Mallolas J, Pol S, Kugelmas M, Murillo A, Weis N, Nahass R, Shibolet O, Serfaty L, Bourliere M, DeJesus E, Zuckerman E, Dutko F, Shaughnessy M, Hwang P, Howe AY, Wahl J, Robertson M, Barr E., Haber BAI444040 Study Group. Daclatasvir plus sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 211-221.
372. Afdhal N, Zeuzem S, Kwo P, Chojkier M, Gitlin N, Puoti M, Romero-Gomez M, Zarski JP, Agarwal K, Buggisch P, Foster GR, Bräu N, Buti M, Jacobson IM, Subramanian GM, Ding X, Mo H, Yang JC, Pang PS,

- Symonds WT, McHutchison JG, Muir AJ, Mangia A, Marcellin P; ION-1 Investigators. ION-1 Investigators. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2014; 370: 1889-1898.
373. Feld JJ, Kowdley KV, Coakley E, Sigal S, Nelson DR, Crawford D, Weiland O, Aguilar H, Xiong J, Pilot-Matias T, DaSilva-Tillmann B, Larsen L, Podolsky T, Bernstein B. Treatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. *N Engl J Med* 2014; 370: 1594-1603.
374. Poordad F, Hezode C, Trinh R, Kowdley KV, Zeuzem S, Agarwal K, Shiffman ML, Wedemeyer H, Berg T, Yoshida EM, Forns X, Lovell SS, Da Silva-Tillmann B, Collins CA, Campbell AL, Podolsky T, Bernstein B. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *N Engl J Med*. 2014; 370: 1973-1982.
375. Ferenci P, Bernstein D, Lalezari J, Cohen D, Luo Y, Cooper C, Tam E, Marinho RT, Tsai N, Nyberg A, Box TD, Younes Z, Enayati P, Green S, Baruch Y, Bhandari BR, Caruntu FA, Sepe T, Chulanov V, Janczewska E, Rizzardi G, Gervain J, Planas R, Moreno C, Hassanein T, Xie W, King M, Podolsky T, Reddy KR; PEARL-III Study; PEARL-IV Study. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with or without ribavirin for HCV. *N Engl J Med*. 2014; 370: 1983-1992.
- 375b. Forns X, Lawitz E, Zeuzem S, Gane E, Bronowicki JP, Andreone P, Horban A, Brown A, Peeters M, Lenz O, Ouwerkerk-Mahadevan S, Scott J, De La Rosa G, Kalmeijer R, Sinha R, Beumont-Mauviel M. Simeprevir with peginterferon and ribavirin leads to high rates of SVR in patients with HCV genotype 1 who relapsed after previous therapy: a phase 3 trial. *Gastroenterology*. 2014; 146: 1669-1679.
376. Zeuzem S, Dusheiko GM, Salupere R, Mangia A, Flisiak R, Hyland RH, Illeperuma A, Svarovskaia E, Brainard DM, Symonds WT, Subramanian GM, McHutchison JG, Weiland O, Reesink HW, Ferenci P, Hézode C, Esteban R; VALENCE Investigators. VALENCE Investigators. Sofosbuvir

- and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3. *N Engl J Med* 2014; 370: 1993-2001.
377. Jacobson IM, Dore GJ, Foster GR, Fried MW, Radu M, Rafalsky VV, Moroz L, Craxi A, Peeters M, Lenz O, Ouwerkerk-Mahadevan S, De La Rosa G, Kalmeijer R, Scott J, Sinha R, Beumont-Mauviel M. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2014; 384: 403-413.
378. Nelson DR, Cooper JN, Lalezari JP, Lawitz E, Pockros P, Freilich BF, Younes ZH, Harlan W, Ghalib R, Oguchi G, Thuluvath P, Ortiz-Lasanta G, Rabinovitz M, Bernstein D, Bennett M, Hawkins T, Ravendhran N, Sheikh AM, Varunok P, Kowdley KV, Hennicken D, McPhee F, Rana K, and Hughes EA. All-oral 12 week combination with Daclatasvir and Sofosbuvir in patients infected with HCV Genotype 3: ALLY-3 Phase 3 Study. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2014, Boston, MA, USA.
379. Lawitz E, Mangia A, Wyles D, Rodriguez-Torres M, Hassanein T, Gordon SC, Schultz M, Davis MN, Kayali Z, Reddy KR, Jacobson IM, Kowdley KV, Nyberg L, Subramanian GM, Hyland RH, Arterburn S, Jiang D, McNally J, Brainard D, Symonds WT, McHutchison JG, Sheikh AM, Younossi Z, Gane EJ. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2013; 368: 1878-1887.
380. Hézode C, Hirschfield GM, Ghesquiere W, Sievert W, Rodriguez-Torres M, Shafran SD, Thuluvath PJ, Tatum HA, Waked I, Esmat G, Lawitz EJ, Rustgi VK, Pol S, Weis N, Pockros PJ, Bourlière M, Serfaty L, Vierling JM, Fried MW, Weiland O, Brunetto MR, Everson GT, Zeuzem S, Kwo PY, Sulkowski M, Bräu N, Hernandez D, McPhee F, Wind-Rotolo M, Liu Z, Noviello S, Hughes EA, Yin PD, Schnittman S. Daclatasvir plus peginterferon alfa and ribavirin for treatment-naive chronic hepatitis C genotype 1 or 4 infection: a randomised study. *Gut* 2015; 64: 948-956.

381. Ruane PJ, Ain D, Stryker R, Meshrekey R, Soliman M, Wolfe PR, Riad J, Mikhail S, Kersey K, Jiang D, Massetto B, Doehle B, Kirby BJ, Knox SJ, McHutchison JG, Symonds WT. Sofosbuvir plus ribavirin for the treatment of chronic genotype 4 hepatitis C virus infection in patients of Egyptian ancestry. *J Hepatol* 205; 62:1040-1046.
382. AASLD. Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. <http://www.hcvguidelines.org/>; 2014. (Consultado diciembre 2014)
383. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 225-230.
384. Morillas RM. Monitorización y biopsia. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 121-124.
385. Documento de consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: S216-S230.
- 385b. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Plan estratégico para el abordaje de la Hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud. MSSSI: Madrid. Marzo 2015.
386. Registro Español de Trasplante Hepático, memoria de resultados 2013. Organización Nacional de Trasplantes. 2013, Madrid. <http://www.ont.es/infesp/Registros/MEMORIA%20RETH%202013.pdf> (Consultado diciembre 2014).
387. Terrault NA, Khalili M, Straley S, Bollinger K, Bass N, Roberts JP. Efficacy and tolerability of preemptive interferon (IFN) versus ifn plus ribavirin (RBV) treatment in hepatitis C virus (HCV) infected liver transplant recipients. *Hepatology* 2003; 38: 158A-159A.
388. Yao FY, Saab S, Bass NM, Hirose R, Ly D, Terrault N, Lazar AA, Bacchetti P, Ascher NL, Roberts JP. Prediction of survival after liver

- retransplantation for late graft failure based on preoperative prognostic scores. *Hepatology* 2004; 39: 230-238.
389. Hinrichsen H, Benhamou Y, Wedemeyer H, Reiser M, Sentjens RE, Calleja JL, Forns X, Erhardt A, Crönlein J, Chaves RL, Yong CL, Nehmiz G, Steinmann GG.. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a HCV serine protease inhibitor, in hepatitis C, genotype 1 patients. *Gastroenterology* 2004; 127: 1347-1355.
390. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortíz V, Carrasco D, San Juan F, Burgueno MD, Mir J, Berenguer J. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 852-858.
391. Pelletier SJ, Raymond DP, Crabtree TD, Iezzoni JC, Sawyer RG, Hahn YS, Pruett TL. Pretransplantation Hepatitis C virus quasiocies may be predictive of outcome after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 375-381.
392. Markmann JF, Gornbein J, Markowitz JS, Levy MF, Klintmalm GB, Yersiz H, Morrisey M, Drazan K, Farmer DG, Ghobrial RM, Goss J, Seu P, Martin P, Goldstein LI, Busutil RW. A simple model to estimate survival after retransplantation of the liver. *Transplantation* 1999; 67: 422- 430.
393. Broelsch CE, Malago M, Testa G, Gamazo CV. Living donor liver transplantation in adults: Outcome in Europe. *Liver Transplantation* 2000; 6: S64-S65.
394. Bak T, Wachs M, Trotter J, Everson G, Trouillot T, Kugelmas M, Steinberg T, Kam I. Adult-to-adult living donor liver transplantation using right-lobe grafts: Results and lessons learned from a single-center experience. *Liver Transplantation* 2001; 7: 680-686.
395. Malago M, Testa G, Lang H, Valentin C, Hertl M, Gerken G. Living donor liver transplantation: The University of Essen experience. *Journal of Hepatology* 2001; 34: 38.

396. Ghobrial RM, Saab S, Lassman C, Lu DS, Raman S, Limanond P, Kunder G, Marks K, Amersi F, Anselmo D, Chen P, Farmer D, Han S, Durazo F, Goldstein LI, Busuttil RW. Donor and recipient outcomes in right lobe adult living donor liver transplantation. *Liver Transplantation* 2002; 8: 901-909.
397. García-Valdecasas JC, Fuster J, Grande L, Fondevila C, Rimola A, Navasa M, Bombuy E, Ferrer J, Visa J. Adult living donor liver transplantation: Initial results of a starting program. *Transplantation Proceedings* 2002; 34: 237-238.
398. Everson GT, Trotter J. Role of adult living donor liver transplantation in patients with hepatitis C. *Liver Transplantation* 2003; 9: S64-S68.
399. Gaglio PJ1, Malireddy S, Levitt BS, Lapointe-Rudow D, Lefkowitch J, Kinkhabwala M, Russo MW, Emond JC, Brown RS Jr. Increased risk of cholestatic hepatitis C in recipients of grafts from living versus cadaveric liver donors. *Liver Transplantation* 2003; 9: 1028-1035.
400. Bozorgzadeh A, Jain A, Ryan C, Ornt D, Zand M, Mantry P, Lansing K, Orloff M. Impact of hepatitis C viral infection in primary cadaveric liver allograft versus primary living-donor allograft in 100 consecutive liver transplant recipients receiving tacrolimus. *Transplantation* 2004; 77: 1066-1070.
401. Pascasio JM. Tratamiento de los pacientes en lista de trasplante. Jornadas de otoño AEEH en Hepatitis C. II conferencia de consenso del tratamiento de la infección por Virus C. 2014 Nov 21-22. Sevilla, España.
402. Berenguer M. Tratamiento de la hepatitis C post-trasplante hepático. II conferencia de consenso del tratamiento de la infección por Virus C. 2014 Nov 21-22.
403. Registro Español de Trasplante Hepático, memoria de resultados 2009-2012. Organización Nacional de Trasplantes. 2012, Madrid. <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20hepatico%202012.pdf> (Consultado diciembre 2014).

404. Criterios de selección del donante de órganos respecto a la transmisión de infecciones. 2^a edición. Organización Nacional de Trasplantes. 2004, Madrid.
<http://www.ont.es/infesp/DocumentosDeConsenso/infeccondonante.pdf> (Consultado abril 2015).
405. Medici MC, Furlini G, Rodella A, Fuertes A, Monachetti A, Calderaro A, Galli S, Terlenghi L, Olivares M, Bagnarelli P, Costantini A, De Conto F, Sainz M, Galli C, Manca N, Landini MP, Dettori G, Chezzi C. Hepatitis C virus core antigen: analytical performances, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay. *J Clin Virol* 2011; 51: 264-269.
- 405b. Montenegro L, De Michina A, Misciagna G, Guerra V, Di Leo A. Virus C hepatitis and type 2 diabetes: a cohort study in southern Italy. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 1108-1111.
406. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202: 149-156.
- 406b. Li HC, Ma HC, Yang CH, Lo SY. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7104-7122.
407. Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 2001; 75: 8240-8250.
- 407b. Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J Virol* 2008; 82: 8349-8361.

408. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995; 37; 209-220.
- 408b. Kota S, Takahashi V, Ni F, Snyder JK, Strosberg AD. Direct binding of a hepatitis C virus inhibitor to the viral capsid protein. *PLoS One* 2012; 7: e32207.
409. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo or fibroblast to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996; 70: 4438-4443.
410. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K. Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 1997; 78: 1527-1531.
411. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Cur Top Microbiol Immunol* 2002; 242: 55-84.
412. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Morandpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5-19.
413. Schüttler CG, Thomas C, Discher T, Friese G, Lohmeyer J, Shister R, Schaefer S, Grlich WH. Variable ratio of hepatitis C virus ARN to viral core antigen in patient sera. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1977-1981.
414. Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S. p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 1992a; 191: 431-434.
415. Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, Munekata E, Tachibana K, Akahane Y, Yoshizawa H, Mishiro S. Demonstration of a hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected hosts. *J Gen Virol*. 1992; 73: 667-672.

416. Moriya T, Sasaki F, Tanaka J, Mizui MA, Nakanishi T, Takahashi K. Comparison of HCV core antigen activity by ELISA and amount of HCV ARN by branched DNA assay. *Int Hepatol Comun* 1994; 2: 175-177.
417. Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kajita T, Takata A, Mori H, Ohta Y, Tanaka E, Kiyosawa K, Tanaka T, Tanaka S, Hattori N, Kohara M. Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). *J Immunol Methods*. 1996; 190: 79-89.
418. Lee SR, Peterson J, Niven P, Bahl C, Page E, DeLeys R, Giordano-Schmidt D, Baggett D, Green G. Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzym-linked immunosorbent assay for the identification of "window-phase" blood donations, *Vox Sang*. 2001; 80; 19-23.
419. Brojer E, Litzeweski G, Niznik A, Rosiek A, Letowska M, Peterson JE, Calmann M, Kerrison PL, Lee SR. Detection of HCV core antigen in HCV ARN positive, anti-HCV negative blood donations from Polish blood donors. *Transfusion*. 2001; 41; 304.
420. Sanz C, Tassies D, Costa J, Freire C, Pereira A. The first case of HCV infection detected before seroconversion in blood donors tested by HCV core antigen ELISA. *Transfusion* 2002 Apr; 42: 505-506.
421. Letowska M, Brojer E, Mikulska M, Gronowska A, Roseik A. Hepatitis C core antigen in Poland blood donors. *Tranfusion* 2004; 44: 1067-1071.
422. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1802-1808.
423. Cagnon L, Wagaman P, Bartenschlager R, Pietschmann T, Gao T, Kneteman NM, Tyrrell DL, Bahl C, Niven P, Lee S, Simmen KA. Application of the trak-C HCV core assay for monitoring aniviral activity in HCV replication systems. *J virol Methods*. 2004; 118: 23-31.

- 423b. Durand F, Beauplet A, Marcellin P. Evidence of hepatitis C virus viremia without detectable antibody to hepatitis C virus in a blood donor. *Ann Intern Med* 2000; 133: 74-75.
424. Laperche S1, Le Marrec N, Simon N, Bouchardieu F, Defer C, Maniez-Montreuil M, Levayer T, Zappitelli JP, Lefrère JJ. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion*. 2003; 43: 958-962.
425. Kurtz JB, Boxall E, Qusir N, Shirley J, Colemann D, Chandler C. The diagnostic significance of an assay for total hepatitis C core antigen. *J Virol Methods*. 2001; 96: 127-132.
426. Omar MM. Clinical value of total HCV core antigen detection and quantification. *Dig Dis Week* 2004: May 15-20, New Orleans LA, Abstract 2039.
427. Lagging LM, Garcia CE, Westin J, Westajal R, Norkrans G, Dhillon AP, Lindh M. Comparison of serum hepatitis C virus ARN and core antigen concentrations and determination of wheter levels are associated with liver histology or affected by specimen storage time. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4224-4229.
428. Rodríguez JC, García J, Moya I, Ayelo A, Vázquez N, Sillero C, Royo G. Variabilidad genética del virus de la hepatitis C en el área de salud de Elche. Correlación entre el antígeno del core y la carga viral. *Gastroenterol Hepatol* 2003; 26: 407-410.
429. Soffredini R, Rumi MG, Parravicina ML, Ronchi G, Del Ninno E, Russo A, Colombo M. Serum level of hepatitis C virus core antigen as a marker of infection and response to therapy. *Am J Gastrtoenterol* 2004; 10: 1738-1743.
430. Widell A, Molnegren V, Pieksma F, Calmann M, Peterson J, Lee SR. Detection of hepatitis C core antigen in serum or plasma as a marker of

- hepatitis C viraemia in the serological window-phase. *Tranfusion*. 2002; 42: 349-356.
431. Cano H, Candela MJ, Lozano ML, Vicente V. Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C virus core antigen in blood donors. *Transfus Med* 2003; 13: 258-266.
432. Agha S, Tanaka Y, Saudy N, Kurbanov F, Abo-Zeid M, El-Malky M, Khalaf M, Ohta N, Yoshizawa H, Mizokami M. Reliability of hepatitis C virus core antigen assay for detection of viremia in HCV genotypes 1, 2, 3, and 4 infected blood donors: a collaborative study between Japan, Egypt, and Uzbekistan. *J Med Virol*. 2004; 73: 2162-2122.
433. Zanetti AR, Romano L, Brunetto M, Colombo M, Bellati G, Tackney C. Total HCV core antigen assay: a new marker of hepatitis C viremia for monitoring the progress of therapy. *J Med Virol* 2003; 70: 27-30.
434. Buti M, Mendez C, Schaper M, Sauleda S, Valdés A, Rodríguez-Frías F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis C virus Core Antigen as a predictor of non-response in genotype 1 chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirin. *J Hepatol* 2004; 40: 527-532.
435. Lorenzo J, Castro A, Aguilera A, Prieto E, Lopez-Calvo S, Regueiro B, Pedreira J. Total HCV core antigen assay. A new marker of HCV viremia and its application during treatment of chronic hepatitis C. *J Virol Methods* 2004; 120: 173-177.
436. Dickson RC, Mizokami M, Orito E, Qian KP, Lau JY. Quantification of serum HCV core antigen by a fluorescent enzyme immunoassay in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C- clinical and virological implications. *Transplantation* 1999; 68: 1512-1516.
437. Krajden M, Shivji R, Gunadasa K, Mak A, McNabb G, Friesenhahn M, Hendricks D, Comanor L. Evaluation of the core antigen assay as a second-line supplemental test for diagnosis of active hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1977-1981.

- 437b. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky JM. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Virology* 2014; 61: 145-148.
438. Netski DM, Wang XH, Metha SH, Nelson K, Celentano D, Thongsawat S, Maneekarn N, Suriyanon V, Jittiwutikorn J, Thomas DL, Ticehurst JR. Hepatitis C virus (HCV) core antigen assay to detect ongoing HCV infection in Thai injection drug users. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1631-1636.
439. Valcavi P, Medici MC, Casula F, Arcangelleti MC, De Conto F, Pinardi F, Calderaro A, Chezzi C, Dettori G. Evaluation of a total hepatitis C virus (HCV) core antigen assay for the detection of antigenaemia in anti-HCV positive individuals. *J Med Virol*. 2004; 73: 397-403.
- 439b. Marwaha N, Sachdev S. Current testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward. *World J Gastroenterol* 2014 March 21; 20(11): 2948-2954.
440. Garcinuño-Pérez S, Mantecón MA, Álvarez Gago T, Fernández-Salazar L, Aller R, Arranz MT. Niveles basales de antigenemia y de ARN del virus de la hepatitis C en pacientes con hepatitis C crónica: relación con el grado de fibrosis centrolobulilar. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2004; 22: 132-133.
- 440b. Laperche S, Elghouzzi MH, Morel P, Asso-Bonnet M, Le Marrec N, Girault A, Servant-Delmas A, Servant-Delmas A, Bouchardieu F, Deschaseaux M, Piquet Y. Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? *Transfusion* 2005; 45: 1965-1972
441. Fabrici F, Lunghi G, Aucella F, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, Vigilante D, Limido A, Martin P. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 414-420.

442. Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus ARN and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1943-1949.
443. Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostains L, Izopet J. Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *J Clin Virol* 2010; 48: 18-21.
444. Waldenström J, Konar J, Ekermo B, Norder H, Lagging M. Neonatal transfusion-transmitted hepatitis C virus infection following a pre-seroconversion window-phase donation in Sweden. *Scand J Infect Dis* 2013; 45: 796-799.
445. Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, Machida T, Ohno K, Saegusa H, Takeda K. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods* 2009; 157: 8-14.
446. Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu MG, Uyar Y. Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV ARN assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. *J clin Microbiol* 2011; 49: 4089-4093.
447. Leary TP, Gutierrez RA, Muerhoff AS, Birkenmeyer LG, Desai SM, Dawson GJ. A chemiluminescent, magnetic particle-based immunoassay for the detection of hepatitis C virus core antigen in human serum or plasma. *J. med virol* 2006; 78: 1436-1440.
448. Long L, Shen T, Gao J, Duan Z, Liang H, Lu F. Effectiveness of HCV core antigen and ARN quantification in HCV-infected and HCV/HIV-1-coinfected patients. *BMC Infectious Diseases* 2014, 14: 577.
449. Bullard AI, Boxall EH. Assessing the infectivity of hepatitis B carriers. *Commun Dis Public Health* 1999; 2: 178-183.
450. Hadziyannis E, Minopetrou M, Georgiou A, Spanou F, Koskinas J. Is

- HCV core antigen a reliable marker of viral load? An evaluation of HCV core antigen automated immunoassay. *Ann Gastroenterol* 2013; 26: 146-149.
451. Nakamuta M, Shimohashi N, Tada S, Kinukawa N, Enjoji M, Uchimura K, Motomura K, Sugimoto R, Kato M, Iwamoto H, Kuniyoshi M, Sakai H, Nawata H. Serum levels of HCV ARN and core protein before and after incubation at 37 degrees C for 24 h. *Hepatol Res* 2001; 19: 254-262.
452. Tanaka Y, Takagi K, Fujihara T, Kitsugi K, Fujiwara K, Hiramatsu K, Ito Y, Takasaka Y, Sakai M, Mizokami M. High stability of enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen-evaluation before and after incubation at room temperature. *Hepatol Res* 2003; 26: 261-267.
- 452b. Gaudy C, Thevenas C, Tichet J, Mariotte N, Goudeau A, Cuboïs F. Usefulness of the hepatitis C virus core antigen assay for screening of a population undergoing routine medical checkup. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1722-1726.
453. Kuo YH, Chang KC, Wang JH, Tsai PS, Hung SF, Hung CH, Chen CH, Lu SN. Is hepatitis C virus core antigen an adequate marker for community screening? *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1989-1993.
454. Moini M, Ziyaeyan M, Aghaei S, Sagheb MM, Taghavi SA, Moeini M, Jamalidoust M, Hamidpour L. Hepatitis C virus (HCV) Infection Rate among Seronegative Hemodialysis Patients Screened by Two Methods; HCV Core Antigen and Polymerase Chain Reaction. *Hepat Mon* 2013; 13: e9147
455. Fujino T, Nakamuta M, Aoyagi Y, Fukuizumi K, Takemoto R, Yoshimoto T, Miyahara T, Harada N, Sakai H, Nakashima M, Enjoji M. Early decline of the HCV core antigen can predict SVR in patients with HCV treated by Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. *J Dig Dis* 2009; 10: 21-25.
456. Matsui K, Iwabuchi S, Shimizu H, Yoshida A, Fujikawa T, Takatsuka K. Two week induction of interferon-beta followed by pegylated interferon

- alpha-2b and ribavirin for chronic infection with hepatitis C. *Hepatol Res* 2010; 40: 757-762
457. Wada Y, Tamai H, Uno A, Kawashima A, Shingaki N, Mori Y, Moribata K, Miyata K, Higashi K, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Kato J, Ichinose M. Prediction of efficacy to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin in patients with genotype 2 hepatitis C virus using viral response within 2 weeks. *Hepatol Res* 2014; 44: 179-186.
458. Vermehren J, Susser S, Berger A, Perner D, Peiffer KH, Allwinn R, Zeuzem S, Sarrazin C. Clinical utility of the ARCHITECT HCV Ag assay for early treatment monitoring in patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Clin Virol* 2012; 55: 17-22.
459. Loggi E, Cursaro C, Scuteri A, Grandini E, Panno AM, Galli S, Furlini G, Bernardi M, Galli C, Andreone P. Patterns of HCV-ARN and HCV core antigen in the early monitoring of standard treatment for chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2013; 56: 207-211.
460. Tamai H, Shingaki N, Shiraki T, Tukuda H, Mori Y, Moribata K, Enomoto S, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Maekita T, Iguchi M, Yanaoka K, Oka M, Ichinose M. Prediction of sustained response to low-dose pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in patients with genotype 1b and high hepatitis C virus level using viral reduction within 2 weeks after therapy initiation. *Hepatol Res* 2011; 41: 1137-1144.
461. Tedder RS, Tuke P, Wallis N, Wright M, Nicholson L, Grant PR. Therapy-induced clearance of HCV core antigen from plasma predicts an end of treatment viral response. *J Viral Hepat* 2013; 20: 65-71.
462. Garassini ME. Management of hepatitis C in patients with normal transaminases or chronic renal failure. *Medwave* 2007; 7: 3323.
463. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N,

- Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 2009; 41: 1105-1109.
464. Fabrizi F, Lunghi G, Aucella F, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, Vigilante D, Limido A, Martin P. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 414-20.
465. Medhi S, Potukuchi SK, Polipalli SK, Swargiary SS, Deka P, Chaudhary A, Begum N, Hussain Z, Ahlawat RS, Kar P. Diagnostic utility of hepatitis C virus core antigen in hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2008; 417: 447-452.
466. Reddy AK, Dakshinamurt KV, Lakshmi V. Utility of HCV core antigen ELISA in the screening for hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24: 55-57.
467. Li Cavoli G, Zagarrigo C, Schillaci O, Servillo F, Tralongo A, Coglito M, Spadaro F, Scimeca C, Li Destri N, Rotolo U. Hepatitis C virus core antigen test in monitoring of dialysis patients. *Hepat Res Treat.* 2012; 2012: 832021.
468. Benito R, Arribas J, Gude MJ, Gil J, Algarate S, González-Domínguez M, Belles A, Rubio MC. Utilidad del Antígeno del core VHC en la interpretación de los pacientes Anti-VHC positivo con LIA indeterminado. Poster. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Valencia, España, 9 al 11 de abril de 2014.
- 468b. Pitart C, Benito R, Gil J, Castillo FJ, Rubio MC. Evaluation of the total hepatitis C virus core antigen in children born of HCV positive mothers. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark, 2 a 5 de abril de 2005. *Clin Microb Infect* 2005; 11: 202-203.

469. Arribas J, Benito R, Gil J, Gude MJ, Algarate S, Cebollada R, Belles A, González-Dominguez M, Rubio MC. Detección del Antígeno del core del VHC en el cribado de pacientes en el programa de hemodiálisis. Comunicación oral. XVII congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Zaragoza, España, 29 al 31 mayo 2013.
470. Benito R, Arribas J, Gil J, Algarate S, Gude MJ, Cebollada R, González-Domínguez M, Garrido A, Belles A, Peiro F, Rubio MC. Determinación del Antígeno del core VHC dentro del programa de trasplante de órganos en el H.C.U. Lozano Blesa de Zaragoza. Comunicación oral. XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Zaragoza, España, 29 al 31 de mayo 2013.
471. Arribas J, Benito R, Algarate S, Gil J, Bellés A, Peiró F, Garrido A, Bueno J, Rubio MC. Perfil HCV Ag + HCV ARN + en pacientes en hemodiálisis y en programa de trasplante. Poster. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Valencia, España, 9 al 11 de abril de 2014.
472. Rouet F, Deleplancque L, Mboumba BB1, Sica J, Mouinga-Ondémé A, Liégeois F, Goudeau A, Dubois F, Gaudy-Graffin C. Usefulness of a Fourth Generation ELISA Assay for the Reliable Identification of HCV Infection in HIV-Positive Adults from Gabon (Central Africa). PLoS One 2015; 10: e0116975.
473. Solís Sánchez G, Suárez González A, Otero Guerra L, Viejo G, de la Iglesia P, Menéndez García MT. Transmisión del virus de la hepatitis C en gestantes. Med Clín (Barn) 2003; 120: 10-13.
474. Moretti M, Pieretti B, Masucci A, Sisti D, Rocchi M, Delprete E. Role of Signal-to-Cutoff Ratios in Hepatitis C Virus Antibody Detection. Clin Vaccine Immunol 2012; 19: 1329-1331.

475. Florea D, Neaga E, Nicolae I, Maxim D, Popa M, Otelea D. Clinical Usefulness Of HCV Core Antigen Assay for the Management of Patients with Chronic Hepatitis C. *J Gastrointestin Liver Dis* 2014; 23: 393-396.
476. Berger A, Rabernau H, Allwin R, Doerr HW. Evaluation of the new ARCHITECT anti-HCV screening test under routine laboratory conditions. *J Clin Vir* 2008; 43: 158-161.
477. Dos Santos VA, Azevedo RS, Camargo ME, Alves VAF. Serodiagnosis of hepatitis C virus. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: 418-424.
478. Mussini C, Galli L, Lepri AC, De Luca A, Antinori A, Libertone R, Angarano G, Bonfanti P, Castagna A, D'Arminio Monforte A; ICONA Foundation Study Group. Incidence, timing, and determinants of bacterial pneumonia among HIV-infected patients: data from the ICONA Foundation Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013, 63: 339-345.
479. Buchacz K, Baker RK, Palella FJ Jr, Chmiel JS, Lichtenstein KA, Novak RM, Wood KC, Brooks JT; HOPS Investigators. AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study. *AIDS* 2010, 24: 1549-1559.
480. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006, 12: 1365-1371.
481. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis* 2009, 199: 1177-1185.
482. Gross JB, Persing DH. Hepatitis C virus: advances in diagnosis. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 296-297.

483. Lunel F, Pawlotsky JM. Le virus de l'hepatite C: diagnostic virologique. *Pathol Biol* 1995; 43: 681-690.
484. Trepo C, Zoulin F, Alonso C, Petit MA, Pichoud C, Vitvitski L. Diagnostic markers of viral hepatitis B and C. *Gut* 1993; 34: S20-S25.
485. KDIGO clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, evaluation, and treatment of hepatitis C in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2008; 109: S1-S99.
- 485b. García-Agudo R, Aoufi-Rabih S, Barril-Cuadrado G; Grupo de Virus en Diálisis de la Sociedad Española de Nefrología. SHECTS multi-centre Spanish study: liver situation of patients with chronic hepatitis from HCV on renalreplacement therapy with haemodialysis. *Nefrologia* 2013; 33: 188-195.
486. Zhang HQ, Li SB, Wang GH, Chen K, Song XG, Feng XY. Detection of hepatitis C virus core antigen for early diagnosis of hepatitis C virus infection in plasma donor in China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2738-2742
487. Ouyang Y, Tan DM, Li TG, Zhou H, Tan C. Qualitative detection of hepatitis C virus core antigen in the serum in patients with chronic hepatitis C. *J Cent South Univ* 2006; 31: 894-896
488. Lu YC, Jiang ZY, Kuang YL, Chen WS, Tan YZ, Li DR. Clinical value of the detection of hepatitisC virus core antigen. *Chin J Cell Mol Immunol* 2007; 23: 635-637
489. Hook EW, Marra CM. Acquired syphilis in adults. *N Engl J Med* 1992; 326: 1060-1069.
490. Larsen SA, Pettit DE, Perryman MW, Hambie EA, Mullally R, Whittington W. EDTA-treated plasma in the rapid plasma reagin card test and the toluidine red unheated serum test for serodiagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol*. 1983; 17: 341-345.

491. Alanen A, Kahala K, Vahlberg T, Koskela P, Vainionpää R. Seroprevalence, incidence of prenatal infections and reliability of maternal history of varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus and parvovirus B19 infection in South-Western Finland. *BJOG* 2005; 112: 50-56.
492. Pour Abolghasem S, Bonyadi MR, Babaloo Z, Porhasan A, Nagili B, Gardashkhani OA, Salehi P, Hashemi M, Varshoghi M, Gaffari GO.. IgG avidity test for the diagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy. *Iran J Immunol* 2011 Dec; 8: 251-255.
493. De Carolis S, Santucci S, Botta A, Salvi S, Degennaro VA, Garufi C, Garofalo S, Ferrazzani S, Scambia G. The relationship between TORCH complex false positivity and obstetric outcome in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012; 21: 773-775.
494. Seiskari T, Horsti J, Aittoniemi J. The value of HCV antigen test with reference to PCR in confirming infection in cases with indefinite antibody test result. *J Clin Virol*. 2011; 51: 90-91.
495. Schreiber G, Busch M, Kleinman S, Korelitz J. The risk of trasfusion trasmited viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-1690.
496. Bruhn R, Lelie N, Busch M, Kleinman S; the International NAT Study Group. Relative efficacy of nucleic acid amplification testing and serologic screening in preventing hepatitis C virus transmission risk in seven international regions. *Transfusion* 2015; 55:1195-1205.
497. Contreras AM, Reta CB, Torres O, Celis A, Dominguez J. Sangre segura en ausencia de infecciones virales por VHB, VHC y VIH en período de ventana serológica de donadores. *Salud Pública Mex* 2011; 53: S13-S18.
498. 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: 1495-1504.
499. Gorodin S, Unal S, Wang Y, Mikhaylov MI, Bigbulatova L, Jehuda-Cohen T. New tools in HCV diagnosis, in light of the enhanced awareness and the new drugs for treatment: SMARTube and stimmunology. *Scientific World Journal* 2013; 380-389.
500. Lok AS, Chien D, Choo QL, Chan TM, Chiu EK, Cheng IK, Houghton M, Kuo G. Antibody responses to core, envelope and non structural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunocompromised patients. *Hepatol* 1993; 18: 497-502.
501. Gu S1, Liu J, Zhang H, Gu B, Lai H, Zhou H, He C, Chen Y. Core antigen tests for hepatitis C virus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 8197-8208.
502. Schröter M, Schäfer P, Zöllner B, Polywka S, Laufs R, Feucht HH. Strategies for reliable diagnosis of hepatitis C infection: The need for a serological confirmatory assay. *J med virol* 2001; 64: 320-324.
503. Quiroga JA, Carreño V. HCV-indeterminate blood donors or occult HCV infection? *Lancet* 2005; 365: 1540-1541.
504. Vervelen K, Claeys H, Verhaert H, Volckaerts A, Vermeylen C. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 2004; 343: 853.
505. Bresters D, Zaader HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, van Exel-Oehlers PJ, van Drimmelen AAJ, Jansen PLM, van der Poel CL, Lelie PN. Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfus* 1993; 33: 634-638.
506. Pawlotsky JM, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, Sayada C, Duval J, Dhumeaux D. Significance of indeterminate third-generation

- Hepatitis C virus Recombinant Immunoblot Assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 80-83.
507. Suzuki F, Chayama K, Nakajima T, Kawasaki T, Kumada H, Yoshimi T. Case report: Clinical and virological analyses of a patient positive for hepatitis C virus-RNA by branched DNA assay but negative for anti-hepatitis C virus antibodies. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12: 869-873.
508. Zanetti AR, Tanzi E, Newell ML. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J hepatol*. 1999; 31: 96-100.
509. Sarrión A, Viudes A, Peset V, Pérez MA, Otero MC, Gómez MD, Bretón R, Córdoba J, Gobernado M, Hernández I. Seguimiento de niños verticalmente infectados por el virus C de la hepatitis y existencia de portadores seronegativos. *Ann Esp Pediatr* 2000; 52: 97-98.
510. Arribas J, Algarate S, Cebollada R, Bellés A, Bueno J, Peiró F, González-Domínguez M, Benito R. Significado del resultado Zona Gris en la determinación del antígeno del core del virus de la hepatitis C. Poster. XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Sevilla, España, 28 al 30 de mayo de 2015.
511. Mitsufumi N, Tomoyuki E, Katusya F, Norihiro S, Toshiya S, Masato O, Koti K, Koichiro M, Takao K. Persistent panhypogammaglobulinemia with selected loss of memory B cells and impaired isotype expression after rituximab therapy for post-trasplant EBV-associated autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Haematol* 2005; 75: 527-529.
512. Horwitz SM, Negrin RS, Blume KG, Breslin S, Stuart MJ, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Wong RM, Shizuru JA, Horning SJ. Rituximab as adjuvant to high-dose therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for aggressive non Hodgkin lymphoma. *BLOOD* 2004; 103: 777-782.
513. Vidales-Braz BM, da Silva NMO, Lobato R, Germano FN, da Mota LD, Barros EJ, de Martinez AMB. Detection of hepatitis C virus in patients

- with terminal renal disease undergoing dialysis in southern Brazil: prevalence, risk factors, genotypes, and viral load dynamics in hemodialysis patients. *Virol J* 2015; 12:8.
514. Noiri E, Nakao A, Oya A, Fujita T, Kimura S. Hepatitis C virus in blood and dialysate in hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 38–42.
515. Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, Martin P. Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: novel perspectives. *J Nephrol* 2003; 16: 467–75.

