

FRECUENCIA DE GENOTIPOS Y SUBTIPOS DE VIRUS DE LA HEPATITIS C EN PACIENTES COLOMBIANOS CON INFECCIÓN CRÓNICA

¹ARIAS Y. R., ²EHEVERRY S. J., ³CASTRO M. A., ⁴RÍOS M. F., ⁵MARTÍNEZ O.

1.2.4. Bacterióloga - Laboratorio de Biología Molecular - Grupo de investigaciones en patología clínica de Clínica Colsanitas S.A.

3. M.D. M.Sc epidemiología - director grupo colombiano de estudios alfa en epidemiología, salud poblacional - estadística aplicada y ciencias aliadas - grupo de virología Instituto Nacional de Salud

5. M.D. patólogo - director médico del Laboratorio Clínico - Grupo de investigaciones en patología Clínica Colsanitas S.A.

RESUMEN

Objetivo: determinar la frecuencia de los genotipos y subtipos virales del virus de la hepatitis C (VHC) en pacientes colombianos estableciendo sus posibles asociaciones con variables como edad, sexo y carga viral. **Metodología:** se realizó la determinación del genotipo y subtipo del VHC en pacientes con infección crónica atendidos en una entidad prestadora de servicios médicos de tercer nivel con sede en diferentes ciudades de Colombia, mediante el uso del sistema TRUGENE HCV 5NC, que consiste en secuenciar el ADNc del virus de la hepatitis C obtenido a través de una RT-PCR del ARN viral de cada muestra de los pacientes incluidos en el estudio. **Resultados:** se realizó el análisis de genotipo de VHC en 284 pacientes atendidos en diferentes ciudades del país, durante 2008, 2009 y primer trimestre de 2010. Fue posible la detección de los genotipos 1, 2, 3 y 4 del virus de la hepatitis C y de los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 4c, con las siguientes frecuencias 16.20%, 71.13%, 2.11%, 2.11%, 0.35%, 0.35%, respectivamente. Además se destacó en el 7.8% de los casos la infección mixta por los subtipos 1a y 1b. De los casos incluidos en el estudio se encontró una mayor proporción de mujeres con el 56.7% del total de los pacientes incluidos; así mismo, el rango etéreo con mayor representación estuvo entre los 45 a los 64 años con un 83.1% de la población analizada. La carga viral de VHC fue mayor en hombres con un $p=0,004$. Se observaron valores de carga viral con una tendencia más alta en pacientes en los cuales fue detectado el subtipo 1a. **Conclusiones:** se presentó una mayor prevalencia del genotipo 1, observado en el 95% de los casos analizados y dentro de este el subtipo viral más frecuente fue el 1b encontrado en el 71.13% de la población analizada.

Palabras clave: Genotipo, VHC, Secuencia de ADN, DNAC, RNA.

GENOTYPE AND SUBTYPES FREQUENCY OF HEPATITIS C VIRUS IN COLOMBIAN PATIENTS WITH CHRONIC INFECTION

ABSTRACT

Objectives: to determine the frequency of viral genotypes and subtypes of hepatitis C virus (HCV) in Colombian patients observing possible associations with variables such as age, sex and viral load. **Methodology:** we performed genotyping and subtype of HCV in chronically infected patients treated at different sites of the clinical laboratory of a third level health care service providing entity present in different cities in Colombia using the HCV TRUGENE 5NC system. The system consists of the sequencing of the cDNA obtained from the virus

*Correspondencia: yarias@colsanitas.com

Fecha de recepción: 30 de junio de 2010 - Fecha de aceptación: 28 de agosto de 2010

by RT-PCR from each sample of patients included in the study. **Results:** we performed HCV genotype analysis in 284 patients treated in different cities during the years 2008, 2009 and first quarter of 2010. It was possible to detect genotypes 1, 2, 3 and 4 of hepatitis C virus subtypes and 1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 4c, with the following frequencies 16.20%, 71.13%, 2.11%, 2.11%, 0.35%, 0.35%, respectively. Mixed infection by subtypes 1a and 1b were detected in 7.8% of the cases. Women represented a high proportion of the cases included in the study (56.7%), while 45 - 64 years was the age range mostly represented (83.1%) in the sample analyzed. HCV viral load was usually higher in men ($p = 0.004$); and as a trend, men presenting subtype 1a also showed the highest viral loads. **Conclusions:** we showed a higher prevalence of genotype 1, observed in 95% of the cases analyzed. Among these cases, viral subtype 1b was the most frequently found in the population analyzed (71.13%).

Key words: genotype, HCV, sequences of DNA, cDNA, RNA.

INTRODUCCIÓN

El agente causal de la hepatitis C es un pequeño virus envuelto compuesto por una cadena sencilla positiva de RNA de cerca de 9.6 kb (1); posee una alta heterogeneidad genética y pertenece a la familia flaviviridae (2). Hasta ahora seis principales genotipos del virus de la hepatitis C (VHC 1 a VHC 6) han sido descritos, cada uno contiene múltiples subtipos (Ej: 1a, 1b, etc). Los aislados con anterioridad conocidos como genotipos 7 a 11 son ahora considerados subtipos dentro del genotipo 3 (genotipo 10) y genotipo 6 (genotipo 7, 8, 9 y 11) (3-4). Los genotipos y subtipos pueden aparecer en cualquier parte del mundo, pero existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica. Por ejemplo, los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a constituyen el 90% de todas las infecciones en América, Europa, China, antigua Unión Soviética y Australia. Los genotipos 1a y 1b son los causantes del 40% de todas las infecciones de los Estados Unidos y del 80% en Colombia (5). El genotipo 3 es altamente prevalente en India, Pakistán e Irán, el genotipo 4 en Egipto y en África Central, el genotipo 5 es responsable del 50% de las infecciones en Sudáfrica y el genotipo 6 es más frecuente en el Sudeste Asiático. A pesar de las variaciones geográficas, se observan diferencias dentro de un área según los diferentes grupos de población (6).

El virus es transmitido por procedimientos iatrogénicos y el uso de drogas intravenosas (7). Varios genotipos y subtipos han sido asociados con particulares rutas de transmisión parenteral, por ejemplo, el 1b y 2 con transfusiones; el 1a y 3a con uso de drogas intravenosas (8), y el 4a con inyecciones no seguras, en Egipto (9). La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) se considera un problema de salud pública. Se estima que alrededor del mundo hay entre 85 y 170 millones de portadores crónicos, lo cual representa una prevalencia que alcanza el 3% en la población mundial (10).

En los Estados Unidos la prevalencia global es del 1.8%, en donde la mayoría de los pacientes no son conocedores de su infección ni de los riesgos a los que están expuestos para desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular (11). En Colombia, la prevalencia de infección en donantes es de 0.97% (1992) en grupos de riesgo, hemodializados de 42% a 60%, en hemofílicos de 6.5% a 35% y en poli transfundidos del 13% (12, 15). La historia natural de la enfermedad indica que del 100% de los infectados agudamente, un 15 a 30% erradica la infección espontáneamente, mientras que un 70 a 85% desarrolla la infección en un lapso de más de seis meses. De estos infectados crónicos, un 25% desarrolla la infección severa con riesgo de cirrosis con descompensación hepática y riesgo de desarrollar hepatocarcinoma, por lo que generalmente fallecen (16). La determinación del genotipo de hepatitis C es de especial utilidad para determinar la severidad y agresividad de la infección hepática (18), así como para definir la conducta terapéutica, su duración y predecir la respuesta a tratamiento (19). Las infecciones que involucran los genotipos 2 y 3 son curables en más del 80% de los casos, mientras que los genotipos 1 y 4 solo en el 40 al 50% de los casos (15, 20) siendo el genotipo 1 el de más pobre respuesta y el que requiere una terapia prolongada (21).

MATERIALES Y MÉTODOS

• **Diseño y población:** es un estudio retrospectivo descriptivo que incluyó a 284 pacientes atendidos en las ciudades de Bogotá, Cali, Barranquilla, Medellín, Villavicencio, Armenia, Bucaramanga y Cartagena, a quienes se les realizó genotipificación para el virus de la hepatitis C (VHC) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Clínica participante, la cual es de tercer nivel, en el periodo comprendido entre enero de 2008 y marzo de 2010.

• **Definición de variables:** las características demográficas (sexo, edad, lugar de atención para toma de muestras), los genotipos encontrados y la carga viral fueron las variables de interés para este estudio.

• **Extracción y amplificación de ARN:** las muestras de los pacientes fueron recolectadas por el sistema vacutainer en tubos EDTA con gel de separación de plasma y fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento en el tubo primario. Se realizó la extracción de ARN de VHC a partir de 200 μl de cada uno de los plasmas obtenidos mediante el kit Amplicor HCV Specimen Preparation (Roche). Se siguieron las indicaciones del fabricante y posteriormente se realizó la amplificación del virus de la hepatitis C mediante el sistema Cobas Amplicor. La prueba COBAS AMPLICOR HCV V2.0 contempló tres procesos antes de realizar la reacción de secuencia de ADN complementario (ADNc).

1. Transcripción reversa del ARN de VHC para generar ADNc.
2. Amplificación por PCR del ADNc usando iniciadores complementarios específicos para el VHC.
3. Hibridación de los productos amplificados a sondas oligonucleótidas específicas.

Esta prueba permitió realizar de forma simultánea la transcripción reversa y la amplificación mediante PCR del ARN de VHC para la posterior realización de la reacción de secuencia.

• **Purificación de los amplicones:** una vez realizada la amplificación se realizó la purificación de los productos obtenidos, usando el kit QUIAGEN QIAquick PCR Purification, siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de 50 μl de amplicon y se obtuvo un producto purificado de 30 μl , el cual fue utilizado para realizar la reacción de secuencia.

• **Reacción de secuencia:** se realizó la determinación del genotipo de VHC, mediante el sistema TRUGENE HCV 5'NC, un método con el cual se obtuvo la secuencia bidireccional desde la región no codificante 5'.

Los productos de secuenciación de la región 5' NC fueron generados a partir del producto amplificado previamente de la misma región mediante la secuenciación, permitiendo que ambas direcciones del amplicón blanco fueran secuenciadas simultáneamente en el mismo tubo usando dos diferentes primers marcados con colorante (Cy5 y Cy5.5) para cada reacción. Los segmentos de secuenciación resultantes se detectaron usando el sistema de secuenciación Open Gene DNA. Las secuencias directa y reversa fueron combinadas

para formar la secuencia buscada, la cual se compara con aislados previamente caracterizados en el módulo TRUGENE HCV 5' del software Gene Objects, en orden a determinar el genotipo de HCV de la muestra analizada. El procedimiento contempló los siguientes pasos:

1. Preparación de la reacción de secuencia: se preparó la mezcla maestra según las indicaciones del fabricante; se adicionaron 5 μl del producto amplificado a la mezcla y se procedió a servir en cada uno de los 4 pozos que contenían los terminadores A, C, G, T, respectivamente. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras y controles analizados.
2. Una vez preparada la reacción, se realizó la amplificación en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems, mediante el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 30 ciclos de amplificación, que contemplaban: una desnaturalización a 95°C 30 segundos, unión del primer al ADN blanco a 45°C por 30 segundos y una extensión a 70°C por 1 minuto; terminando con un ciclo de enfriamiento a 4°C .
3. Desnaturalización del producto de la reacción de secuencia: después de terminar el proceso de amplificación se adicionó una solución de parada y se realizó la desnaturalización del producto durante 3 minutos a 85°C .
4. Preparación de la corrida y electroforesis: se preparó un gel de poliacrilamida al 6%, utilizando el sistema Gel Toaster. Se realizó una pre corrida en el secuenciador del Open Gene System, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior a esto se realizó la electroforesis bajo los siguientes parámetros: temperatura del gel 60°C , 1300V, poder del láser 50% durante 25 minutos.

• **Análisis de secuencia:** una vez terminada la electroforesis, se procede a realizar el análisis de cada caso teniendo en cuenta que por cada montaje realizado se incluyó un control negativo y uno positivo; se efectuó cada montaje con un promedio de 12 pacientes. Los pasos que se llevaron a cabo para realizar el análisis y la asignación del genotipo y subtipo viral fueron los siguientes:

1. Validación del control negativo.
2. Validación del control positivo.
3. Evaluación de la presencia de una región de poly C en la secuencia VHC 5'NC en 27pb: se evidenció la presencia de una región de 5 a 8 citocinas en esta región, en cada una de las muestras analizadas.

4. Análisis de la presencia de una región de Poly G/C comprendida entre 140 a 148 pb.
5. Análisis de la secuencia, la cual comprende 183 pb: se efectuó el análisis completo de la secuencia de ADNc de cada una de las muestras mediante la observación del electrofluorograma y la correlación entre lo observado y la asignación hecha por el software.
6. Corrección: se efectuaron las correcciones necesarias en la secuencia teniendo en cuenta el electrofluorograma obtenido con el fin de corroborar por completo la asignación y verificar el porcentaje de similitud con la genoteca TRUGENE 5NC. Así mismo, se verificó el score obtenido al realizar la comparación con los aislados virales disponibles en la base de datos de la genoteca utilizada para finalmente determinar el subtipo hallado en cada una de las muestras analizadas.
7. Emisión del resultado, subtipo viral.

• **Análisis estadístico:** se realizó el cálculo de proporciones para variables cualitativas. La comparación de dos o más proporciones se realizó con la prueba de Chi cuadrado. El resultado del valor de p fue ajustado con el método exacto de Fisher, si existía alguna celda menor a cinco observaciones. El cumplimiento del supuesto de normalidad en las variables cuantitativas se evaluó con métodos gráficos y la estadística de Shapiro-Wilk. Las distribuciones de las variables son mostradas gráficamente usando histogramas (mostrando desviaciones estándar; d.e.) y gráficos de cajas. En las variables cuantitativas no normales se utilizaron la mediana y los cuartiles con su respectivo rango intercuartílico (RIC) como medidas de resumen y la comparación se realizó con la prueba de la mediana para muestras independientes. Los valores de p menores o iguales a 0.05 se consideraron significativos. El software usado para el análisis fue Stata SE/9.0.5.1

• **Consideraciones éticas:** este es un estudio retrospectivo que utilizó datos de pacientes cuyas muestras ya habían sido recolectadas y procesadas; por lo tanto, no hubo riesgo adicional, teniendo en cuenta que no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos participantes. Esta investigación es catalogada como investigación sin riesgo de acuerdo con la clasificación establecida en la resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993. Las muestras habían sido recolectadas previo consentimiento del paciente con orden médica y cumpliendo las condiciones

necesarias para este tipo de prueba. En todos los procesos que se realizaron para llevar a cabo el presente estudio se protegió la confidencialidad de la información y se cumplieron todas las normas que garantizaron el control de los factores de riesgo biológico del personal involucrado.

La presente investigación se llevó a cabo después de la aprobación por parte del grupo de investigaciones en patología clínica de la entidad participante.

RESULTADOS

• **Características demográficas:** el análisis del genotipo del VHC se realizó a 284 pacientes, en quienes se recolectó la muestra de sangre entre enero de 2008 y marzo de 2010. La mayoría de los pacientes era del sexo femenino y mayores de 50 años, encontrándose una frecuencia más alta en el rango comprendido entre 45 a 64 años. La distribución de los pacientes atendidos teniendo en cuenta las variables demográficas se muestra en la Tabla 1. Del total de los pacientes, 137 (48,2%) fueron atendidos para genotipificación viral en 2008; 113 (39,8%) en 2009, y 31 (11,9 %) en los primeros tres meses del 2010.

Tabla 1. Distribución de los pacientes con hepatitis C según las características demográficas.

Variable	n	%	% acumulado
Sexo			
Femenino	161	56,7	56,7
Masculino	123	43,3	100,0
Edad (años)			
<15	1	0,4	0,4
15 - 44	70	24,6	25,0
45 - 64	165	58,1	83,1
65 +	48	16,9	100,0
Ciudad de recolección de la muestra			
Bogotá	189	66,5	66,5
Cali	42	14,8	81,3
Barranquilla	24	8,5	89,8
Medellín	16	5,6	95,4
Otros*	13	4,6	100,0

* Incluye las ciudades de Bucaramanga, Cartagena, Armenia y Villavicencio.

Se analizó la variable ciudad de recolección de muestra, dicha variable puede indicar lugar de habitación, pero dado que no existen centros de atención en todos los municipios, normalmente los pacientes tienen que desplazarse al sitio más cercano a su domicilio, o por ser la entidad participante un centro de referencia para esta prueba algunas muestras que provenían de ciudades cercanas fueron directamente remitidas a la ciudad de Bogotá.

La figura 1 muestra la distribución cuantitativa de la edad de los pacientes con hepatitis C, a quienes se les realizó el análisis genómico viral y se observó una lateralización a la derecha, con un pico hacia los 60 años.

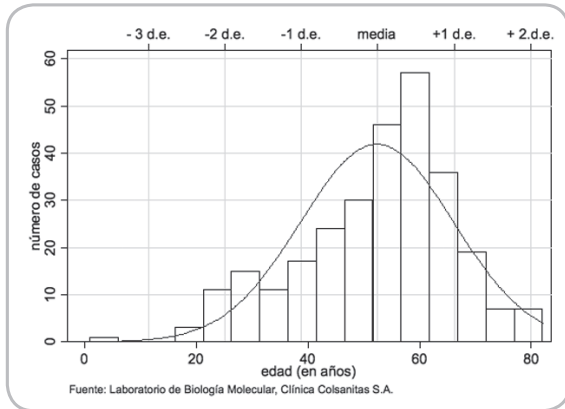


Fig. 1. Distribución de los pacientes con Hepatitis C atendidos para examen de genotipo según la edad.

La edad mediana de las mujeres fue mayor que la de los hombres (57 y 51 años, respectivamente), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Pearson Chi2, prueba de mediana=5,4; p=0,019). Esta diferencia en edad, según el sexo, se mantuvo en Bogotá, pero no en Cali (p=1,000) o en las demás ciudades agrupadas (p=0,089) (figura 2).

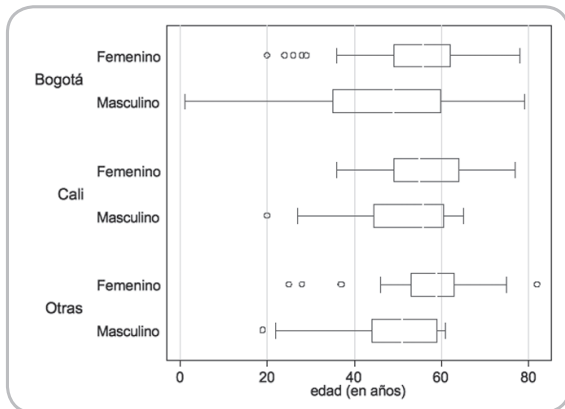


Fig. 2. Distribución de los pacientes según las características de la infección.

• **Genotipos y subtipos del virus de la hepatitis C:** el análisis genómico muestra que es más frecuente la infección única y por el genotipo 1 del virus de la Hepatitis C en la población analizada. La infección por genotipo 1 aparece como la más frecuente, presentándose en un 95% de los casos, seguida por el genotipo 2 con el 4,2% y con un único caso para los genotipos 3 y 4, que corresponden a un 0.4% para cada uno de ellos. La infección mixta fue observada en

22 pacientes que equivale al 7.8% del total de los casos analizados. (Tabla 2) Al realizar el análisis a nivel de subtipos, se observa una frecuencia más alta de subtipo 1b (71.13%), seguida por 1a (16.20%), y con baja frecuencia fue posible detectar los subtipos 2a y 2b (2.11%), que corresponde a 6 casos de cada uno. Adicionalmente, se hizo la detección de un solo caso de los subtipos 3c y 4c (0.40%). (Figura 3)

Tabla 2. Distribución de los pacientes según las características de la infección.

Variable	n	%	% acumulado
Tipo de Infección			
Única	262	92,2	92,2
Coinfección	22	7,8	100,0
Genotipo viral			
1*	270	95,0	95,0
2	12	4,2	99,2
3	1	0,4	99,6
4	1	0,4	100,0

* Incluye a los pacientes con coinfección.

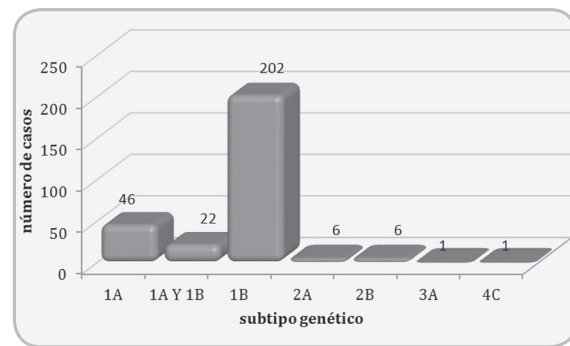


Fig. 3. Distribución de los pacientes con infección por virus de la Hepatitis C por subtipo genético.

El genotipo 1 del VHC se halló con mayor frecuencia en mujeres (n=155/270; 57,4%), mientras que el genotipo 2 se encontró más en hombres (n=7/12; 58,3%). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en estas proporciones (Pearson Chi2 entre proporciones = 1,15; p=0,282). Por otro lado, el genotipo 3 se encontró en una mujer y el genotipo 4 en un hombre. Entre los 22 pacientes con coinfección viral, el porcentaje de homología genómica con los dos subtipos virales 1a y 1b en relación a los aislados de la genoteca TRUGENE 5NC varió entre 68,9 y 99,5 con un valor mediano de 97,9.

• **Carga y subtipo viral:** al realizar el análisis de carga viral y su relación con el subtipo encontrado, fue posible obtener información de 211 pacientes del total de los casos analizados. El valor mediano de carga viral del VHC fue de 333.379,0 UI/ml con un rango entre 731 UI/ml y 13'610.917 UI/ml entre los 211 (74,3%) pacientes con información en esta variable.

La carga viral fue mayor en hombres (mediana=623.857,5 UI/ml; RIC=179.741,0-2'001.975,0) que en mujeres (mediana=234.017,0 UI/ml; RIC= 95.110,0-832.514,0), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Pearson Chi2, prueba de mediana=8,2; p=0,004). De los casos analizados con estas dos variables, el mayor porcentaje correspondió a las mujeres (61,1%) con 129 casos; de los 211 casos, 195 presentaron infección única y 16 (7,6%) tuvieron infección mixta; sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores medianos de la carga viral al comparar los pacientes con infección única o mixta (mediana=333.379 UI/ml; RIC= 117.711-1'368.097 y mediana=336.934,5 UI/ml; RIC= 76.342-1'729.889, respectivamente; p= 0,984).

Al realizar la descripción de la población respecto a las variables carga viral de VHC y subtipo viral, se encontró para subtipo 1a un rango intercuartil comprendido entre 156702 y 2530880 UI/ml, cuyos valores son los más altos respecto a los demás subtipos virales. De igual forma, es posible observar una mediana de 745.288 UI/ml de este mismo subtipo y también representa el valor más alto respecto a los demás. No obstante, estos datos no son estadísticamente significativos, ya que no hubo diferencia de los valores medianos de carga viral entre ellos, incluso, al realizar comparaciones adicionales en el mismo genotipo. (Tabla 3) En estos análisis y con el logaritmo de la carga viral del VHC, que es utilizado para realizar la evaluación del estado de la infección y seguimiento de la misma, la

población analizada presentó valores de la carga viral en un rango comprendido entre 2.86 a 7.13 logaritmos (log).

Se observó una mayor proporción de pacientes de sexo femenino con cargas virales con log de 4 a 6 (99 casos); sin embargo, al evaluar el rango de 6 a 8 logaritmos que corresponden a las cargas virales más elevadas se evidenció un mayor número de casos en pacientes de sexo masculino. (Figura 4) Al correlacionar el subtipo viral con los rangos de log de carga viral del VHC se observa que la mayor cantidad de los pacientes que exhiben el subtipo 1b se encuentran en un rango entre 4-6 log (105 pacientes) y entre 6-8 log (38 pacientes). En cuanto a los pacientes que presentaron infección mixta con los subtipos 1a y 1b (n=16), se encuentran en un rango de logaritmo entre 4 y 6 once pacientes, y entre logaritmo de 6 a 8 se encontraron 5 pacientes. (Figura 4) Estos resultados se correlacionan con la elevada prevalencia

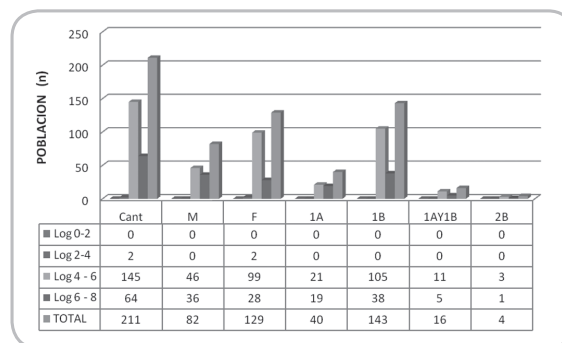


Fig. 4. Distribución de logaritmo según sexo y subtipo viral.

Tabla 3. Valores medianos, intercuartil, mínimos y máximos de la carga viral de Hepatitis C por subtipo y tipo genómico.

Factor	n	Mediana ¹	Rango IC	Mínimo	Máximo	Valor de p ²
Subtipo viral						
1°	40	745.288	156.702,5-2'530.880	12.635	13'610.917	0,511
1A Y 1B	16	336.934,5	76.342-1'729.889	13.473	3'153.544	
1B	143	303.887	113.628-1'073.947	15.140	10'978.896	
2°	6	412.192	1.067-672.732	731	7'122.572	
2B	4	311.833	106.771,5-2'201.991	40.810	3'953.049	
3°	1	234.017*	---	---	---	
4C	1	24.926*	---	---	---	
Genotipo viral						
1	199	353.880	117.711-1'407.948	12.635	13'610.917	0,572
2	10	355.658,5	40810-672732 731	7'122.572		
3	1	234.017*	---	---	---	
4	1	24.926*	---	---	---	

1. Los puntos son separadores de miles; las comas de decimales.

2. Las pruebas de igualdad entre medianas de grupos independientes fueron realizadas comparando de forma simultánea aquellos subtipos con al menos cuatro cifras de carga viral y entre los genotipos 1 y 2.

* Valor único encontrado en un paciente.

Tabla 4. Distribución de los pacientes según sexo y subtipo viral.

Subtipo /sexo	1A	1B	1A/1B	2A	2B	3A	4C
	n=46	n=202	n=22	n=6	n=6	n=1	n=1
Femenino	56,5%	58,9%	50%	33,3%	50%	1*	
Masculino	43,5%	41,1%	50%	66,7%	50%		1*

* Sólo se determinó un caso.

de los subtipos 1a y 1b dentro de la población en estudio. De los subtipos virales encontrados se observó que en aquellos que tuvieron subtipo 1a, el 56,5% correspondió a mujeres, con 26 casos, mientras el 43,5% lo hizo al sexo masculino. De los casos tipificados como 1b, el 58,9% se registró en pacientes de sexo femenino, con 119 casos de los 202 encontrados con este tipo viral. En el análisis realizado sobre los casos en los que se determinó coinfección con los subtipos 1a y 1b se encontró el mismo número de pacientes de sexo masculino y femenino (11 pacientes, respectivamente). Del total de los pacientes genotipificados como 2a, el 66,7% correspondió al sexo masculino, con 4 de los 6 casos. Por otra parte, se halló el mismo número de pacientes de sexo masculino y femenino (3 casos respectivamente) con infección por hepatitis C del subtipo 2b. (Tabla 4)

DISCUSIÓN

La importancia de determinar la frecuencia de los genotipos y subtipos del VHC en un país, o en regiones representativas del mismo, es relevante desde el punto de vista epidemiológico y clínico, puesto que permite conocer el impacto que esta infección pueda generar en la población afectada y ayuda a establecer los esquemas de tratamiento más adecuados, así como a predecir la respuesta terapéutica que producirá. Con estos datos los servicios de salud pública podrán establecer programas de detección temprana y seguimiento adecuados, con el objetivo de reducir las tasas de infección en la población y las complicaciones letales que ocasiona. De igual forma, la genotipificación del VHC puede orientar sobre la evolución, el origen de la infección y los factores de riesgo (22). En este estudio, que analizó una población de 284 pacientes proveniente de diferentes lugares geográficos de Colombia, se logró establecer que las ciudades de Bogotá (66.5%), Cali (14.8%) y Barranquilla (8.5%) tuvieron una mayor prevalencia de infección ocasionada por el VHC y, aunque no podemos establecer con certeza que los todos los pacientes tienen su lugar de residencia en las ciudades mencionadas, por lo menos reflejan el área de incidencia de la infección, ya que algunas de las muestras analizadas fueron remitidas de poblaciones cercanas a las ciudades incluidas en el estudio.

Las mujeres (56.7%) son las más afectadas con la infección ocasionada por el VHC en contraste con el número de hombres afectados (43.3 %). La explicación puede estar en que las mujeres se diagnostican más tarde que los hombres, debido a que ellas tiene pocos cofactores de riesgo tales como

la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NASH- Non Alcoholic Fatty Liver) y la ingesta de alcohol, que usualmente en los hombres producen elevación de los niveles de enzimas hepáticas y conlleva a estudios (23). Esto sugiere que el diagnóstico temprano de la infección por VHC en hombres pueda deberse a la alta frecuencia de niveles elevados de enzimas hepáticas en la población masculina (24,25). El rango de edad de la mayor parte de la población de este estudio (58.1%) se encontró entre los 45 y 65 años. Esto puede ser importante para las consideraciones terapéuticas, puesto que se conoce que la terapia es menos eficiente en pacientes de edad avanzada debido a la progresión de la enfermedad hepática y al largo tiempo que permanece la infección. En un estudio realizado en Gaza por Ayesha B et al, 2009 se evidenció que la edad media fue de 46.55 +/- 17.1 años y, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la media de la edad de los grupos de genotipos. Es importante mencionar que el 71.4% de las infecciones con mezcla de genotipos se presentaron en pacientes mayores de 60 años.

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos, este estudio logró establecer que el genotipo más frecuente en nuestra población en los pacientes con infección producida por un único tipo viral fue el genotipo 1, con una frecuencia del 95%, seguido por el genotipo 2 (4.2%), y por los genotipos 3 (0.4%) y 4 (0.4%), de los cuales solo se detectó un paciente para cada uno de ellos.

Al realizar el análisis por subtipo viral evidenciamos que el subtipo 1b (71.13%) es el que causa el mayor número de infecciones, seguido por el subtipo 1a (16.20%), subtipo 2a (2.11%), subtipo 2b (2.11%), subtipo 3c (0.40%) y subtipo 4c (0.40%). La infección mixta (1a y 1b) se logró establecer en un 7.8% de la población analizada. Estos datos guardan relación en cuanto a los subtipos encontrados, aunque en una mayor cantidad con los reportados por Botero R y colaboradores en un estudio realizado en 1997 en una población de 60 pacientes en la ciudad de Bogotá. Otros estudios realizados en Latinoamérica muestran que aunque el tipo 1 es el más frecuente, el subtipo viral cambia dependiendo de la región geográfica estudiada; por ejemplo, en México la prevalencia del genotipo 1 está entre el 30 y el 87.5% con una predominancia de los subtipos 1b y 1a; los genotipos 2 y 3 son menos frecuentes y los tipos 4 y 6 son inusuales (26). En un estudio realizado por Sosa-Jurado F et al, se determinó que el 5,4% tuvo genotipo 1 no determinado, el 40.5% tipo 1a, el 27% tipo 1b, el 18.9% tipo 1a/1b para un total de

91.8% para el tipo 1. Del genotipo 2 se observó un 2.7% para tipo 2a y 2.7% para 2b para un total de 5.4% para el grupo 2. Adicionalmente se observó 1 caso de coinfección que representa el 2.7%, en donde el paciente tuvo una mezcla de tipo 1a y 2a. El principal factor de riesgo en el grupo de donantes recuperados fue la historia de cirugías y transfusiones sanguíneas (27).

Al correlacionar nuestros datos con los obtenidos en países de Europa y medio oriente se observan algunas similitudes y también algunas diferencias, lo cual nos permite hacer inferencia del estado migratorio que puede haber tenido el VHC en nuestro país, tal y como lo han documentado algunos estudios de epidemiología molecular en otras partes del mundo (7). Por ejemplo, Austria es uno de los países en Europa con más baja prevalencia de infección por VHC, en donde menos de 0,5% de la población está infectada.

En un estudio realizado por Maieron A et al, en el 2010, la distribución de los genotipos encontrados fue muy similar a los observados en otros países de Europa y fueron para genotipo 1 (80.4%), genotipo 2 (4,5%), genotipo 3 (12,3%), genotipo 4 (2,7%) y genotipo 6 (0,1%); los principales subtipos fueron el 1b (51,7%), 1a (20,4%) y 3a (8,4%). También se evidenció la coinfección en 3 pacientes, quienes presentaron los tipos 1a/2, 1/3a y 1b/2. Por otro lado, estudios realizados en Pakistán por Idrees M et al en 2008, demostraron que el subtipo 3a (49.05%), el subtipo 3b (17.66%) y el subtipo 1a (8.35%) fueron los más frecuentes, aunque otros subtipos como el 2a, 1b, 4, 3c, 2b, 5a, 1c 6a y 2c fueron documentados en bajas frecuencias.

En reportes anteriores los genotipos 1 y 4 fueron considerados como los más patogénicos y más difíciles de tratar. La tasa de progresión a cronicidad después de una exposición aguda al VHC es significativamente más alta en pacientes expuestos a los genotipos 1b y 4, que en pacientes expuestos a otros genotipos. Además, pacientes infectados con tipos 1a y 1b tienen una enfermedad hepática más severa y una tasa más baja de respuesta a la terapia con interferón que aquellos pacientes infectados con los genotipos 2a y 2b (28).

Estudios recientes han mostrado que el éxito del tratamiento para el genotipo 4 es dependiente del protocolo utilizado, el cual se hace empleando INF pegilado y ribavirina. Sin embargo, se ha observado que los pacientes infectados con tipo 1 y 4 tienen cargas virales más altas que los pacientes infectados con otros genotipos (29). Nuestros resultados indican cargas virales más altas en el genotipo 1, y solo obtuvimos un paciente con genotipo 4, cuya carga viral tuvo

logaritmo de 4.39, que se ubica en un rango alto, pero no es el máximo encontrado es este estudio. La hepatitis por VHC tiene indicaciones muy claras que justifican el tratamiento, puesto que es una de las causas de morbilidad, y actualmente es la indicación más importante de trasplante hepático en el mundo. Tratada de forma temprana se puede evitar la progresión a cirrosis con descompensación hepática y el desarrollo de hepatocarcinoma y mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Sin duda todo paciente con hepatitis crónica producida por VHC debe ser investigado para definir si debe recibir tratamiento, aunque debido a que la respuesta al tratamiento de la hepatitis C es limitada, se han identificado factores de respuesta al tratamiento que ayudan a predecir quienes pueden obtener un mayor beneficio o lograr una curación definitiva.

En general, los dos predictores de respuesta al tratamiento más importante en su orden son el genotipo y la carga viral. En Latinoamérica, al igual que en Estados Unidos y Europa, predomina el genotipo 1, seguido de los genotipos 2 y 3. Los infectados con el tipo 1 son más resistentes al tratamiento y fallan más a la terapia actual, la cual se debe suministrar por 48 semanas. La carga viral antes del inicio del tratamiento es otro predictor importante de respuesta; si está muy elevada (más de 800000 UI/ml con un logaritmo de 5.90), la respuesta al tratamiento va a ser menor; su determinación a la semana 12 del tratamiento, especialmente en pacientes infectados con genotipo 1, es importante, puesto que si se observa un descenso de 2 log indica una respuesta favorable y la continuación del tratamiento (30). Nuestros resultados indican un mayor porcentaje de pacientes con cargas virales entre 4 y 6 logaritmos en el momento de realizarse el genotipo que generalmente se efectúa antes del inicio del tratamiento.

Aunque nuestros análisis de valores de carga viral no son estadísticamente representativos sí reportan algunas diferencias en cuanto a la variación de logaritmos entre las variables de sexo y subtipo viral. Esto permite inferir que los pacientes hombres infectados con subtipo b que presentan una carga viral elevada (rango de logaritmo entre 4 y 6) padecerán una enfermedad hepática más severa tal y como lo reportó Nizar et al, en 1996, en donde informan que las personas infectadas con el genotipo 1 tienen un nivel de viremia muy alto y la enfermedad hepática más severa. Un estudio en España mostró que la infección por este genotipo se asocia con cambios más severos de necrosis y fibrosis hepatocelular. Por otro lado, en un estudio adelantado en Colombia, se observó que las personas infectadas con genotipo 1b tuvieron un pro-

medio de carga viral más alto que los del grupo 1a, lo que quizá se puede atribuir a factores intrínsecos de replicación del virus y la capacidad de mutación del mismo. De igual forma, se evidenció que las lesiones histológicas más severas estuvieron en pacientes infectados con el genotipo 1b, en quienes el índice de Knodell fue mayor de 3.5 y que para el tipo 1a tuvo un índice de 2,0 (32). En los resultados obtenidos en nuestro estudio se observa una mayor frecuencia del subtipo 1b, lo cual se correlaciona con los estudios previos. Algunas investigaciones han identificado que pacientes cirróticos infectados con VHC tipo 1b portan un riesgo significativamente más alto de desarrollar carcinoma hepatocelular comparado con los infectados con otros tipos (33-34). En un estudio efectuado en Pakistán se evidenció que un 41 % de los pacientes con carcinoma hepatocelular portaban el genotipo 3a, lo cual sugiere que este tipo, al igual que los tipos 1a y 1b, pueden incrementar la oncogenicidad, aunque se debe tener en cuenta que el genotipo 3a es el más común en este país. Sin embargo, algunos estudios están en desacuerdo con esto y no han mostrado asociación (35). En este estudio la

detección de subtipos 3a y 4c se presentó de manera inusual y la información disponible de los casos no permitió realizar ningún tipo de asociación con otros aspectos clínicos.

En conclusión, es importante resaltar que los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan una frecuencia mayor del genotipo 1, subtipo 1b; una mayor incidencia de la infección por el virus de la hepatitis C en pacientes de sexo femenino, en el cual el grupo etáreo que tuvo mayor número de casos de infección es entre 45 y 64 años de edad, con un pico hacia los 60 años. En cuanto a los resultados de cargas virales, se evidenció: que sus valores más altos se encontraron en la población de sexo masculino (log entre 6 y 8); que el mayor número de pacientes de sexo femenino tuvo una carga viral entre 4 y 6 Log y que los pacientes infectados con el subtipo 1b presentaron una carga viral cuyos log se encuentran entre el rango de 4 a 6 log. Este trabajo evidencia la importancia de realizar la genotipificación del virus de la hepatitis C en nuestra población desde el momento en que se confirme la infección por pruebas moleculares y antes de dar inicio al esquema de tratamiento definido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B hepatitis genome. *Science* 1989, april 21; 244(4902): 359 - 362.
2. Zarkesh-Esfahani, Kardi M, Edalati M. Hepatitis C virus genotype frequency in Isfahan province of Iran: a descriptive cross-sectional study, *Virology Journal*. 2010, 7:69-74.
3. Tokita H, Okamoto H, Luengrojankul P, Vareesangthip K, Chainuvati T, Lizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Yamuyi H: Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth (6b), seventh (7c, 7d) and ninth (9b, 9c) major genetic groups. *J Gen Virol*. 1995, 76 (Pt9):2329-2335.
4. Sandres-Saune K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J: Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* 2003.109:(2)187-193.
5. Botero R, Idrovo V, et al. Genotipos de VHC. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 1998; XII: 25-27.
6. Ray KW. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes and infection*. 2002; 4:1219-1225.
7. Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SYW, Shapiro B, Pybus OG et al. (2009) The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: A phylodynamic and phylogeographic analysis. *PLoS Med* 6(12): e1000198. Doi:10.1371/journal.pmed.1000198.
8. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5:558-567.
9. Frank C, Mohammed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, et al. The role parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000; 355:887-891.
10. Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. Review article: chronic hepatitis C natural history and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005; 22 Suppl 2: 74-78.
11. McHutchison JG: Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care*. 2004, 10(2 suppl):S21-29.
12. De la Hoz F. Epidemiología de la hepatitis C en Colombia. *Consenso Colombiano de Hepatitis C. Repertorio de Medicina y Cirugía*. 2002; 11:9-14.
13. Wasley A, Alter M. Epidemiology of hepatitis C: Geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000; 20:1-16.
14. Pradat P, Trepo C. HCV: epidemiology, models of transmission and prevention of spread. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*. 2000; 14:201-210.
15. Beltrán O, Peñaloza F, Beltrán M. Consenso Colombiano de Hepatitis C. *Epidemiología y factores de riesgo. Rev Col Gastroenterol* 2004;19(3);Sup:S4-S8.
16. Maieron A, Metz-Gercek S, Hackl F, Luger C, Ziachehabi A, Strauss R, Schofl R, Mittermayer H. Chronic hepatitis C in Austria, 1992-2006: genotype distribution and demographic factors. *Euro Surveill*. 2010; 15(8):19492.
17. Hnatyszyn HJ: Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther* 2005, 10:1-11.
18. Zein NN: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000, 13:223-235.

19. Lee CM, Lu SH, Hung CH, et al. Hepatitis C virus genotypes in southern taiwan: prevalence and clinical implications. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 767-774.
20. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the study of liver disease, diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*. 2004; 39(4):1147-71.
21. Qui P, Cai XY, Ding W, Zhang Q, Norris ED and Greene J. HCV genotyping using statistical classification approach. *J Biomed Sci*. 2009. 16: 62.
22. Shobokshi OA, Serebour FE, Shakni LL: Hepatitis C genotypes/subtype among chronic hepatitis patients in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2003, 24(suppl2):S87-91.
23. Guerrini L, Gentili C, Guazzelli M. Alcohol consumption heavy drinking: a survey in three Italian villages. *Alcohol*. 2006;41(3):336-40.
24. 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(10):705-14.
25. Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in the United States in 1999-2002. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101(1):76-82.
26. Santos-Lopez G, Sosa-Jurado F, Vallejo-Ruiz V, Melendez-Mena D, Reyes-Leyva J. Prevalence of hepatitis C virus in the Mexican population : a systematic review. *J infect*. 2008, 56:281-290.
27. Sosa-Jurafó F, Santos-López G, Guzmán-Flores B, Ruíz-Conde J, Meléndez-Mena D, Vargas-Maldonado M et al. Hepatitis C virus infection in blood donors from the state of Puebla, México. *Virolo J*. 2010, 7:18.
28. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Persing DH: Hepatitis C virus genotypes in the United State: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative study group. *Ann Intern Med* 1996, 125(8):634-639.
29. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM, Porttahi IMR, Marshall DJ, Arruda MD et al. Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol*. 1998, 36(7):1895-1901.
30. Idrovo V. Aproximación Terapéutica a la Hepatitis por virus C. *Rev Col Gastroenterol*, 2006. 21(1): 30-34.
31. Nizar. NZ, Rakela J, Krawitt EL. Hepatitis C virus genotypes in the United States. Epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *Ann Intern Med*, 1996; 125:634-639.
32. Santamaria C, De Lima E. Holguin J. Hallazgos histológicos en infección crónica por el virus de la hepatitis C y su correlación con el genotipo viral, en Cali. *Colombia Med* 1998; 29:20-23.
33. Stankovic-Djordjevic D, Djordjevic N, Tasic G, Dinic M, Karanikolic A, Pesic M. Hepatitis C virus genotypes and the development of hepatocellular carcinoma. *J Dig Dis* 2007; 8:42-47.
34. Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta analysis. *J Hepatol* 2009; 50:1142-1154.
35. Idrees M, Rafique S, Rehman I, Akbar H, Yousab MZ, Butt S et al. Hepatitis C virus genotype 3a infection and hepatocellular carcinoma: Pakistan experience. *World J Gastroenterol* 2009 october 28; 15(40):5080-5085.

Occiequipo

Especialista en Financiación de Equipos Médicos

**Hay un equipo para usted,
hay un aliado que le ofrece
agilidad para conseguirlo.**

**Línea de Atención Especializada:
01 8000 514 652 o en Bogotá: 307 7027.
(Marcar opción 3 y luego opción 2).**



Banco de Occidente

Trabaja para usted.

Somos **AVAL**
Credencial