

~~T. 1322~~

BID. T 5854

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

 UNIVERSITAT DE VALÈNCIA REGISTRE GENERAL ENTRADA	<b>27 JUN. 2000</b>
	N.º <u>90847</u> HORA <u>1550</u> OFICINA AUXILIAR NÚM. 9

**PREVALENCIA DE MARCADORES**

**SEROLOGICOS DE INFECCION POR EL VIRUS**

**DE LA HEPATITIS C EN UNA POBLACION**

**ESCOLAR DE L'ALCUDIA (VALENCIA)**



**TESIS DOCTORAL**

**Trabajo presentado por: D. VICENTE ABRIL LOPEZ DE  
 MEDRANO para optar al grado de DOCTOR EN  
 MEDICINA Y CIRUGIA**

**Valencia- 2000**



D. 991 854  
 L. 1375495

R- 62. 035

UMI Number: U607522

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607522

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA DE VALÈNCIA



En el día de hoy se ha procedido a la lectura de la tesis titulada:

PREVALENCIA DE MARCADORES SEROLOGICOS DE INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN UNA POBLACION ESCOLAR DE L'ALCUDIA (VALENCIA)

de D. VICENTE ABRIL LOPEZ DE MEDRANO que ha obtenido la calificación de

Firmado El Presidente del Tribunal, Dr. D. MIGUEL PEREZ-MATEO AFOADOR

El Secretario, Dr. D. JUAN DEL OLMO PULHAT

El Vocal Dr. D. SANTIAGO NOGUÈ XARAU

El Vocal Dr. D. JOSE M. NOGUEIRA COITO

El Vocal Dr. D.

Valencia 26 de SEPTIEMBRE de 2000

El Secretario del Tribunal

El Presidente

El Vocal

El Vocal

El Vocal

Firma del Alumno

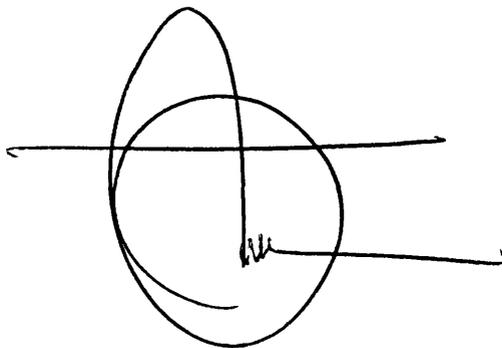
D. AGUSTIN HERRERA BALLESTER, Doctor en Medicina y Cirugía,  
Profesor Asociado del Departamento de Medicina y Jefe del Servicio de  
Medicina Interna del Hospital General Universitario de Valencia

INFORMA QUE:

El trabajo de investigación titulado:

“ Prevalencia de marcadores serológicos de infección por el Virus de la  
Hepatitis C en una población escolar de L'Alcudia (Valencia)”

realizado por el licenciado D. VICENTE ABRIL LOPEZ DE MEDRANO,  
para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, y del que soy CO-  
DIRECTOR cuenta con mi aprobación y autorización para que se proceda a su  
presentación y defensa pública.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'V' shape with a horizontal line through it, and a smaller, more complex signature below it.

Valencia, a 7 de junio de 2000

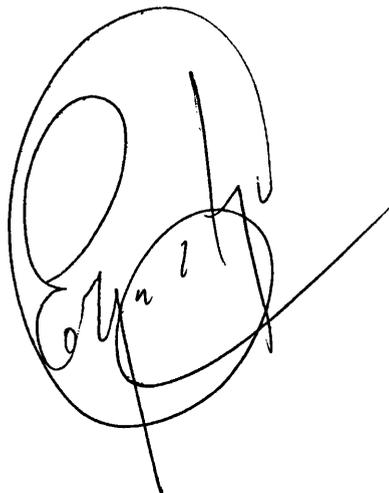
D. ENRIQUE ORTEGA GONZALEZ, Doctor en Medicina y Cirugía,  
Profesor Asociado del Departamento de Medicina y Jefe de la Unidad de  
Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Valencia

INFORMA QUE:

El trabajo de investigación titulado:

“ Prevalencia de marcadores serológicos de infección por el Virus de la  
Hepatitis C en una población escolar de L'Alcudia (Valencia)”

realizado por el licenciado D. VICENTE ABRIL LOPEZ DE MEDRANO,  
para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, y del que soy CO-  
DIRECTOR cuenta con mi aprobación y autorización para que se proceda a su  
presentación y defensa pública.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Enrique Ortega González', enclosed within a large, irregular oval scribble. A long, thin diagonal line extends from the bottom right of the signature area.

Valencia, a 7 de junio de 2000

D. MIGUEL ANGEL SERRA DESFILIS, Doctor en Medicina y Cirugía y

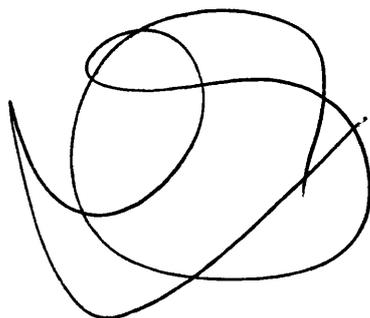
Profesor Titular del Departamento de Medicina

INFORMA QUE:

El trabajo de investigación titulado:

“ Prevalencia de marcadores serológicos de infección por el Virus de la Hepatitis C en una población escolar de L'Alcudia (Valencia)”

realizado por el licenciado D. VICENTE ABRIL LOPEZ DE MEDRANO, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, y del que soy TUTOR cuenta con mi aprobación y autorización para que se proceda a su presentación y defensa pública.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and curves, centered on the page.

Valencia, a 7 de junio de 2000

# DEDICATORIA

A mi padre, Vicente (*in memoriam*), y a mi madre, Susy, que me ayudaron a ser médico.

A mi hijo Pablo y a mi mujer, Pilar, por todo el tiempo que les he robado.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis directores, los doctores Agustín Herrera Ballester y Enrique Ortega González, por sus valiosos consejos y su continuo apoyo y estímulo para la realización de este trabajo. También por lo mucho que me han enseñado desde que comenzó mi vida profesional y por brindarme su amistad.

A las doctoras Concepción y Teresa Tuset de la Sección de Inmunología, por su desinteresada ayuda en la realización de las técnicas serológicas. También, por supuesto, al doctor Vicente Monzó del Servicio de Análisis Clínicos que procesó la bioquímica de las muestras y participó activamente en su recolección y en el diseño de este trabajo. Mi gratitud al doctor Montoro del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana por proporcionarnos amablemente los informes de los donantes.

A mi amiga la doctora Pilar Segarra, por su inestimable ayuda en la investigación bibliográfica y el proceso de textos, y al doctor Francisco Pedro y al Servicio de Investigación por su experta colaboración en el tratamiento estadístico de los datos.

A todos mis compañeros / as de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y el Servicio de Medicina Interna del Hospital General Universitario de Valencia por su apoyo y comprensión.

Finalmente al Exmo. Ayuntamiento de L'Alcudia sin cuya iniciativa y colaboración nunca hubiera sido posible este trabajo.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>1.- HEPATITIS VIRICAS</b>	<b>1</b>
<b>2.- VIRUS DE LA HEPATITIS C</b>	<b>5</b>
<b>2.1.- DESCRIPCION DEL VIRUS: ESTRUCTURA ANTIGENICA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA</b>	<b>5</b>
<b>2.2.- DIVERSIDAD GENETICA Y GENOTIPOS DEL VHC</b>	<b>8</b>
<b>2.3.- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA HEPATITIS C</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1. INFECCIÓN AGUDA</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2. INFECCIÓN CRÓNICA</b>	<b>15</b>
<b>2.4. DIAGNÓSTICO</b>	<b>19</b>
<b>2.4.1 TÉCNICAS SEROLÓGICAS</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1.1 Técnicas de cribado</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1.2.- Detección de anticuerpos de tipo IgM frente al VHC</b>	<b>22</b>
<b>2.4.1.3.- Técnicas de confirmación</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>24</b>
<b>2.5.- EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>26</b>
<b>2.5.1. DATOS GLOBALES</b>	<b>26</b>

2.5.2.- SITUACIÓN EN ESPAÑA	28
2.5.3.- SITUACIÓN EN LA COMUNIDAD VALENCIANA	29
2.5.4.- GRUPOS DE RIESGO DE INFECCION POR EL VHC	30
<b>2.6.- MECANISMOS DE TRANSMISIÓN</b>	<b>31</b>
2.6.1.- TRANSMISIÓN PARENTERAL	32
2.6.2.- TRANSMISIÓN NO PARENTERAL	34
<b>3.- LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA INFANCIA</b>	<b>37</b>
<b>3.1.- EPIDEMIOLOGIA</b>	<b>37</b>
3.1.1. SITUACIÓN EN ESPAÑA	40
<b>3.2.- MECANISMOS DE INFECCIÓN</b>	<b>40</b>
3.2.1. TRANSMISIÓN PARENTERAL	41
3.2.2.- TRANSMISIÓN PERINATAL	42
3.2.3. TRANSMISIÓN INTRAFAMILIAR	45
<b>3.3. DIAGNOSTICO</b>	<b>46</b>
<b>3.4.- HISTORIA NATURAL</b>	<b>46</b>

<b>II. OBJETIVOS</b>	50
<b>1.- OBJETIVOS PRIMARIOS</b>	50
<b>2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS</b>	51
<b>III. MATERIAL Y METODOS</b>	52
<b>1.- SUJETOS DE ESTUDIO</b>	52
<b>2.- MÉTODOS</b>	52
<b>2.1.- RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS</b>	57
<b>2.2.- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS</b>	58
<b>2.2.1.- TRANSAMINASAS</b>	58
<b>2.2.2. OTRAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	58
<b>2.2.3.- MARCADORES DE INFECCIÓN POR EL VHC</b>	59
<b>2.2.3.1. Métodos serológicos</b>	59
<u>2.2.3.1.1 Técnica de cribado</u>	59

<u>2.2.3.1.2. Técnica de confirmación</u>	60
<b>2.2.3.2. Métodos de biología molecular</b>	62
<u>2.2.3.2.1. Detección por PCR del RNA del</u> <u>VHC</u>	62
<b>2.2.- DEFINICIÓN DE CASO</b>	64
<b>2.3.- DEFINICION DE LOS CRITERIOS</b>	64
<b>DIAGNOSTICOS DE INFECCION ACTUAL POR EL</b> <b>VHC</b>	
<b>2.4.- ANALISIS ESTADISTICO</b>	64
<b>2.5.- ESTUDIO DE LOS DONANTES DE L' ALCUDIA</b> <b>Y PUEBLOS COLINDANTES</b>	66
<b>2.6.- ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES ASPECTOS</b> <b>DEMOGRAFICOS Y SOCIO-ECONOMICOS DE</b> <b>L'ALCUDIA</b>	66
<b>IV. RESULTADOS</b>	67
<b>1.- SUJETOS DEL ESTUDIO</b>	67
<b>1.1.- DATOS DEMOGRÁFICOS</b>	67
<b>1.2.- DATOS DE LA ANAMNESIS</b>	74
<b>1.3.- DATOS BIOLÓGICOS</b>	74

<b>1.4.- ESTUDIO DE LOS CASOS</b>	<b>81</b>
<b>1.4.1.- ESTUDIO DE LOS FAMILIARES DE PRIMER GRADO CONVIVIENTES CON LOS CASOS</b>	<b>85</b>
<b>2.- SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VHC POR EIA EN LOS ESCOLARES DE L' ALCUDIA</b>	<b>89</b>
<b>3.- PREVALENCIA DE INFECCION ACTIVA POR EL VHC EN LOS ESCOLARES DE L'ALCUDIA</b>	<b>89</b>
<b>4.- SEROPREVALENCIA DE MARCADORES DE INFECCION POR EL VHC EN LOS DONANTES DE SANGRE NUEVOS DE L' ALCUDIA Y LOS PUEBLOS COLINDANTES</b>	<b>90</b>
<b>5.- DATOS DEL MUNICIPIO ESTUDIADO</b>	<b>92</b>
<b>V. DISCUSION</b>	<b>107</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>120</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>121</b>

# INTRODUCCION

# I. INTRODUCCION

## 1.- HEPATITIS VIRICAS

La hepatitis viral es una enfermedad conocida desde tiempos muy antiguos. En el *Corpus Hipocraticum* hace más de 2000 años ya se describe la ictericia infecciosa, y desde entonces han sido numerosas las descripciones de epidemias, fundamentalmente en épocas de guerra.

La hepatitis vírica se define como una enfermedad infecciosa del hígado causada por diversos virus y caracterizada por diferentes grados de inflamación hepática.

Desde que en 1964 Blumberg identificara en la sangre el antígeno de superficie del virus causante de la hepatitis B, que denominó antígeno Australia, se ha producido un enorme avance en el conocimiento de la estructura y características de los distintos virus hepatotropos y se han desarrollado marcadores muy sensibles para su diagnóstico.

Las hepatitis víricas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (1). No obstante, la prevalencia de infección por los virus de la hepatitis, así como la importancia relativa de los distintos tipos existentes, varía según las áreas geográficas, y la incidencia real es desconocida debido al gran número de infecciones asintomáticas y formas anictéricas.

Clásicamente, el término de hepatitis vírica se reserva para las infecciones causadas por un grupo de virus hepatotropos denominados virus de la hepatitis. Los agentes causales de hepatitis víricas conocidos en la actualidad son cinco principalmente: virus A de la hepatitis (VHA), virus B de la hepatitis (VHB), el virus delta (VHD) y al menos dos virus englobados en el grupo de los virus no A no B de la hepatitis (virus E de la Hepatitis -VHE- y virus C de la Hepatitis -VHC-). No obstante, otros virus, entre los que destacan el Citomegalovirus, el virus de Epstein-Barr, el virus de la Varicela-Zóster y el virus del Herpes Simple, pueden afectar al hígado y ocasionar un cuadro similar.

La hepatitis A está causada por un virus ARN de cadena única, un *picornavirus*. Se transmite sobre todo por contacto fecal-oral, aunque también pueden ser infecciosas la sangre y las secreciones. El periodo de incubación oscila entre 2 y 6 semanas, y afecta predominantemente a niños y adultos jóvenes. Con gran frecuencia produce formas subclínicas o anictéricas, y de forma excepcional causa formas fulminantes, en pacientes ancianos o con enfermedad hepática subyacente. El virus siempre desaparece una vez resuelta la infección aguda, y a diferencia de lo que ocurre con el VHB y el VHC, el VHA no induce estados crónicos de portador y no produce hepatitis crónicas ni cirrosis.

La hepatitis B está causada por un virus envuelto con ADN de doble cadena, que se clasifica como un *hepadnavirus*. Se transmite por vía parenteral – transfusiones de sangre y hemoderivados contaminados, o uso compartido de jeringuillas –, por contacto sexual, y por transmisión perinatal. El periodo de incubación varía de 6 a 25 semanas. En el 5-10% de los casos hay una progresión a la cronicidad en forma de hepatitis persistente, hepatitis crónica activa con eventual evolución a cirrosis o un estado de portador crónico asintomático del VHB. Aproximadamente un 50% de los casos de hepatitis fulminante están causados por el VHB, aunque una gran proporción de estos se asocian a infección por el VHD. Las formas crónicas, al igual que ocurre con el VHC, pueden desarrollar carcinoma hepatocelular. Actualmente está disminuyendo la incidencia de hepatitis B, fundamentalmente por el uso extendido de la vacunación.

La hepatitis C, que supone aproximadamente el 90% de todas las hepatitis No A No B, está causada por un virus ARN envuelto, un *flavivirus*, y se tratará con mayor extensión posteriormente.

El virus de la hepatitis G se incluye también entre los no A no B. Es también un *flavivirus* y hasta la fecha, sólo puede ser identificado mediante técnicas moleculares de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Su papel patógeno real en las hepatitis agudas, y el modo de transmisión aún no se han establecido claramente, aunque éste último parece paralelo al VHC.

La hepatitis D o delta está causada por un virus ARN defectivo, clasificado como *viroide* que depende de la replicación activa del VHB, dado que éste provee de envoltura al genoma del VHD. Se transmite por las mismas vías que el VHB. Es la causa del 40% de las hepatitis fulminantes, y es capaz de producir hepatitis crónicas.

El virus de la hepatitis E (VHE) es un virus ARN de cadena única, no envuelto, que se clasifica entre los *alfavirus*. Se transmite por vía fecal-oral, predominantemente a través de agua contaminada. Aunque se ha descrito en todo el mundo, afecta fundamentalmente a países en desarrollo produciendo brotes epidémicos. La hepatitis E evoluciona a fallo hepático fulminante en 1-2% de todos los casos, pero supone hasta el 20% de los casos que afectan a mujeres gestantes. Al igual que la HVA, no evoluciona hacia la cronicidad.

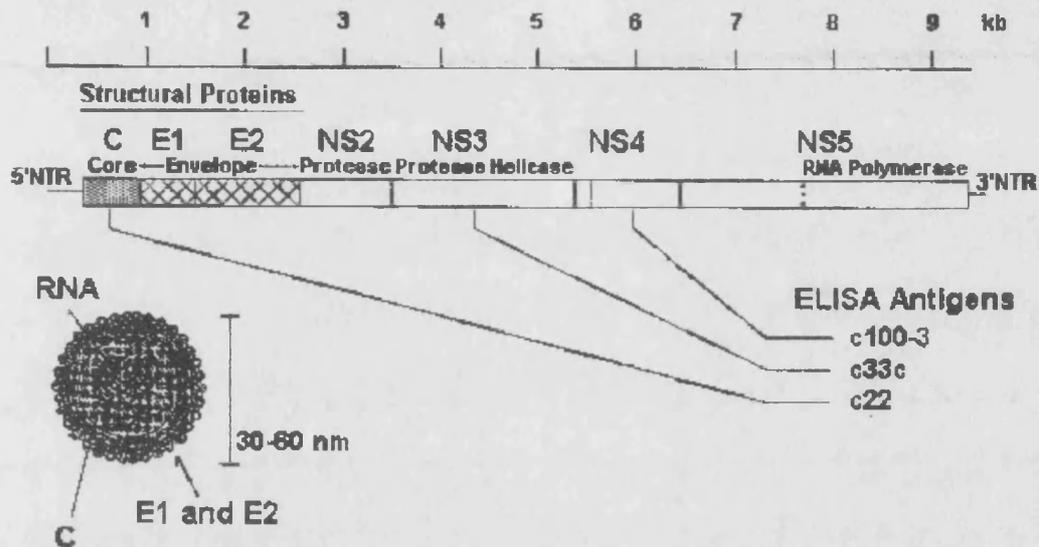
## **2.- VIRUS DE LA HEPATITIS C**

Los primeros indicios de la existencia del VHC se deben a los estudios de Bradley y cols. en 1985, quienes demostraron la existencia de agentes formadores de túbulos (lesión estructural característica de las células infectadas por virus no-A no-B), unos sensibles y otros resistentes al cloroformo (2). Los estudios experimentales realizados en chimpancés mediante la inoculación de material infeccioso, el estudio físico-químico de los inóculos utilizados y el estudio del hígado mediante microscopía electrónica, sugirieron la existencia de diversos virus no-A no B.

### **2.1.- DESCRIPCION DEL VIRUS: ESTRUCTURA ANTIGENICA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA**

La identificación definitiva del VHC se debe a los esfuerzos de un grupo de investigadores de la Chiron Corporation que, en colaboración con los Center for Diseases Control (CDC) de Atlanta (EE.UU), consiguieron mediante estudios de biología molecular clonar el genoma del virus C, empleando plasma de chimpancés infectados experimentalmente (3). Dicho genoma está constituido por una cadena de RNA monocatenario, de polaridad positiva, formado por 9400 nucleótidos, con capacidad para codificar, a través de una región de lectura abierta (ORF: *Open Reading Frame*), un polipéptido de aproximadamente 3010 aminoácidos, el cual incluye péptidos estructurales

(nucleocápside y envoltura) y péptidos no estructurales (NS2 a NS5). La estructura antigénica del VHC se esquematiza en la siguiente figura.



**Figura 1.- Estructura Antigénica del Virus de la Hepatitis C** (tomada de Mandell, Douglas and Bennet's Principles and practice of infectious diseases, 4<sup>th</sup> edition. Churchill Livingstone Inc. 1995)

Como vemos, en el genoma del VHC existen diferentes regiones que codifican tanto para componentes de la envoltura como de la nucleocápside, así como para otros elementos enzimáticos que desempeñan un importante papel en el ensamblaje del virus durante su replicación (4).

Precediendo a la zona de lectura abierta, en el extremo 5' se encuentra una zona no codificante, con aproximadamente 340 nucleótidos, que está muy conservada en los diferentes aislados del virus. Esta estabilidad de la región 5' hace aconsejable, cuando se emplean técnicas de amplificación génica para el

diagnóstico de la infección por VHC, utilizar como iniciadores secuencias de nucleótidos de esta región.

La zona de lectura abierta se puede dividir en dos regiones que codifican proteínas estructurales (E) y no estructurales (NS):

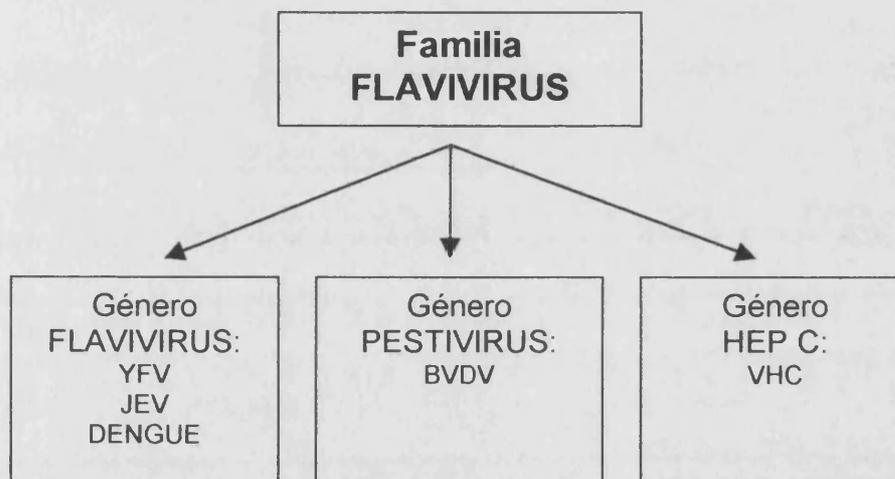
a) Cerca del extremo 5' se encuentra la región que codifica proteínas estructurales:

1. Región C: codifica la síntesis de las proteínas del core, una proteína no glucosilada básica (p22) que corresponde a los componentes de la nucleocápside del virus.
2. Regiones E1 y E2: codifican las glucoproteínas de superficie gp33-35 y gp70 respectivamente.

b) Cerca del extremo 3' de la zona de lectura abierta están las regiones encargadas de codificar proteínas no estructurales; NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b. Las funciones de todas estas proteínas todavía no son conocidas del todo, aunque sí se sabe que la región NS3 codifica una seroproteína y una helicasa encargadas del procesamiento de la poliproteína inicial, mientras que la región NS5 codifica una ARN polimerasa ARN-dependiente, encargada de la replicación viral.

El virus tiene un tamaño estimado de 30-50 nm de diámetro y posee una cápsula lipídica, sensible al calor y al cloroformo. Tiene capacidad para formar

los característicos túbulos citoplasmáticos, visibles con microscopía electrónica en el citoplasma de los hepatocitos de chimpancés infectados, aunque este hecho no ha sido probado en humanos. Las características virológicas del VHC lo clasifican dentro de la familia *Flaviviridae*, recordando parcialmente al virus de la Fiebre Amarilla. En cualquier caso, el genoma descrito tiene peculiaridades y diferencias suficientes como para conformar un género propio: el género *HepC* (Fig 2).



**Fig 2.- Taxonomía del VHC** YFV: Virus de la Fiebre Amarilla. JEV: Virus de la Encefalitis Japonesa

## 2.2.- DIVERSIDAD GENÉTICA Y GENOTIPOS DEL VHC

Desde el descubrimiento del VHC se ha secuenciado su genoma completo y se ha definido la estructura de este, que consiste en una molécula de ARN monocatenario de 9400 nucleótidos y polaridad positiva.

La mayoría de los virus suelen cambiar y evolucionar por mecanismos genéticos (5). El VHC lo hace principalmente por mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos, ya que es un virus ARN y se replica a través de una ARN polimerasa ARN dependiente sin capacidad de corrección de errores. Por ello, la tasa de mutación espontánea del VHC es muy elevada, del orden de 1 por cada  $10^4$ - $10^5$  nucleótidos, lo que puede significar casi una mutación por cada genoma completo transcrito. Como las divergencias entre los especímenes del VHC pertenecientes a un genotipo o un subtipo aislados en un mismo huésped pueden no ser suficientes para definir un genotipo diferente, estas diferencias intragenotípicas se denominan *cuasiespecies* (6,7). El concepto de cuasiespecie hace referencia, pues, a las distintas variantes genéticas aparecidas alrededor de una "secuencia máster". La elevada mutabilidad y tasas de replicación del VHC explican su gran variabilidad genética y una de las principales características del VHC: la gran heterogeneidad de su genoma (8).

En la actualidad se conocen, al menos, las secuencias genómicas completas de 15 VHC distintos, las cuáles difieren entre sí hasta en un 33% (9). Estos distintos genomas se han clasificado basándose en la similitud de sus secuencias. Entre las diferentes clasificaciones, la más aceptada es la de Simmonds y cols. de 1994 que se basa en la similitud de la secuencia de nucleótidos (10). Los grandes grupos de secuencias se denominan *tipos* y las variantes muy relacionadas dentro de los mismos se denominan *subtipos*. Por otro lado, los tipos del VHC se numeran por orden de descubrimiento con números arábigos y los subtipos se identifican con letra minúscula, también por

orden de descubrimiento. Se distinguen al menos seis genotipos (1 a 6), divididos a su vez en distintos subtipos (11). La distribución geográfica de los distintos genotipos a escala mundial se muestra en la siguiente tabla 1:

<b>Genotipo</b>	<b>Distribución geográfica</b>
<i>1 a</i>	EEUU, Alemania, Italia, España, Japón, Escocia
<i>1 b</i>	Japón, España, Alemania, Taiwan, China
<i>1 c</i>	Líbano
<i>2 a</i>	Japón, EEUU, Escocia, España
<i>2 b</i>	EEUU; Japón, Escocia
<i>2 c</i>	Argentina, Italia, Escocia
<i>3 a</i>	Alemania, EEUU, Escocia, Italia, Suecia, España
<i>3 b</i>	Tailandia
<i>4 a</i>	Egipto, España, Oriente Medio, Zaire
<i>...4 k</i>	Oceanía
<i>5 a</i>	Sudáfrica
<i>6 a</i>	Hong-Kong

**Tabla 1.- Clasificación y distribución geográfica de los genotipos del VHC**

El interés del tipaje en el VHC no es exclusivamente académico o taxonómico, sino que también tiene relevancia en la práctica clínica. En este

sentido, el subtipo 1b del VHC tiene una peor respuesta al interferón alfa que otros subtipos (12). Además, se conoce que algunos subtipos particulares del VHC son predominantes en una población concreta o en un área geográfica, o incluso entre pacientes que pertenecen a un determinado grupo de riesgo (por ejemplo, el genotipo 3 del VHC entre los drogadictos del sur de Europa) (12, 13).

Los estudios de secuenciación en nuestro país (14) han demostrado la existencia de una homología en la región NS3 entre los aislados de muestras españolas y el aislado en EE.UU y Japón del 80 y 91% respectivamente. La mayoría de estas diferencias son debidas a cambios conservativos en la secuencia de nucleótidos, que no se traducen en un cambio en los aminoácidos de las proteínas codificadas por estas regiones. Por el contrario, la región 5'UTR muestra una homología cercana al 100% respecto a otras secuencias conocidas. En España, parece existir un gran predominio del genotipo 1b, exceptuando aquellos pacientes que han adquirido la infección a través de la drogadicción en los cuáles, como hemos dicho, parece más predominante el tipo 3.

Se ha comprobado también, que en una misma región geográfica puede detectarse más de un genotipo, e incluso que un mismo paciente pueda estar infectado por más de un genotipo (15).

## **2.3.- ASPECTOS CLÍNICOS DE LA HEPATITIS C**

A pesar de que los diferentes virus causantes de hepatitis pueden distinguirse por sus propiedades antigénicas y moleculares, todas las hepatitis víricas agudas producen un cuadro clínico semejante.

La infección aguda puede variar desde formas asintomáticas hasta infecciones fulminantes, comunes a todos los virus. Las formas crónicas, propias de los VHB, VHC y VHD, se presentan desde infecciones subclínicas persistentes hasta cuadros que progresan, con mayor o menor celeridad, a cirrosis e incluso a carcinoma hepatocelular.

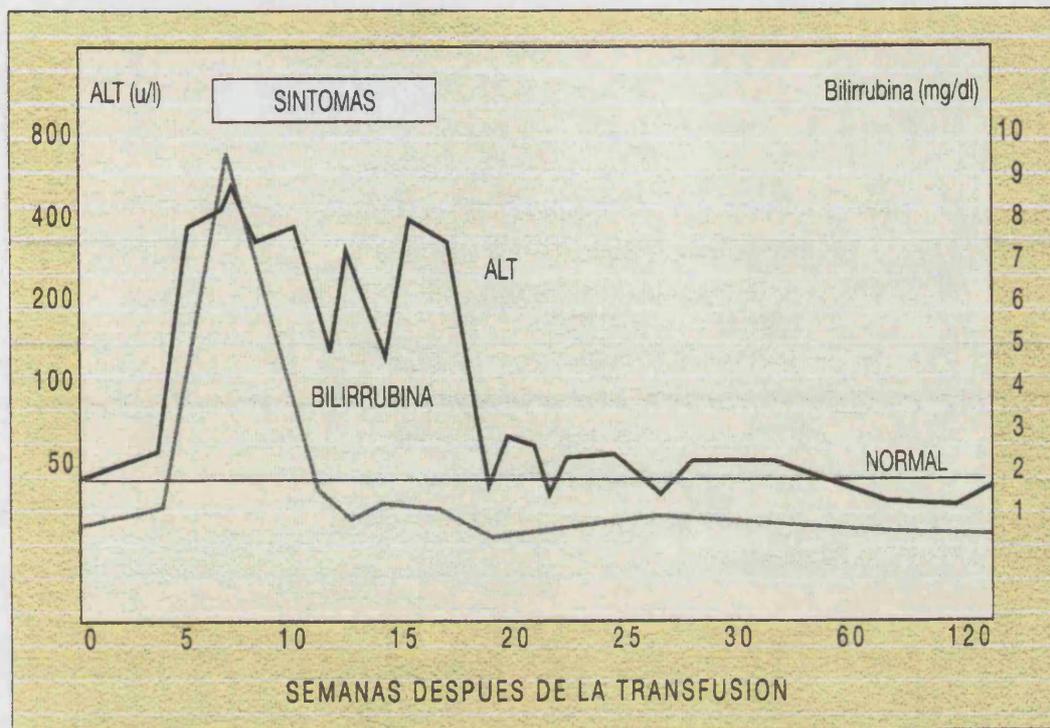
Clínicamente la hepatitis C es indistinguible de otros tipos de hepatitis viral, por la ausencia de manifestaciones específicas.

### **2.3.1. INFECCIÓN AGUDA**

Las formas agudas suelen ser poco habituales (10%) y escasamente graves. Por otra parte, la hepatitis C es asintomática en el 95% de los casos por lo que la verdadera frecuencia de hepatitis aguda por VHC no se conoce. El período de incubación medio es de 6 a 7 semanas, aunque se han descrito períodos más cortos (2 semanas) e incluso tan prolongados como 6 meses (16). El período de incubación de las formas postransfusionales parece ser más corto.

En la mayoría de los pacientes la sintomatología es leve o ausente aunque de forma muy infrecuente puede verse casos de hepatitis fulminante. Sólo en el 25% de los casos aparece ictericia. La enfermedad aguda suele ser menos severa que la que se produce en la hepatitis B, con elevaciones de las transaminasas habitualmente más moderadas que en ésta. El pico máximo de alanino-amino-transferasa (ALT) suele alcanzarse entre los 30-60 días postinfección, coincidiendo con el periodo de inflamación aguda del hígado.

Puede detectarse viremia a partir de 1 a 3 semanas después de una transfusión contaminada con virus C. En este momento, la detección del ARN del VHC es el método más sensible para el diagnóstico precoz de la infección. La aparición de anticuerpos es más tardía. En la figura siguiente se esquematiza la evolución clínico-biológica típica de una hepatitis C aguda postransfusional:



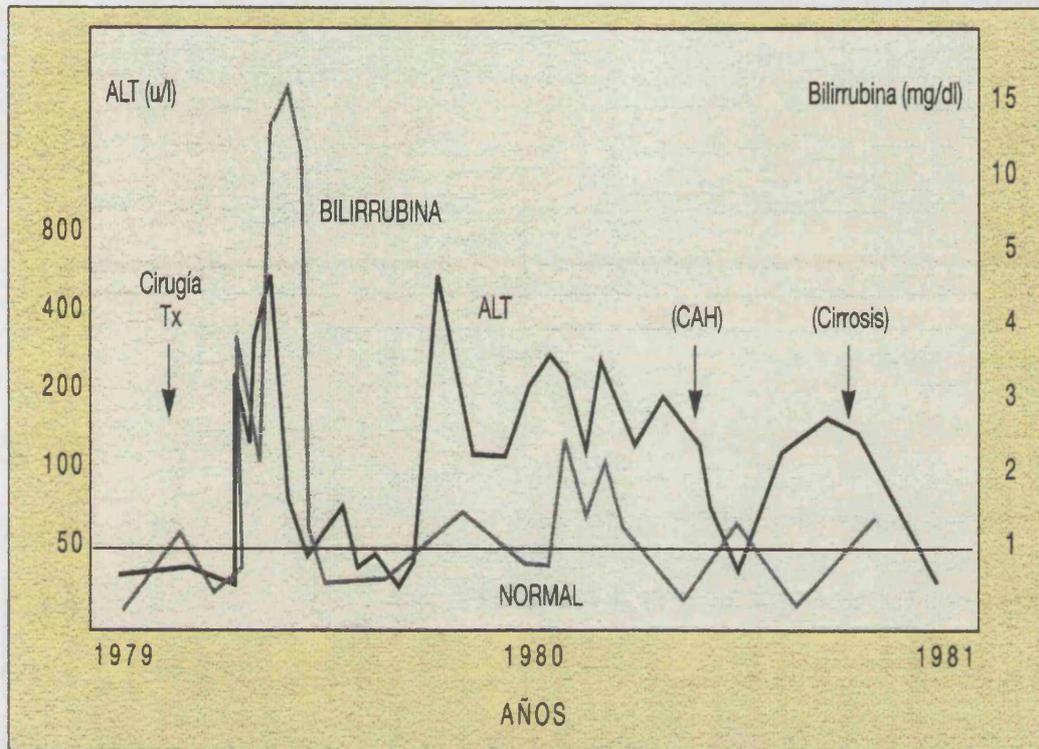
**Figura 2. Curso clínico típico de la hepatitis aguda C postransfusional** (tomado de Anónimo. Actualización de Hepatitis Virales (1997). Schering Plough, S.A.)

### 2.3.2. INFECCIÓN CRÓNICA

La mayor importancia de la hepatitis C es su posible evolución a la cronicidad. Aunque la resolución definitiva de la enfermedad es posible, el hecho más significativo es la frecuencia con que los enfermos desarrollan hepatopatía crónica, estimada en un 70-80%. La hepatitis crónica C es una enfermedad de curso clínico silente, muchas veces diagnosticada por una hipertransaminasemia descubierta en una analítica de rutina (reconocimiento de empresas, preoperatorio,...). Estos pacientes tendrán niveles de

transaminasas persistentemente elevados, si bien son características las fluctuaciones con períodos en los cuáles las transaminasas pueden ser normales o estar sólo discretamente aumentadas.

Un porcentaje inferior al 10% de los pacientes con infección crónica por el VHC quedará en estado de *portador sano*, entendiendo como tal la presencia de viremia plasmática del VHC con niveles normales de transaminasas y biopsia hepática que demuestre la ausencia de inflamación hepática (17). Lo más frecuente, no obstante, es la progresión hasta la cirrosis en un periodo medio de 20 o 30 años, dependiente de diversos factores: sexo, genotipo viral, carga viral plasmática del VHC, toma concomitante de alcohol, etc. De hecho, aunque muchos enfermos están asintomáticos, el 60% de los enfermos biopsiados tienen una hepatitis crónica activa y el 10-20% cirrosis. La cirrosis aparece en los 20 años siguientes a la infección en aproximadamente el 20% de los adultos infectados, mientras que 10% de los pacientes con cirrosis desarrollarán un hepatocarcinoma (18). En la figura 3 se esquematiza el desarrollo típico de una hepatitis crónica por VHC



**Fig. 3.- Curso clínico habitual de la hepatitis crónica por VHC** (tomado de Anónimo. Actualización de Hepatitis Virales (1997). Schering Plough, S.A.)

La práctica repetida de biopsias hepáticas muestra una gran heterogeneidad entre los pacientes infectados crónicamente por VHC. Así, pueden observarse lesiones hepáticas muy diversas que se extienden desde escasos cambios histológicos, mínimos e inespecíficos, hasta la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular primitivo e incluyen todas las variedades de hepatitis crónica (19). Las alteraciones portales y periportales definen los distintos tipos de hepatitis crónica, de intensidad muy variable entre los distintos pacientes y en distintos momentos evolutivos en un mismo paciente.

Durante muchos años, se han venido distinguiendo dos categorías de hepatitis crónica: la hepatitis crónica persistente – más leve, con inflamación limitada al espacio porta – y la hepatitis crónica activa – con extensión periportal de los fenómenos necro-inflamatorios -, aunque existen otras variedades histológicas como la hepatitis crónica lobulillar – cambios similares a una hepatitis aguda – y la hepatitis crónica septal – correspondiente a lesiones residuales o períodos de quiescencia – (20). En algunos casos las lesiones se mantienen estables durante años, en otros empeoran progresivamente y en otros alternan fases de empeoramiento y de mejoría. La progresión a cirrosis parece producirse de forma gradual, por lo que la proporción de pacientes cirróticos aumenta con el paso de los años. No se han comprobado diferencias claras en la evolución entre los pacientes con hepatitis por VHC adquirida por transfusión y la de adquisición esporádica (21).

Con independencia de la progresión histológica, que puede ser muy evolucionada incluso en pacientes totalmente asintomáticos y con ALT normales, las manifestaciones clínicas de la hepatitis crónica por VHC se mantienen modestas a lo largo de los años. La mayoría de los pacientes siguen libres de síntomas o con mínimas molestias inespecíficas que rara vez interfieren con su actividad cotidiana. Esta ausencia de síntomas se comprueba no sólo en los pacientes que presentan lesiones hepáticas estables y mínimas sino también en los que progresan a cirrosis, por lo que permanecer asintomático no garantiza una evolución favorable.

La gran mayoría de los pacientes con hepatocarcinoma asociado al VHC padecen cirrosis. Sin embargo, aproximadamente un 3% de los hepatocarcinomas se desarrollan sobre hígados no cirróticos, lo que hace pensar en un efecto oncogénico directo del VHC. El intervalo entre la infección por VHC y la aparición del hepatocarcinoma es de 7 a 25 años.

Para terminar, es probable que la aparición de mutantes que escapen a la vigilancia del sistema inmune explique en muchos casos la persistencia de la infección (22). Como hemos dicho, la variabilidad genética del VHC alcanza valores del 33% de diferencia de nucleótidos entre las variantes más distantes. Esta heterogeneidad o “flexibilidad” genética permite al VHC desarrollar una adaptación rápida al medio externo, lo que supone entre otras la posibilidad de escapar a la acción del sistema inmune o a la acción de fármacos antivíricos. Es asimismo posible que la infección por variantes genéticas con distinta capacidad aparecidas en el curso de la infección crónica bajo la presión del sistema inmune o adquiridas en el momento del contagio, pueda contribuir a explicar la marcada variabilidad evolutiva de la infección crónica por VHC (23).

## **2.4. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la infección por el VHC se basa en métodos serológicos y/o de biología molecular.

## **2.4.1 TÉCNICAS SEROLÓGICAS**

Se basan en la detección de los anticuerpos específicos frente al VHC presentes en la sangre y en otros fluidos.

Distinguimos:

### **2.4.1.1 Técnicas de cribado**

La detección del VHC desde su descubrimiento hasta nuestros días se ha basado en la detección de anticuerpos directos de la clase IgG frente al clon 5-1-1. El antígeno utilizado es la proteína C 100-3, consistente en 363 aminoácidos codificados por la región NS4 del genoma del VHC (24). La detección de este antígeno ha constituido la base serológica de las primeras pruebas de enzimoimmunoanálisis (EIA) (pruebas de primera generación). La sensibilidad de las pruebas de primera generación en la detección de la infección por el VHC oscila aproximadamente entre el 45% y el 89%. Esta variación depende de los grupos de riesgo evaluados, presentando un elevado índice de falsos positivos y negativos, particularmente en el grupo de donantes de sangre. En este sentido, algunos estudios indican que sólo de un 25% a un 40% de los donantes de sangre positivos por pruebas de primera generación son capaces de transmitir la infección del VHC (25,26). Las pruebas serológicas de primera generación son poco útiles en el diagnóstico de la hepatitis aguda postransfusional, ya que los anticuerpos se detectan tardíamente, en torno a las 20 semanas (62%) después de la transfusión y en

algunos casos, al año. Por otro lado, la prevalencia del anti-VHC de primera generación oscilaba entre un 45% y un 8% en la hepatitis crónica no-A no-B. Ello debido a la ausencia, en algunos casos, del anti-C 100-3 como evolución natural de la enfermedad (27).

Las pruebas serológicas de primera generación mostraban, también, una baja especificidad debido a varios factores como la deficiente conservación de los sueros (28), a sueros de pacientes de comunidades tropicales (29), a sueros de pacientes con hiperglobulinemia autoinmune y factor reumatoide (30) e incluso en pacientes vacunados previamente contra la gripe (31).

Debido a la baja sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas de primera generación, se investigaron otras proteínas con capacidad potencial para detectar más precozmente la infección aguda, así como con mayor fiabilidad la infección crónica. La incorporación de estas nuevas proteínas dio lugar a las pruebas serológicas de segunda generación. Estas nuevas proteínas fueron la C22, derivada de la región de la nucleocápside, la C33, derivada de la región NS3 y la C200, combinación de C33 y C100-3.

Las pruebas serológicas de segunda generación aumentaron la sensibilidad hasta un 99% en los pacientes con infección crónica por el VHC (32) y consiguieron detectar anticuerpos más precozmente (entre 4 y 6 semanas) en pacientes con infección aguda por el VHC (33).

Las pruebas serológicas (ELISAS), denominadas de tercera generación incorporan nuevos antígenos (NS1 y NS5) y se han sustituido los componentes recombinantes c-22-3 y c-33 por péptidos sintéticos. Esto parece eliminar las reacciones inespecíficas ligadas al uso de antígenos recombinantes (34). Para otros autores, sin embargo, no parece que aumenten ni la sensibilidad ni la especificidad (35).

#### **2.4.1.2.- Detección de anticuerpos de tipo IgM frente al VHC**

Se ha detectado respuesta de tipo IgM contra el core, NS3 y NS4, pero habitualmente coincide con la respuesta IgG. La respuesta más intensa de tipo IgM es la dirigida contra el antígeno del core y en algunos casos es el primer marcador que aparece tras la infección por el VHC (36).

La duración de la respuesta IgM es habitualmente breve pero puede seguir detectándose en la fase crónica de la enfermedad por VHC (36). En cualquier caso, no se ha demostrado que la determinación de IgM anti-VHC para el diagnóstico de la infección aguda sea ventajosa (37).

### 2.4.1.3.- Técnicas de confirmación

Para confirmar los resultados positivos que se obtienen por la técnica de ELISA, se han desarrollado diferentes métodos de confirmación, como son diversos inmunoblots y ensayos de neutralización (38).

Entre los inmunoblots de segunda generación destacan el RIBA-2 ("Recombinant Immunoblot Assay") y el INNOLIA ("Innogenetics Lineal Immunoblot Assay"). En ambos casos, los antígenos están fijados en tiras de nitrocelulosa en forma de bandas separadas y tras realizarse la técnica con los mismos pasos que un ELISA clásico, se valoran los anticuerpos de forma específica y semicuantitativa según la presencia e intensidad de las bandas. Dentro de estas tiras se incluyen en cada una de ellas controles para validar la prueba y para valorar el estado del suero (positivo, negativo o indeterminado). La diferencia radica en que el RIBA-2 contiene las mismas proteínas recombinantes que los ELISA de segunda generación y en el INNOLIA estos antígenos, salvo el NS3, son péptidos sintéticos.

El inmunoblot recombinante de 3ª generación incorpora además los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos c-100 y 5-11. Presenta una excelente especificidad pero pueden perderse sensibilidad, excepto si se separan los antígenos estructurales de los no estructurales en diferentes superficies.

Las muestras se confirman como positivas si los anticuerpos reconocen al menos dos o más bandas virales. La ausencia de bandas se considera negativa, y la detección de una banda como indeterminadas. A pesar de las recomendaciones de algunos fabricantes, el criterio de positividad más restrictivo es el de reactividad a dos bandas provenientes de dos regiones diferentes del VHC.

Existen interpretaciones contradictorias de los hallazgos serológicos. Algunos autores sugieren que cualquier paciente positivo para una proteína está realmente infectado por el VHC, mientras que otros consideran que puede deberse a un falso positivo. De hecho, la mayoría de los donantes de sangre que reaccionan a una de las proteínas virales, no son infecciosos, aunque esto no significa que no hayan estado expuestos al virus (39). En un estudio realizado para determinar la significación de los resultados indeterminados por RIBA 2.0 se encontró RNA del VHC en 21 de 34 (62%) muestras con reactividad alta a la banda de c22-3, mientras que sólo fueron virémicos 8 de 62 pacientes (13%) con una reactividad baja a c22-3 (40).

Por el contrario, pacientes con alteraciones hepáticas evidentes que reaccionaban a una sola proteína, suelen tener viremia, como ha sido demostrado por PCR. Esto puede ser relevante a la hora de cribar por PCR las muestras con resultado indeterminado en el inmunoblot de 3ª generación (RIBA-3).

Como hemos visto, hay una proporción de las muestras repetidamente reactivas según un procedimiento de cribado multi-antígenos, que se clasifican como indeterminadas con los tests RIBA 2.0. El test RIBA HCV 3.0 parece proporcionar información adicional sobre las muestras consideradas indeterminadas con las pruebas de 2ª generación, ofreciendo una indicación más definitiva acerca de la presencia o ausencia de anti-VHC.

#### **2.4.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

La reacción en cadena de la polimerasa o “Polymerasa Chain Reaction” (PCR) es una técnica de amplificación enzimática “in vitro” de secuencias de DNA. Su aplicación en el diagnóstico de la infección por el VHC resulta de gran utilidad por las limitaciones inherentes a la propia naturaleza de los métodos serológicos, a saber:

1. Aunque su especificidad es alta, presentan una elevada tasa de falsos positivos en sus resultados, lo que implica la necesidad de aplicar técnicas de confirmación a todas las muestras positivas, al menos en el hallazgo inicial. Pero además, aunque se intente confirmar las muestras previamente positivas, un importante número de las mismas permanecen indeterminadas con lo cual, no se puede conocer el estatus serológico real frente al VHC de la persona en cuestión.
2. Su sensibilidad es alta, sobre todo en las pruebas de 2ª y 3ª generación, alcanzando valores de hasta el 99% (32) en donantes de

sangre, pero si tenemos en cuenta el elevado número tanto de donaciones como de transfusiones que se realizan, el 1% restante se convierte en un problema sanitario de primer orden no sólo por el número de personas infectadas tras recibir hemoderivados, sino en el gran costo que supone la terapia antiviral y la evolución en un futuro de algunos de estos enfermos hacia el trasplante hepático.

3. Las pruebas serológicas se muestran ineficaces en enfermos que crean anticuerpos: inmunodeprimidos y aquellos que se encuentran en el llamado "período ventana" (4-6 semanas tras la adquisición de la infección).
4. Para la monitorización de la eficacia del tratamiento antiviral en pacientes inmunocompetentes, el patrón serológico no puede ser utilizado puesto que permanecerá constantemente positivo a lo largo del mismo, mientras que las transaminasas reflejan con retraso las oscilaciones de la viremia y en algunos casos permanecen normales durante las oscilaciones de la misma.
5. Aquellas industrias que producen hemoderivados a partir de la sangre obtenida de gran número de donantes, tienen grandes posibilidades de incorporar sangre con viremia pero sin anticuerpos, si solamente utilizan para su selección métodos serológicos.

Estos inconvenientes de las pruebas serológicas ponen de manifiesto la necesidad de disponer de técnicas directas para la detección del VHC.

La PCR es una técnica diseñada para imitar la replicación del ADN, permite copiar un fragmento de ADN millones de veces y hace posible detectar una célula infectada entre 100.000 sanas (41).

Con la tecnología de la PCR se puede detectar y cuantificar el ARN del VHC y medir la carga vírica, lo que permite monitorizar el curso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento antiviral. La sensibilidad de esta técnica es altísima aunque los resultados de este test deben interpretarse junto con el cuadro clínico y las alteraciones bioquímicas. Es capaz de detectar la infección a los 5-10 días de que se produzca. Su positividad indica presencia viral. Su negatividad no descarta completamente la infección, ya que la viremia es intermitente (42).

## **2.5.- EPIDEMIOLOGÍA**

### **2.5.1. DATOS GLOBALES**

Estudios recientes estiman en cerca de trescientos millones de personas las infectadas por el VHC en todo el mundo, de los que cinco millones de casos se encuentran en Europa (43,44). En 1997, un informe epidemiológico de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba que el 3% de la población mundial se hallaba infectada por el VHC (45). Sólo en EE.UU, 2.7 millones de personas están infectados por el VHC (46). Se admite además que el VHC es

responsable del 75-90% de todas las hepatitis no A no B (47), siendo en el momento actual la hepatitis, más prevalente en nuestro entorno.

Aunque el VHC es ubicuo, la tasa de infección varía ampliamente de unas regiones geográficas a otras (Fig. 5): del 0,3% en países de baja endemicidad de Norteamérica (48) y Europa Occidental (49) a más del 12-20% en zonas altamente endémicas de África. (50,51). En Japón se demostró una prevalencia de anti-VHC del 2,3% y en Taiwan del 2,5% (52,53). La prevalencia, varía ampliamente, asimismo, en función del grupo poblacional estudiado. En un trabajo realizado en un hospital de Nueva York, se halló que el 5,2 % de los pacientes que iban a ser intervenidos quirúrgicamente presentaban anti-VHC, y si se consideraba sólo a los pacientes de 25 a 44 años era del 14.5% (54).

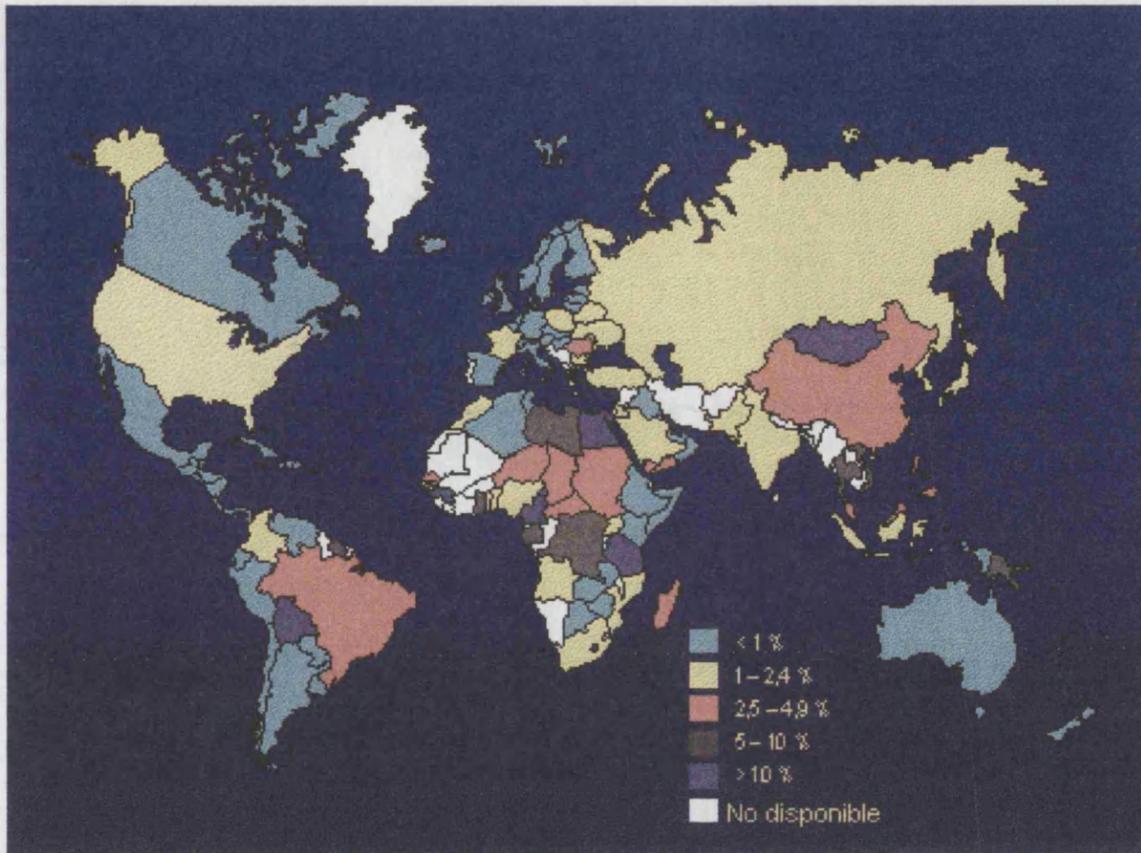


Figura 5.- Prevalencia global del VHC

### 2.5.2.- SITUACIÓN EN ESPAÑA

Los primeros trabajos realizados en nuestro país (55) mostraron una prevalencia general de infección por VHC de 1,2% en una población adulta de donantes de sangre. Un trabajo posterior que evaluó la prevalencia de anti-VHC en un gran grupo de donantes de sangre mediante un ELISA de 2ª generación encontró una tasa de positivos del 0,93% (56). Estas cifras pueden considerarse como una estimación aproximada de la prevalencia en la población general, y pertenecen al rango de las encontradas en regiones moderadamente endémicas, como los países desarrollados del Mediterráneo y Sur de Europa y Japón. En un estudio realizado en el País Vasco (57), estudiando un grupo de pacientes en una consulta de traumatología se

encontró una prevalencia en esta muestra, que no representa a la de la población general, del 2,8%, es decir, tres veces superior a la encontrada en donantes de sangre. En un estudio realizado en la Rioja que incluyó sólo 890 sujetos se observó una prevalencia del 2% (58). Entre los donantes de productos sanguíneos en Barcelona se detectó una tasa de anti-VHC de 1,2% (59) y en Granada del 1,12% (60).

### **2.5.3.- SITUACIÓN EN LA COMUNIDAD VALENCIANA**

En nuestra Comunidad Autónoma en el año 1991 se procesaron en el Centro de Transfusiones 74588 unidades de sangre y la prevalencia global encontrada para el VHC fue de 0,55 % (61). Hay que precisar que las cifras obtenidas en los bancos de sangre no se pueden homologar a las de la población general, toda vez que los candidatos sufren un proceso de selección descartando a aquellos en los que por sus hábitos de vida o antecedentes pueden pertenecer a grupos de riesgo para la infección por el VHC. Así, la prevalencia de anticuerpos VHC en donantes es más baja que en la población general y en esta, la prevalencia aumenta en 4 o 5 puntos en los colectivos de más de 55-60 años y con factores de riesgo tales como hemodiálisis o trasplante (62,63).

El estudio seroepidemiológico de la Comunidad Valenciana realizado en 1991 fue promovido por el Servicio de Epidemiología de la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana. Se estudió una muestra total de

1609 sujetos con una distribución porcentual por sexos del 36.7% hombres y 63.3% mujeres, estratificada por edades. Se utilizaron como conglomerados los Centros de Salud y Consultorios del Servicio Valenciano de Salud aprovechando el flujo de usuarios. La prevalencia que se obtuvo de anti-VHC, fue de 2,82% en el grupo de edad de 20-30 años, resultando de 0,00% para las cohortes de edades inferiores (64).

#### **2.5.4.- GRUPOS DE RIESGO DE INFECCION POR EL VHC**

Una notable cantidad de trabajos se ha realizado en diferentes países con el fin de estudiar tanto las tasas de infección en diferentes grupos de riesgo como, indirectamente, los principales mecanismos de transmisión involucrados en la difusión de la enfermedad.

Análogamente a lo que se ha referido en el extranjero, los principales grupos de riesgo en España son usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) (48% de prevalencia de infección por VHC) (55), y hemofílicos y pacientes con insuficiencia renal terminal sujetos a hemodiálisis (prevalencia de infección del 20%) (55) Hasta la fecha, escasos estudios ha reflejado la prevalencia en España en otros grupos de riesgo tales como personas sometidas a trasplantes de órganos, parejas de personas infectadas, contactos domésticos de casos índice, o varones homosexuales. En un estudio realizado en Sevilla se observó la presencia de anticuerpos anti VHC en el 12% de un grupo de 184

homosexuales sin otros factores de riesgo aparentes (65); esta prevalencia es comparable a la encontrada en otros países (66). Otros trabajos, en cambio, no encuentran tasas más altas de infección por VHC en homosexuales que en la población general (67).

## **2.6.- MECANISMOS DE TRANSMISIÓN**

Las características epidemiológicas de la hepatitis C son muy similares a las de la hepatitis B.

### 2.6.1.- TRANSMISIÓN PARENTERAL

La principal vía de transmisión del VHC es la parenteral. En los EEUU, la hepatitis C transmitida por vía parenteral es la responsable del 20-40% de la hepatitis viral aguda (25).

La transfusión sangre o hemoderivados ha sido la principal vía de transmisión del virus hasta la introducción de las pruebas serológicas. Hasta entonces, la infección por el VHC suponía el 80-90% de las hepatitis posttransfusionales (68,69,70). Los pacientes sometidos a múltiples transfusiones con anterioridad a la identificación del VHC tienen una elevada tasa de infección por el virus. Entre los talasémicos receptores de múltiples transfusiones, el 90% presenta anticuerpos anti-VHC (44). Antes de la implantación obligatoria del test anti-VHC en los donantes de sangre, la frecuencia de hepatitis post-transfusionales oscilaba entre el 0,5% en Inglaterra, el 3-4% en los Estados Unidos, el 7,7% en Japón y el 12,5% en Taiwan. Con anterioridad al cribaje de sangre para anti-VHC en 1990, la tasa de hepatitis post-transfusional C en nuestro país era del 10% (26). Desde entonces esta prácticamente se ha erradicado, de forma que la transfusión de sangre cribada por EIA-2 o EIA-3 ya no debe considerarse un factor de riesgo pues en la actualidad el riesgo estimado es de 1/100.000 (71).

La prevalencia de infección por VHC en pacientes en hemodiálisis es del 30 al 50%. La inmensa mayoría de los anti-VHC positivos presentan ARN del VHC en suero y enfermedad hepática asociada (62).

Pereira y colaboradores en 1991 demostraron la transmisión del VHC a través del trasplante de órganos (72). Utilizando como definición de la infección la detección del genoma viral mediante PCR, demostraron que todos los receptores de órganos procedentes de donantes infectados por VHC se infectaban por el virus tras el trasplante, aunque sólo seroconvertían un 70% utilizando un ELISA de segunda generación (63). Los paciente anti-VHC receptores de un trasplante hepático, presentan niveles altos de viremia después del trasplante y es frecuente la aparición de hepatitis en el injerto (72). El VHC es la principal causa de hepatitis crónica después del trasplante renal, y aunque en muchos casos la lesión histológica es leve y no se acompaña de un apreciable incremento de la mortalidad por enfermedad hepática, la evolución a largo plazo de estos pacientes, todavía no es bien conocida. El trasplante de córnea, órgano avascular, no se ha relacionado con la transmisión del VHC; de hecho, no se ha detectado la presencia de RNA del VHC en las córneas de pacientes con ARN viral en suero (73).

Probablemente < 10% de los casos se producen en el contexto de una transfusión previa pero más del 40% de los pacientes con hepatitis C tiene antecedentes de drogadicción intravenosa. Así, los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) constituyen uno de los grupos de mayor riesgo para la infección por VHC. Entre los UDVP la prevalencia de infección por VHC es del 70-90% (74,75) y esta se adquiere de forma rápida durante el primer año de adicción en la mayoría de los casos. También la práctica de tatuajes con agujas compartidas es una ruta de transmisión.

El personal sanitario tiene, en general, una prevalencia de anti-VHC+ similar a la de la población general. No obstante, en unos estudios de casos-controles efectuados en pacientes con hepatitis aguda no-A no-B, se observó una asociación entre la adquisición de la enfermedad y el hecho de ser trabajador sanitario, preferentemente en personal de laboratorio y de atención directa al enfermo (76). El riesgo de adquirir la infección tras un pinchazo accidental con una aguja contaminada se ha estimado en el 3% (77). La proporción de pacientes que presentan seroconversión anti-VHC después de una inoculación accidental es variable. Mientras en un estudio realizado por el grupo de Mitsui en 68 trabajadores inoculados accidentalmente, el 10% presentaron seroconversión (78); en otro estudio realizado en el Hospital Clínico de Barcelona, ninguno de los 82 trabajadores inoculados desarrollaron hepatitis, ni se observó seroconversión después de un seguimiento de 12 meses (79). Los dentistas y los cirujanos parecen ser el grupo de mayor riesgo. La hospitalización previa también puede constituir un factor de riesgo para adquirir la infección por VHC pero, de momento, la importancia de la transmisión nosocomial es desconocida.

### **2.6.2.- TRANSMISIÓN NO PARENTERAL**

La transmisión no parenteral del VHC parece ser bastante inefectiva. No obstante, un número importante de los casos de hepatitis C (en torno al 40%), no se asocian a antecedentes de exposición parenteral y se denominan

esporádicos, en los cuales no es posible conocer la vía de contagio. En la tabla 2 se resumen las principales vías de transmisión no parenteral.

Transmisión sexual
Transmisión vertical
Transmisión intrafamiliar
Casos esporádicos o transmisión inaparente

**Tabla 2.- Transmisión no parenteral del VHC**

Entre las parejas sexuales de personas con hepatitis crónica por VHC, que aparentemente no tienen otros factores de riesgo de infección, la prevalencia media de anti-VHC es de un 5% (rango, 0% a 15%). La frecuencia de anticuerpos anti-VHC es mayor en grupos sexualmente promiscuos y homosexuales (4-8%) que en la población general (80). Los estudios de las parejas de pacientes hemofílicos infectados por el VHC muestran una baja prevalencia de anticuerpos anti-VHC. Dos trabajos han encontrado una prevalencia más alta de anti-VHC entre las mujeres parejas de hombres positivos en comparación con los contactos varones de mujeres anti-VHC + (81,82). Los estudios de contactos sexuales de pacientes coinfectados por el VIH encuentran, en general, tasas similares de anti-VHC. Sin embargo, en algunos trabajos, se encontró anti-VHC en ambos componentes de la pareja, sólo cuando el varón estaba coinfectado con el VIH y el VHC. En poblaciones sexualmente activas, la transmisión del VHC ha sido asociada con tener múltiples parejas y no utilizar preservativo.

Mecanismos distintos de los parenterales tienen aún que ser confirmados o refutados en nuestro medio, como forma de demostrar el acuerdo con los resultados de otras regiones y de averiguar que otras vías de transmisión pudieran ser responsables de la alta proporción de casos “esporádicos” (es decir, no relacionados con exposición de riesgo conocida) entre el total de la población infectada.

Por su especial importancia en este trabajo, la transmisión intrafamiliar y vertical se analizarán con extensión posteriormente.

### **3.- LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA INFANCIA**

Centrándonos en nuestro objetivo central, es decir, el estado de la infección en los niños, debemos considerar varios aspectos:

#### **3.1.- EPIDEMIOLOGIA**

La infección por el VHC está distribuida por todo el mundo y aunque es responsable de la mayoría de las hepatopatías crónicas en niños, globalmente es una infección poco frecuente en pediatría salvo en grupos de riesgo (83).

La Academia Americana de Pediatría recomienda el despistaje de la infección por el VHC en los niños nacidos de madres infectadas por el VHC, aquellos con comportamientos de riesgo como el uso de drogas por vía parenteral, receptores de sangre o hemoderivados antes de 1992, pacientes en programa de hemodiálisis, así como niños que hubieran recibido concentrados de factores de la coagulación antes de 1987, cuando se introdujeron métodos eficaces de inactivación en su preparación (84).

Las tasas de prevalencia en la población pediátrica oscilan entre el 0.1% al 0.4% en el mundo desarrollado, en comparación a las descritas en la población general en torno al 1%.

Desde el punto de vista de la población infantil, constituyen grupos de riesgo de infección por el VHC los niños con hemoglobinopatías y coagulopatías, así como pacientes hemodializados, politransfundidos, trasplantados y oncológicos. En estos pacientes, se encuentran prevalencias mucho más altas.

Sin embargo, existe un número de individuos con infección por el VHC, sin antecedentes conocidos de riesgo de contagio. Un posible mecanismo de infección en estos niños podría ser la vía intrafamiliar, bien vertical u horizontal, aunque con relación a esta vía de contagio los resultados publicados en la literatura son muy discordantes. Las investigaciones epidemiológicas sugieren la escasa eficacia de la transmisión vertical e intrafamiliar no sexual de este virus, y esta vía de contagio no parece jugar un papel relevante en la infección crónica infantil por VHC (85).

Estudios epidemiológicos han relacionado la infección por el VHC con el bajo nivel socioeconómico (86). No obstante, sorprendentemente, un trabajo que analizaba la prevalencia de anticuerpos en una población sana en condiciones socioeconómicas deficientes de Nicaragua, no encontró un sólo caso de infección por el VHC en 399 individuos, mientras que la seropositividad frente al virus A fue de un 72,7% en el grupo de 2-4 años de edad (87). Otros factores, por tanto, deben estar implicados en la adquisición de la infección por el VHC en la infancia.

Existen muy pocos estudios de prevalencia realizados en población infantil y, como hemos visto, la gran mayoría de los realizados en adultos calculan la prevalencia en donantes de sangre, grupo que no refleja de forma exacta a la población general.

Los trabajos que tratan de la prevalencia en diferentes grupos de edad concluyen que la prevalencia de infección se incrementa con la edad: en Europa meridional oscila entre el 0,8% en menores de 50 años y el 2,3% en personas mayores de esta edad (55); en Japón, la diferencia es aún mayor, variando desde un 0,36% en el grupo de edad de 16-20 años hasta un 2,78% del grupo de 60-64 años (88).

Después de una exhaustiva revisión de la literatura, son pocos los trabajos que se refieren específicamente a la prevalencia de la infección por el VHC en la infancia y juventud. Uno de ellos estudia una población escolar de todas las edades y fue incapaz de demostrar un solo caso entre 1.442 escolares menores de 14 años en Japón en 1992 (89). Otro estudio referido a una población escolar muestra una prevalencia del 0,40 % entre 1.015 escolares de 14 años en un área urbana de Veneto (Italia) en 1993 (90). Como parte de un estudio en población general en Japón en 1993, se informó de una prevalencia del 0,36% en el grupo de edad de 16-20 años (88). Finalmente, entre los niños de los EE.UU. de América, la seroprevalencia es de 0,2% para aquellos < 12 años de edad y 0,4% para los adolescentes entre los 12 y 19 años (Centers for Disease Control and Prevention, datos no publicados).

En contraste, un estudio de 696 escolares de 4-14 años de un área urbana de Camerún encontró una prevalencia tan alta como el 14,5%, con una asociación significativamente más alta con la clase social más baja de la familia (91).

### **3.1.1. SITUACIÓN EN ESPAÑA**

En nuestro país, un trabajo que analizó 411 niños del área de Plasencia (Norte de Extremadura) no detectó ninguna infección por el VHC mediante enzimoimmunoanálisis (92). Otra publicación describe una prevalencia de anti-VHC+ de 0,36% en 560 escolares de la Comunidad Autónoma de Madrid, si bien se incluyen adolescentes hasta los 17 años y en los resultados no se especifica la edad de los dos pacientes cuyos sueros resultaron positivos (93). Finalmente, como hemos indicado previamente, en el estudio de seroprevalencia de nuestra Comunidad Valenciana no se encontró un solo caso infección por el VHC en las cohortes de edades inferiores a los 20 años (64).

### **3.2.- MECANISMOS DE INFECCIÓN**

### 3.2.1. TRANSMISIÓN PARENTERAL

Hasta la introducción sistemática del cribaje del VHC en todos los hemoderivados, la vía parenteral ha sido la principal ruta de infección de los pacientes pediátricos. La transmisión del VHC en pacientes pediátricos puede ocurrir como consecuencia de la transfusión de sangre o hemoderivados. El curso de la infección por VHC asociada a transfusión puede variar en función de la enfermedad de base que motivó la transfusión. Así, la inmunodepresión inducida por la quimioterapia en niños con leucemia puede asociarse con una hepatitis más leve. Por el contrario, la sobrecarga de hierro asociada a la talasemia puede incrementar el riesgo de enfermedad hepática.

En 1994 se describió en EE.UU un brote de transmisión de VHC asociado al uso de una inmunoglobulina intravenosa comercializada con el nombre de Gammagard™ y Polygam™ (Baxter Healthcare Corporation, Glendale, California), administrada entre abril de 1993 y febrero de 1994 (94). En el estudio de cohortes llevado a cabo con 278 pacientes que habían recibido inmunoglobulinas IV se demostró una clara relación causal con el uso de Gammagard™; así 23/210 (11%) de los enfermos que recibieron este producto se infectaron con el VHC frente a 0/52 que recibieron exclusivamente otras inmunoglobulinas IV (95). Brotes similares se describieron en otros países entre los receptores de inmunoglobulinas elaboradas en Europa (96). Las inmunoglobulinas para uso intramuscular no se han asociado a la transmisión de ninguna infección. Actualmente, la no infecciosidad de todas las inmunoglobulinas disponibles comercialmente se asegura mediante el

procesamiento con un detergente y disolvente que inactiva el VHC y la negatividad del RNA-VHC previa a su distribución.

### **3.2.2.- TRANSMISIÓN PERINATAL**

La adquisición pasiva de anti-VHC de la madre al niño ocurre habitualmente en el momento del nacimiento pero la infección del neonato es mucho menos probable. Los casos documentados de transmisión perinatal de infección por VHC son raros y ocurren en aproximadamente el 5% de los niños nacidos de madres RNA-VHC + (rango 0% a 25%). Tanto los estudios serológicos como los que utilizan ensayos sensibles para descubrir RNA del VHC en el neonato no han conseguido documentar transmisión eficaz o infección mantenida; así, aunque pueden documentarse anti-HCV e incluso ARN del VHC durante o después del nacimiento de los bebés de las madres con infección de HCV, estas infecciones raramente se asocian con cronificación. (97). Un estudio japonés muy citado en varios trabajos demostró transmisión de HCV de la madre al niño en el 6% de bebés nacidos de madres con anti-HCV y en el 10% de los nacidos de madres con viremia plasmática. Una observación importante relacionó la transmisión con el nivel de viremia. Entre los bebés nacidos de madres cuyos niveles de ARN-VHC eran  $<10^6$  copias por ml, ninguna transmisión materno-fetal de infección de HCV ocurrió; en contraste, en aquellos cuyas madres tenían niveles circulantes de ARN-VHC  $>10^6$  copias por ml, la eficacia de transmisión fue tan alta como del 36 por ciento. (98); aunque el seguimiento a largo plazo de estos bebés no ha sido

comunicado, datos como éstos sugieren que la transmisión pueda ocurrir entre la madre y el feto en el momento del parto. Sin embargo, la rareza de la transmisión perinatal de la infección de HCV documentada en los Estados Unidos, excepto quizás en los niños nacidos de madres coinfectadas por el VHC y el VIH, es consistente con la observación que la viremia de alto grado es rara. El riesgo de contagio es mayor cuando la madre es VIH +. En un estudio italiano de 403 niños nacidos de madres anti-VHC + seronegativas para VIH, seguidos una mediana de 28 meses, ocurrieron 13 infecciones (3,23%), todas en hijos de madres con viremia (PCR VHC +) (99).

La transmisión puede ser transplacentaria, al nacimiento (perinatal), postparto o vía lactancia materna. Revisando los muchos y a menudo discordantes informes acerca de la transmisión perinatal, los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) del Servicio de Salud Público norteamericano han estimado que la probabilidad de transmisión perinatal del VHC es baja, del orden de 5-6 por ciento. Datos recogidos hasta la fecha no muestran aumento en la infección por VHC entre los bebés alimentados al pecho (100); por consiguiente la lactancia no está desaconsejada para las madres con hepatitis crónicas C.

Para estudiar la posible transmisión del VHC por la leche materna, Zimmermann y cols (101) han determinado la presencia del RNA del VHC en este fluido corporal. En dos estudios previos (102, 103) de 22 mujeres que tenían anti-VHC, todas resultaron negativas al RNA-VHC en leche materna, aunque en otro si detectaron positividad en leche materna de 2/7 mujeres anti-

VHC positivas (104). Por otra parte, Zanetti (100) no pudo demostrar la transmisión de la infección por VHC a través de madres anti-VHC positivo a 71 niños en los que si se consentía la lactancia materna. En este estudio recogen leche materna de 20 mujeres anti-VHC positivas en los primeros días del postparto para detectar el RNA viral. Encuentran que solamente 2/20 muestras de leche materna son positivas. En resumen, a la vista de todos estos resultados, parece algo prematuro prohibir a las madres anti-VHC dar lactancia a los recién nacidos. Por otra parte, habría que demostrar, dado que la cantidad de RNA-VHC es muy escasa en la leche materna y solamente está presente en un 10% de los casos, si realmente se pueden infectar los niños a través de esta vía. Deberían hacerse estudios de cuantificación del RNA-VHC en las madres y hacer estudios dinámicos en madres e hijos para determinar el límite de riesgo y así hacer una recomendación profiláctica adecuada.

El diagnóstico en el recién nacido sólo puede establecerse mediante la detección del virus por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que los anticuerpos anti-VHC maternos pueden persistir elevados en el niño hasta los 12 meses de vida, y la producción de anticuerpos propios se inicia aproximadamente a los 5 meses. Aunque no se conoce exactamente en qué proporción, se ha comprobado que algunos de estos pacientes han desarrollado una hepatitis crónica, de pronóstico no predecible en la actualidad. (105,106,107).

### 3.2.3. TRANSMISIÓN INTRAFAMILIAR

Aunque se han descrito frecuencias aumentadas de anti-VHC en convivientes con personas con infección crónica por VHC, la mayoría de los estudios, sobre todo en los Estados Unidos, no han demostrado ningún tipo de evidencias serológicas o virológicas de transmisión del VHC entre los convivientes que no son parejas sexuales. (108). No obstante, los hijos cuyos padres son virémicos parecen tener un aumento del riesgo de la infección. La transmisión de la enfermedad estaría asociada probablemente, en estos casos como con los otros virus de la hepatitis, con el uso compartido de objetos personales. La inoculación al chimpancé de la saliva de pacientes virémicos ha sido infecciosa.

Incluso en un área endémica de Japón, con una prevalencia tan alta como el 14,1%, los estudios epidemiológicos demuestran que la transmisión intrafamiliar es de escasa importancia (109). Un estudio español de tipo descriptivo transversal con 164 casos índice y 533 contactos observó una escasa transmisión intrafamiliar (2,25%), ligada además a la presencia concomitante de factores de riesgo parenteral y al uso compartido de útiles de aseo personal (110). Los datos actuales, por consiguiente, no apoyan la exposición familiar como un riesgo significativo para infección de HCV.

### **3.3. DIAGNOSTICO**

El diagnóstico de la infección por transmisión vertical del VHC en los niños se basa en la determinación de los niveles séricos de transaminasas y la presencia de RNA del VHC después del segundo o tercer mes de edad en al menos dos muestras de suero, mientras que los anticuerpos frente al VHC deben determinarse después del primer año de vida, porque los anti-VHC procedentes de la madre vía transplacentaria pueden persistir hasta los 18 meses de edad. Los niños mayores de dos años se diagnostican basándose en los mismos criterios que los adultos (anti-VHC, RNA del VHC y niveles de transaminasas).

### **3.4.- HISTORIA NATURAL**

La historia natural de la infección por el VHC en la infancia no es bien conocida por varias razones, como su baja prevalencia, difícil diagnóstico en ausencia de síntomas, falta de seguimiento a largo plazo y porque algunos pacientes son tratados con terapia antiviral. Existen pocos estudios sobre la evolución de la infección por el VHC en edades pediátricas. Se han descrito casos de infección aguda sintomática en evidente relación con la administración de hemoderivados. Las infecciones crónicas son, en su mayoría asintomáticas, habiéndose observado, al igual que en los adultos, un curso fluctuante. Las lesiones histológicas observadas corresponden

mayoritariamente a una hepatitis crónica persistente, aunque se han descrito casos de hepatitis activas e incluso de cirrosis.

La evolución depende tanto de factores virológicos como del huésped. El más importante de estos últimos es el estado inmunológico, el cual está en relación con la enfermedad primaria de base, la edad y la frecuencia de exposición a agentes tóxicos o virales. Los niños con una inmunodeficiencia subyacente parecen tener una tasa más alta o una mayor rapidez de progresión hasta estadios avanzados (111). Puede desarrollarse un carcinoma hepatocelular en una pequeña proporción de los pacientes con hepatitis crónica, aunque la verdadera frecuencia de esta complicación es desconocida por la falta de estudios prospectivos a largo plazo. No se conoce si el riesgo de enfermedad crónica y subsecuentes complicaciones es más alto en los niños infectados al nacer que en los que contraen la infección más tardíamente.

La coinfección por el VHB incrementa el riesgo de evolución a cirrosis hasta un 20% y la ingesta de alcohol en adolescentes puede incrementar también el daño hepático. Asimismo, ciertos factores virales tienen una gran influencia en la evolución de la enfermedad como el genotipo (el subtipo 1b parece ser el más patógeno), el título de RNA del VHC, tamaño del inóculo, presencia de mutantes y la tasa de mutación potencial.

Sendos estudios publicados en *Hepatology* analizan las características anatómo-patológicas de la hepatitis crónica por VHC en los niños y los resultados de ambos son discordantes. El primer trabajo publicado, que analiza

una cohorte de pacientes japoneses, encuentra poca fibrosis, con sólo un 3,6% de presencia de puentes de fibrosis y distorsión de la arquitectura lobulillar y ningún caso de cirrosis (112). Por el contrario, un grupo de Harvard (EE.UU), encuentra poca actividad necroinflamatoria en contraste con estadios severos de fibrosis: 78% de fibrosis portal, incluyendo expansión fibrosa del espacio porta (26%), puentes de fibrosis (22%), distorsión lobulillar (22%) e incluso cirrosis (8%) (113). La discordancia de estos resultados es difícil de interpretar.

Por otra parte, en los niños con hepatitis crónica C pueden ocurrir remisiones espontáneas, definidas como normalización de las transaminasas y desaparición del RNA sérico del VHC durante más de un año, con una frecuencia más alta a la descrita para los adultos (114). Esto se ha asociado a la presencia de un título sérico bajo de RNA-VHC y al descenso significativo del título de anticuerpos frente al core del VHC. No obstante, para poder hablar de una verdadera remisión parece necesario la comprobación de la desaparición del RNA del VHC en tejido hepático (115).

Recientemente se ha publicado un trabajo que analiza la historia natural a largo plazo de la infección por el VHC en un grupo de 458 niños sometidos a cirugía cardíaca en Alemania antes de 1991, fecha en la que se introdujo el cribaje sistemático de anti-VHC en los bancos de sangre (116). Sesenta y siete (14.6%) de estos pacientes resultaron positivos en el test de anti-VHC frente a sólo el 0.7% del grupo control. Después de una media de seguimiento de 19.8 años tras la primera intervención quirúrgica, sólo 37 (55%) de los pacientes anti-VHC+ tenían RNA del VHC detectable en sangre. La infección había

curado en los otros 30 pacientes, lo cual se demostró mediante la realización de tres PCR consecutivas con intervalos de 6 meses. Además, sólo uno de los 37 pacientes RNA-VHC+ tenía las transaminasas elevadas. De 17 de estos pacientes a los que se les practicó una biopsia hepática, sólo en 3 se encontraron signos de daño hepático progresivo; además, estos presentaban otros factores de riesgo adicionales, tales como insuficiencia cardíaca congestiva o coinfección por el VHB. Por tanto, el curso clínico de la infección parece más benigno del esperado en los pacientes infectados en la edad adulta.

## OBJETIVOS

## **II. OBJETIVOS**

Los objetivos principales del presente trabajo son los siguientes:

### **1.- OBJETIVOS PRIMARIOS**

1. DETERMINAR LA PREVALENCIA DE MARCADORES SEROLÓGICOS DE INFECCIÓN POR EL VHC, EN LA POBLACIÓN ESCOLARIZADA EN ENSEÑANZA GENERAL BÁSICA (EGB) DE L' ALCUDIA, MUNICIPIO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA VALENCIANA.
2. EVALUAR LA SITUACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN EN LOS EVENTUALES CASOS DETECTADOS, MEDIANTE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y VIROLÓGICOS, ASÍ COMO DESCRIBIR LAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS CASOS DE INFECCIÓN QUE SE ENCUENTREN E INVESTIGAR LA POSIBLE VÍA DE ADQUISICIÓN DEL VHC.

## **2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. ESTUDIAR LOS PRINCIPALES ASPECTOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS, BIOLÓGICOS Y SOCIOECONÓMICOS DE LA POBLACIÓN ESCOLARIZADA DE L'ALCUDIA.
  
2. DETERMINAR, EN SU CASO, EL / LOS GENOTIPO / S DEL VHC EN LOS PACIENTES INFECTADOS.
  
3. ANALIZAR LA PREVALENCIA DE MARCADORES SEROLÓGICOS DE INFECCIÓN POR EL VHC EN LOS DONANTES DE SANGRE NUEVOS DE L'ALCUDIA Y LOS PUEBLOS LIMÍTROFES DURANTE EL PERÍODO 1995 A 1997, PARA CONOCER LA SITUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VHC EN LA POBLACIÓN ADULTA SANA DE ESA ZONA Y PODER CORRELACIONARLA CON LA PREVALENCIA QUE SE HALLE EN LA INFANCIA
  
4. ESTUDIAR LOS PRINCIPALES ASPECTOS DEMOGRÁFICOS Y SOCIOECONÓMICOS DE L'ALCUDIA Y SU ENTORNO, CON EL FIN DE ANALIZAR LA POSIBLE RELACIÓN CON LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR EL VHC QUE SE ENCUENTRE.

## MATERIAL Y METODOS

### **III. MATERIAL Y METODOS**

#### **1.- SUJETOS DE ESTUDIO**

Los sujetos de estudio fueron los niños/as escolarizados en EGB en los 4 colegios del término municipal de L'Alcudia (Valencia) durante el curso académico 1994-1995.

#### **2.- MÉTODOS**

El presente trabajo fue realizado de forma conjunta con un estudio de factores de riesgo cardiovascular, dislipemias y hábitos alimenticios en la infancia.

Se mantuvieron sendas reuniones con el Excmo. Sr. Alcalde de L'Alcudia y con los Consejos de Dirección y Profesores de los respectivos colegios, a quienes se les explicó la naturaleza de los estudios a realizar y se les requirió su colaboración.

Posteriormente se convocó en dos sesiones a los padres de los alumnos en el Centro Cultural de L'Alcudia para explicar los objetivos de los trabajos y la mecánica de los procedimientos a seguir. Se contestaron cuantas dudas y preguntas surgieron. Como parte del estudio paralelo se les entregó una hoja

para rellenar una encuesta de los alimentos consumidos por los escolares la semana previa a la extracción de sangre.

Se solicitó y obtuvo la firma del consentimiento informado de los padres o tutores para la práctica de exploración física y determinaciones analíticas.

Durante los meses de marzo y abril de 1995, se reunió a los escolares y se les impartió una charla-coloquio acerca de los mecanismos de transmisión de los virus de las hepatitis.

Los niños fueron citados en sucesivos días en los propios centros escolares, a primera hora de la mañana en ayunas, distribuidos por clases. Un equipo de médicos/as y enfermeros/as se encargó respectivamente de la anamnesis y exploración física y de las extracciones analíticas.

Se cuestionaron los antecedentes patológicos y la posible toma concomitante de medicación. En el contexto del presente estudio se preguntó específicamente acerca de antecedentes de hepatitis, ingresos hospitalarios, transfusiones sanguíneas, intervenciones quirúrgicas, visitas al odontólogo y terapia parenteral.

Se realizó una encuesta socio-epidemiológica, que incluía: lugar de nacimiento del niño y de los padres, así como el lugar de residencia y profesión de los padres.

Se practicó una exploración física general que incluyó: talla, peso, auscultación cardíaca y pulmonar, palpación abdominal, examen del cuello y territorios ganglionares e inspección de la orofaringe.

En la siguiente página se observa la Hoja de recogida de datos utilizada específicamente para este estudio. Esta hoja se entregó –junto con la encuesta alimentaria– a los padres de los niños para que la cumplimentaran antes del día de la exploración clínica y las determinaciones analíticas:



Ingresos hospitalarios: No Sí \_\_\_\_\_

---

Transfusiones sanguíneas: No Sí \_\_\_\_\_

---

Intervenciones quirúrgicas: No Sí \_\_\_\_\_

---

Visitas al Odontólogo: No Sí \_\_\_\_\_

---

Terapia parenteral (excluidas vacunas): No Sí \_\_\_\_\_

---

Exploración física: Normal Patológica (especificar): \_\_\_\_\_

---

#### DATOS FAMILIARES

Número de hermanos: \_\_\_\_\_

Padre:

Edad: \_\_\_\_\_

Profesión: \_\_\_\_\_ ¿en activo?: \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Madre:

Edad: \_\_\_\_\_

Profesión: \_\_\_\_\_ ¿en activo?: \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Los padres de los participantes fueron informados de los resultados en caso de normalidad y se les recomendó la consulta con el médico de familia o pediatra en caso de encontrar alguna anomalía en el examen físico o la analítica.

Los sujetos en los que se detectó la presencia de anticuerpos frente al VHC o una dislipemia fueron estudiados específicamente.

## **2.1.- RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de sangre fueron extraídas con aguja 20 G de 0,9 x 25 milímetros (mm) y se recogieron en tubos estériles sin anticoagulantes. Se transportaron acto seguido al Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Valencia. Allí, se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 8 minutos para separar el suero, parte del cual se distribuyó en alícuotas que se introdujeron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en un intervalo de 2-4- horas desde su extracción, conservándose en estas condiciones hasta el momento de su procesamiento.

## **2.2.- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

### **2.2.1.- TRANSAMINASAS**

Se determinaron los valores séricos de la transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), también denominada aspartato aminotransferasa (AST) y de la transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) o alanino aminotransferasa (ALT) mediante el autoanalizador MEGA de Cormédica®.

Se consideraron valores normales los siguientes: GOT: 11-39 U/L y GPT: 7-33 U/L.

### **2.2.2. OTRAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

En todos los participantes se realizaron, asimismo y como parte de otros estudios, las siguientes pruebas bioquímicas: Glucemia, Colesterol total y su fracción HDL y Triglicéridos mediante autoanalizador MEGA de Cormédica.

Los valores normales son: Glucosa 80-110 mg/dl, Colesterol total 150-250 mg/dl, Colesterol-HDL 35-55 mg/dl., Triglicéridos 50-150 mg/dl.

## **2.2.3.- MARCADORES DE INFECCIÓN POR EL VHC**

### **2.2.3.1. Métodos serológicos**

Se realizó un test de cribado (*screening*) por sistema inmunoensayo (EIA) ACCESS® a todos los sueros y se aplicó un test confirmatorio adicional de tipo RIBA (CHIRON® RIBA HCV 3.0 SIA) a los sueros reactivos con el EIA.

#### 2.2.3.1.1 Técnica de cribado

Como técnica de cribado se utilizó el método de enzimoimmunoanálisis ACCESS HCV Ab PLUS® de Sanofi Diagnostics Pasteur (Lote 994803).

El sistema ACCESS® es un procedimiento de EIA que utiliza micropartículas magnéticas y quimioluminiscencia de forma totalmente automatizada. El reactivo VHC es un EIA directo en un solo paso de captura de inmunoglobulinas. El sistema emplea partículas magnéticas recubiertas de proteínas. La muestra se incubó con estas micropartículas así como con un conjugado marcado con fosfatasa alcalina. Este conjugado incluye antígenos del core y de diferentes regiones no estructurales del virus, manteniendo la configuración nativa de los epitopos víricos utilizados y consiguiendo así aumentar la sensibilidad y especificidad del método. El diseño del ensayo

ACCESS VHC asegura la captura de todo tipo de inmunoglobulinas existente en la muestra a analizar.

La lectura se clasifica como REACTIVO o NO REACTIVO en función de la luminiscencia observada (expresada en RLUs –unidades reactivas de quimioluminiscencia– y transformada en unidades S/CO –unidad comparativa de medida que expresa el cociente entre las RLUS de la muestra (S) y las RLUS de la línea de corte de la técnica o cutt-off (C)–), según el punto de corte establecido por el sistema.

#### 2.2.3.1.2. Técnica de confirmación

La técnica de confirmación empleada en los sueros reactivos con el EIA fue un método de inmunoblot recombinante (RIBA) de tercera generación, el RIBA HCV 3.0 SIA de Chiron Corporation.

El test CHIRON® RIBA HCV 3.0 SIA es un enzimoimmunoensayo cualitativo in vitro para la detección de anticuerpos frente a proteínas individuales codificadas por el virus de la hepatitis C (anti-VHC) en suero o plasma humano. Está diseñado para utilizarse como un test adicional más específico para las muestras de suero o plasma humano que sean repetidamente reactivas con los procedimientos aprobados para la detección de anti-VHC, como el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (EIA). Se trata de un ensayo en tira inmunoabsorbente (SIA), descrito por Ebeling (117)

y otros (118), que ha demostrado su utilidad para dilucidar la especificidad de la respuesta de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (VHC). La detección de anticuerpos mediante la metodología del SIA se basa en las técnicas de absorción Western y de puntos, en las que inmunógenos específicos (es decir, poliproteínas antigénicas) codificados por el genoma del VHC son inmovilizados en una membrana como soporte. La visualización de la reactividad de los anti-VHC de las muestras con las proteínas individuales codificadas por el VHC se logra utilizando un conjugado enzimático de anti-IgG humana en conjunción con un sustrato enzimático colorimétrico.

El test CHIRON® RIBA HCV 3.0 SIA es un enzimoimmunoensayo cualitativo in vitro que utiliza antígenos recombinantes VCH codificados y péptidos sintéticos VCH codificados que han sido inmovilizados como bandas individuales en las tiras del ensayo. Los dos antígenos recombinantes (c33c y NS5) y dos de los péptidos sintéticos (c100p y 5-1-1p) proceden de regiones putativas no estructurales del virus, mientras que el tercer péptido (c22p) corresponde a la proteína putativa de la nucleocápside (núcleo) viral.

La reactividad anti-VHC en una muestra se determina comparando la intensidad de cada banda de VHC con la intensidad de las bandas de control interno de IgG humana. La identidad de los anticuerpos se define por la ubicación especificada de la banda de VHC como aparece en el control incluido en cada juego de tests. La interpretación se basa en el patrón de reacción presente en la tira: NEGATIVO (ninguna banda reactiva), INDETERMINADO (una única banda reactiva) o POSITIVA (al menos dos).

La especificidad del test Chiron® RIBA® HCV 3.0 SIA se estima en un 98,8%.

### **2.2.3.2. Métodos de biología molecular**

#### 2.2.3.2.1. Detección por PCR del RNA del VHC

En los sueros con resultado positivo en el cribado se realizó una determinación cualitativa del ARN del Virus de la Hepatitis C por PCR mediante la prueba Cobas Amplicor® HCV (Roche Molecular Systems). Este análisis está indicado como prueba confirmatoria de la infección por el VHC.

La prueba Amplicor® HCV cualitativa se basa en cinco procesos fundamentales:

1. Preparación de la muestra,
2. transcripción reversa del ARN diana para generar un ADN complementario,
3. amplificación por PCR usando iniciadores específicos,
4. hibridación y
5. detección de los productos amplificados.

El test permite realizar simultáneamente la transcripción reversa y el proceso de amplificación de la muestra y su control interno de amplificación. Los reactivos de amplificación contienen una pareja de iniciadores específicos para la muestra y otra pareja para el control interno y mediante el uso de sondas específicas se pueden detectar cada uno de los productos amplificados.

Se trata de un ensayo totalmente estandarizado según los criterios de la OMS mediante el uso de sus estándares y utilizando las unidades internacionales. Su límite de detección es 15 unidades internacionales/mililitro de muestra. Posee una sensibilidad de 50 unidades internacionales/mililitro (correspondiente a menos de 100 copias/ mililitro por la nomenclatura anterior) y eficiencia en la amplificación de todos los genotipos conocidos del virus. La especificidad analítica es mayor del 99,3% y la reproducibilidad intraensayo (coeficiente de variación) del 100%. Utiliza un control de contaminaciones exclusivo que, mediante el uso de la amperasa (uracil-N-glicosilasa), evita posibles errores debidos a amplificados anteriores.

Al tratarse de una prueba cualitativa, los resultados se expresan como: POSITIVO (detección de ARN mediante amplificación) o NEGATIVO (no se encuentra ARN en la muestra).

## **2.2. DEFINICIÓN DE CASO**

LOS PARTICIPANTES QUEDARON DEFINIDOS COMO CASO SI LA PRUEBA DE CRIBADO EIA ACCESS FRENTE AL VHC ERA POSITIVA.

Los casos fueron localizados y se requirió su colaboración en la práctica de una segunda exploración clínica determinaciones analíticas y en la subsiguiente investigación epidemiológica, que incluyó el estudio clínico y serológico de los familiares de primer grado.

## **2.3.- DEFINICION DE LOS CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE INFECCION ACTUAL POR EL VHC**

SE CONSIDERÓ QUE LOS CASOS PRESENTABAN UNA INFECCIÓN ACTUAL POR EL VHC SI LA VIREMIA DEL VHC DETERMINADA POR PCR ERA POSITIVA. EN CASO DE NEGATIVIDAD, SE EXIGIÓ UNA SEGUNDA DETERMINACIÓN ANTES DE CONSIDERAR QUE EL CASO NO PRESENTABA UNA INFECCIÓN ACTUAL POR EL VHC.

## **2.4.- ANALISIS ESTADISTICO**

Las pruebas estadísticas para el estudio de los resultados se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS 9.0 para Windows® (SPSS Inc., 1999).

Para la descripción de las variables cuantitativas se han empleado los valores de la media, intervalo de confianza para la media al 95%, mediana, desviación típica, mínimo, máximo y rango.

En la descripción de las variables cualitativas se ha utilizado la frecuencia y el porcentaje.

La comparación de las variables cualitativas se ha realizado mediante el uso de una tabla de contingencia y la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ )

La comparación entre las variables cuantitativas y cualitativas se ha realizado mediante las pruebas de análisis de la varianza (ANOVA)

Finalmente para la comparación entre variables cuantitativas se utilizó la regresión lineal.

En todos los casos, las diferencias encontradas entre las variables se han considerado estadísticamente significativas para valores de  $p$  inferiores a 0,05.

## **2.5.- ESTUDIO DE LOS DONANTES DE L' ALCUDIA Y PUEBLOS COLINDANTES**

La seroprevalencia de marcadores serológicos de infección por el VHC en los donantes de sangre nuevos durante el período 1995 a 1997 se obtuvo mediante el análisis de los datos proporcionados por el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana.

Se estudiaron los municipios de L' Alcudia, Massalavés, Alginet, Guadassuar y Carlet ubicados en la comarca de la Ribera Alta de la provincia de Valencia, eligiendo los sujetos que donaron sangre por primera vez en el período citado.

## **2.6.- ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES ASPECTOS DEMOGRAFICOS Y SOCIO-ECONOMICOS DE L'ALCUDIA**

Se estudiaron los principales aspectos demográficos y socio-económicos de L'Alcudia mediante el análisis de los datos proporcionados por el Exmo. Ayuntamiento de L'Alcudia y el Instituto Valenciano de Estadística de la Generalitat Valenciana.

## RESULTADOS

## **IV. RESULTADOS**

### **1.- SUJETOS DEL ESTUDIO**

Se obtuvo el compromiso previo para la participación en el estudio de las familias de 702 niños / as, estudiantes de Enseñanza general Básica (EGB) durante el curso académico 1994-1995, escolarizados en los 4 colegios del término municipal de L'Alcudia (Valencia): San Andrés (privado, de titularidad parroquial), y los públicos: Bataller, Heretats y Les Comes.

Por diversas razones, 16 sujetos no pudieron ser evaluados durante el período del estudio.

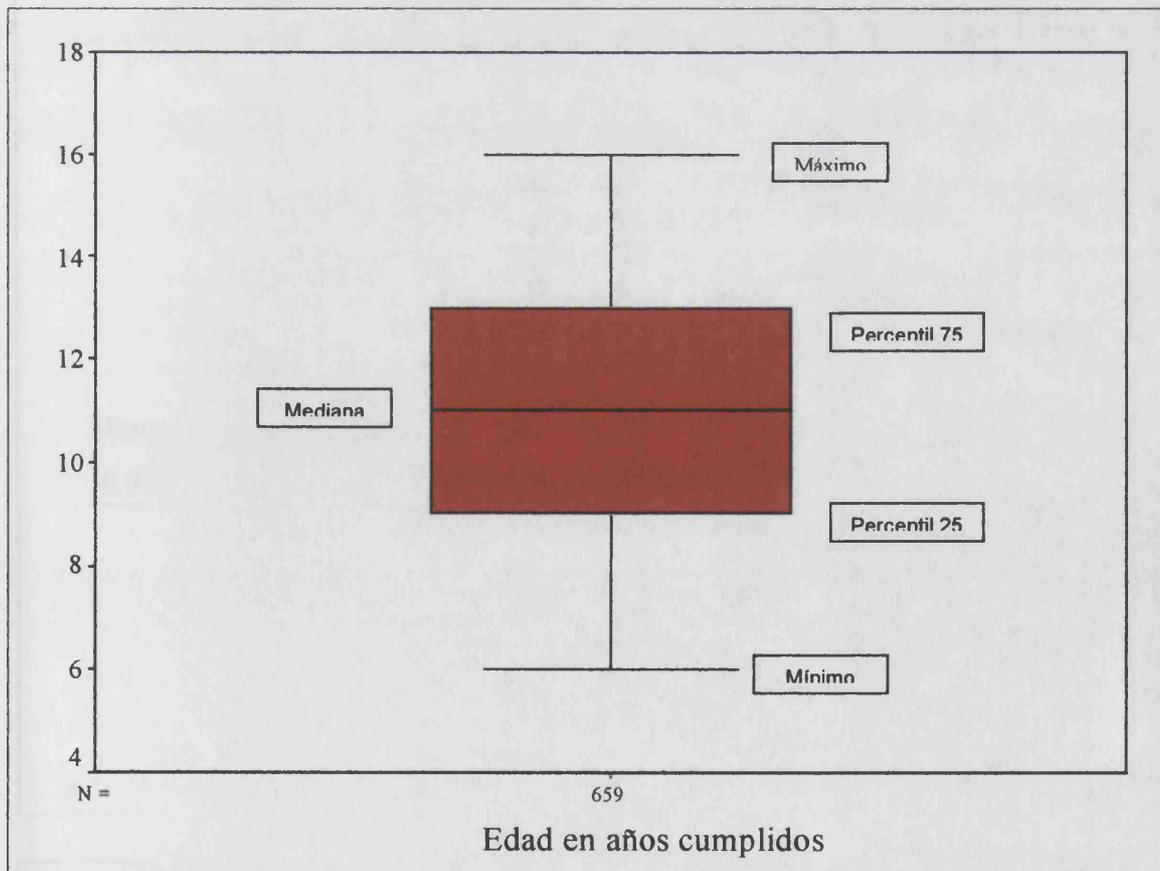
Se estudiaron un total 686 individuos de edades comprendidas entre 6 y 16 años de los 4 colegios de L' Alcudia. En todos se procedió a la entrevista clínica, examen físico y extracción de sangre para determinaciones analíticas

#### **1.1.- DATOS DEMOGRÁFICOS**

Las características demográficas de la muestra se resumen en las siguientes tablas y gráficas. La variable edad se recogió en 659 sujetos con los siguientes valores descriptivos:

Edad en años cumplidos		Estadístico
N = 659	<i>Media</i>	10,58
	<i>IC 95% (*)</i>	
	<i>Límite inferior</i>	10,41
	<i>Límite superior</i>	10,75
	<i>Mediana</i>	11,00
	<i>Desviación típica</i>	2,28
	<i>Mínimo</i>	6
	<i>Máximo</i>	16
	<i>Rango</i>	10

**Tabla 3.- Estadísticos descriptivos de la variable cuantitativa edad**  
 (\*): Intervalo de confianza para la media al 95%

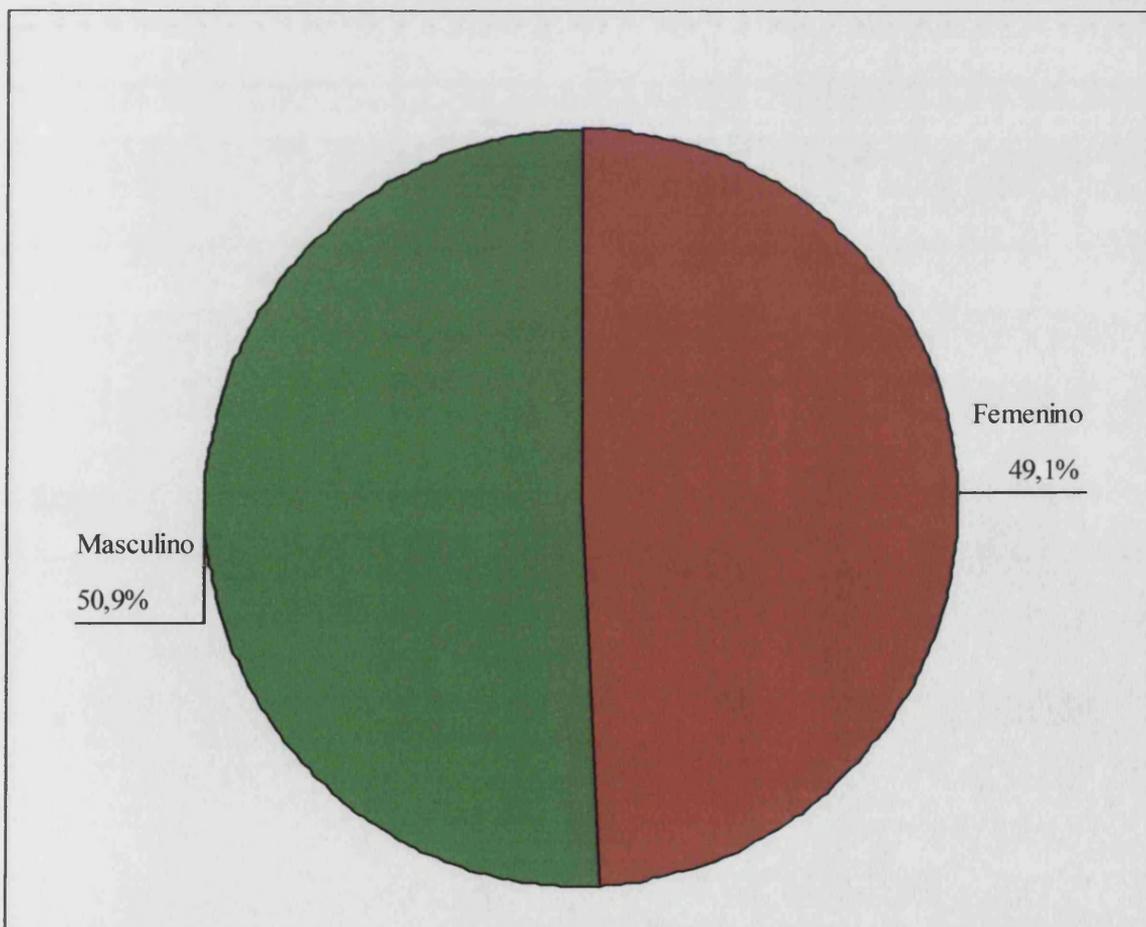


**Figura 6.- Diagrama de cajas de la distribución de la muestra por edad**

La distribución por sexos puede apreciarse en la tabla 4 y la figura 7

		Frecuencia	Porcentaje
<i>Válidos</i>	<i>Femenino</i>	337	49,0
	<i>Masculino</i>	350	50,9
	<i>Total</i>	687	99,9
<i>Perdidos</i>		1	0,1
<i>Total</i>		688	100,0

**Tabla 4.- Estadísticos descriptivos de la variable sexo**

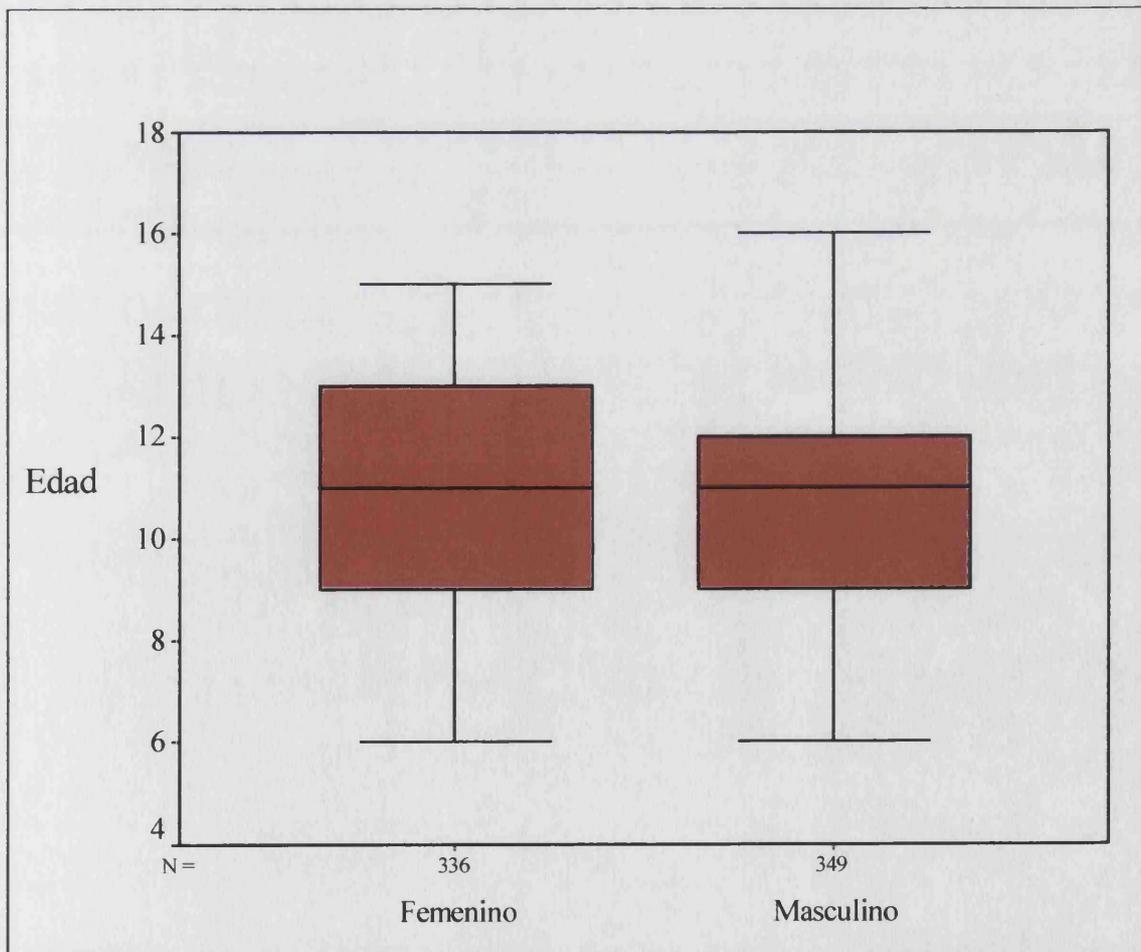


**Figura 7.- Distribución porcentual por sexos del global de la muestra**

La relación entre la edad y el sexo de los individuos de la muestra se expone a continuación:

	Media	N	Desviación típica
<i>Femenino</i>	10,76	336	2,30
<i>Masculino</i>	10,54	349	2,29
<i>Total</i>	10,65	685	2,29

**Tabla 5 .- Distribución de la edad por sexos**



**Figura 8.- Diagrama de cajas de la distribución por edades en ambos sexos**

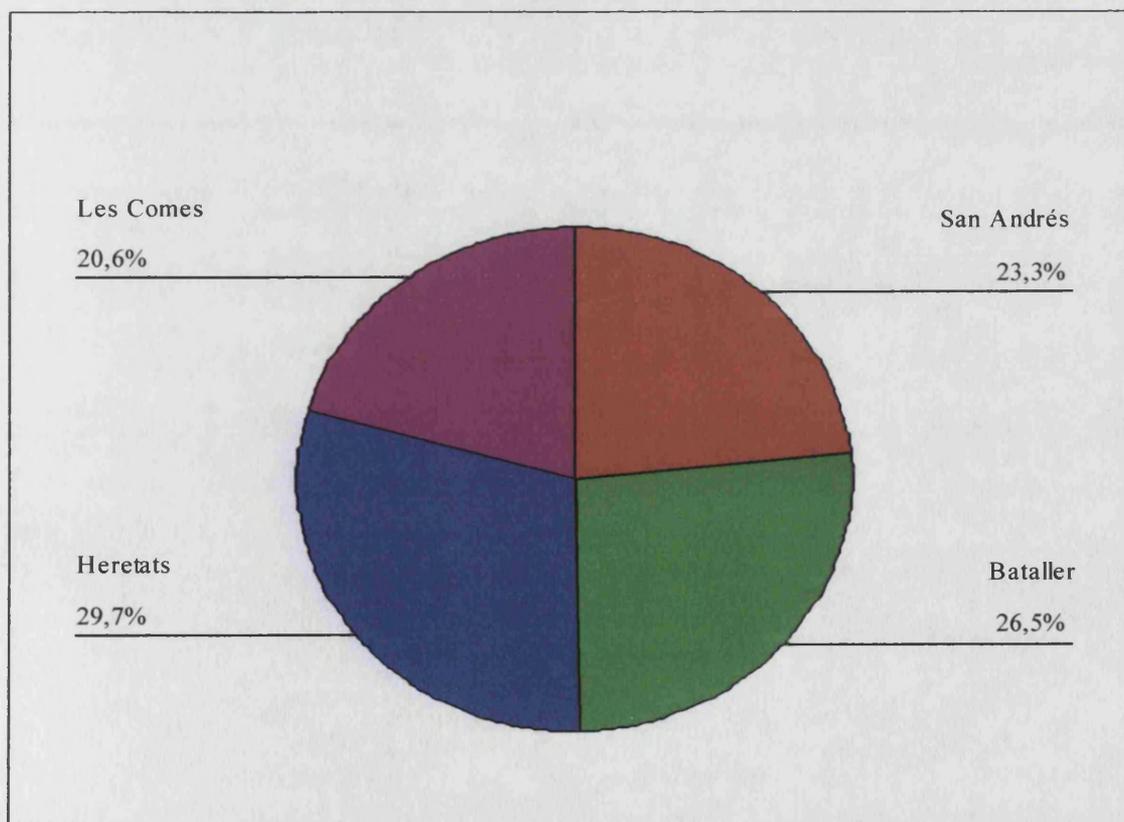
La distribución de la edad fue similar en ambos sexos. Mediante análisis de la varianza (ANOVA) se comprobó la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la edad ( $p=0,215$ ), demostrándose así la homogeneidad en la obtención de la muestra.

En las siguientes tabla 6 y figura 9 se aprecia la distribución de los escolares por colegios.

1: San Andrés; 2: Bataller; 3: Heretats; 4: Les Comes

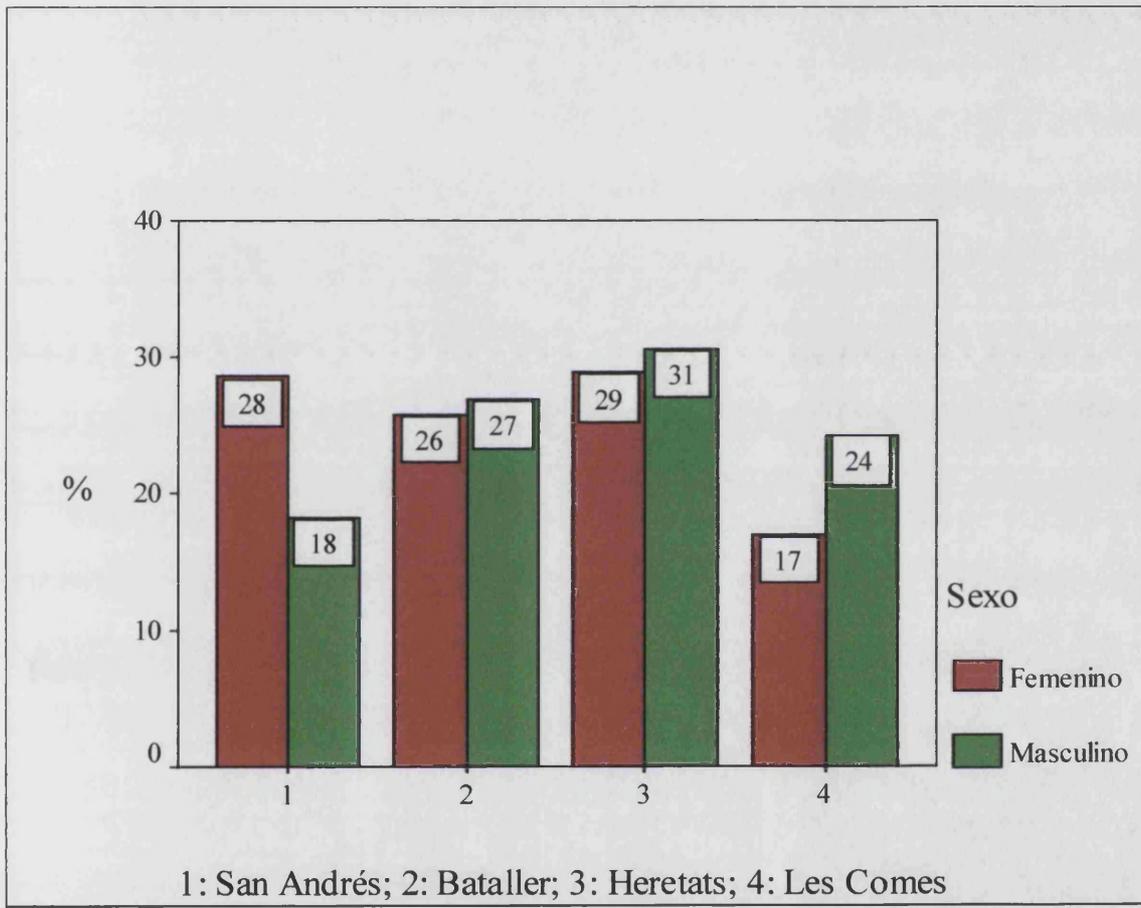
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje Acumulado
Válidos	1	160	23,3	23,3	23,3
	2	182	26,5	26,5	49,7
	3	204	29,7	29,7	79,4
	4	142	20,6	20,6	100,0
	Total	688	100,0	100,0	

**Tabla 6. Distribución de la muestra por Colegios**



**Figura 9.- Distribución porcental por colegios**

A continuación se resume gráficamente la distribución por sexos en los distintos colegios (Fig. 10). Se puede apreciar un predominio de las niñas sobre los niños en el colegio San Andrés y viceversa en el colegio Les Comes. Esta diferencia alcanza una significación estadística mediante la prueba de  $\chi^2$  ( $p=0,006$ ).



**Figura 10.- Distribución de los niños/as en los colegios según el sexo**

## 1.2.- DATOS DE LA ANAMNESIS

Los datos recogidos en la anamnesis se resumen en la tabla siguiente, expresados en porcentaje de frecuencia de aparición:

<i>Estado de salud normal</i>	93,70%
<i>Hepatitis</i>	0,51%
<i>Ingresos hospitalarios</i>	3,81%
<i>Transfusiones sanguíneas</i>	0,00%
<i>Intervenciones quirúrgicas</i>	2,30%
<i>Visita Odontólogo</i>	36,06%
<i>Terapia parenteral</i>	40,20%
<i>Otros antecedentes</i>	30,1%

**Tabla 7.- Anamnesis: frecuencia de aparición de respuestas positivas**

## 1.3.- DATOS BIOLÓGICOS

En el seno del estudio actual se determinaron las enzimas hepáticas transaminasas glutámico-pirúvica (GPT) y glutámico-oxalacética (GOT). Los resultados se resumen en la tabla 8 donde se exponen los estadísticos descriptivos, la tabla 9 donde se reflejan los valores detallados por sexos y las figuras 11 y 12 donde se puede observar la distribución de GOT y GPT en ambos sexos. Como se aprecia, los valores de las transaminasas – aun dentro

del rango de normalidad – son superiores en el sexo masculino que en el femenino. Esta diferencia es estadísticamente significativa según el ANOVA ( $p=0,000$  para la GOT y  $p=0,005$  para la GPT).

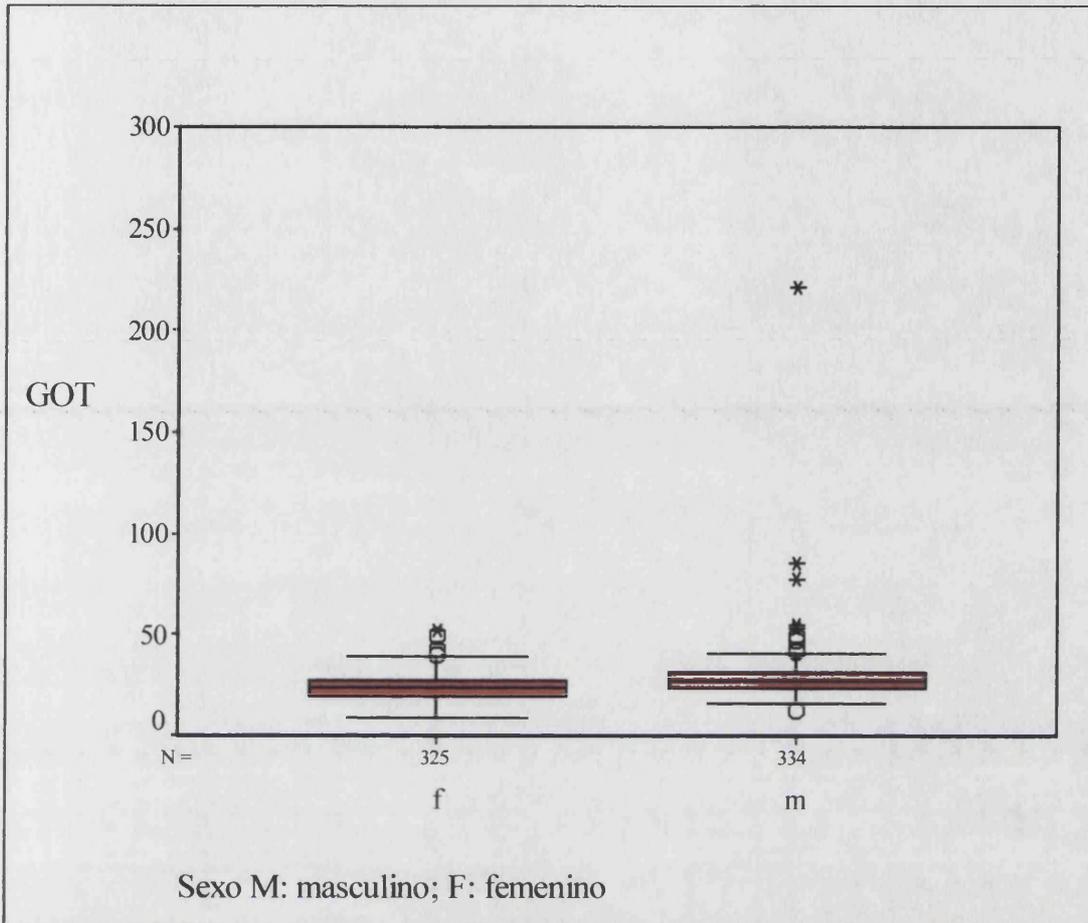
	GOT	GPT
<i>Media</i>	26,53	16,50
<i>Intervalo de confianza para la media al 95%</i>	Límite inferior 25,74 Límite superior 27,32	Límite inferior 15,69 Límite superior 17,30
<i>Mediana</i>	26,00	15,00
<i>Desviación típica</i>	10,36	10,48
<i>Mínimo</i>	9	4
<i>Máximo</i>	221	188
<i>Rango</i>	212	184

**Tabla 8.- Estadísticos descriptivos de las variables *Transaminasas (GOT y GPT)* (n=660)**

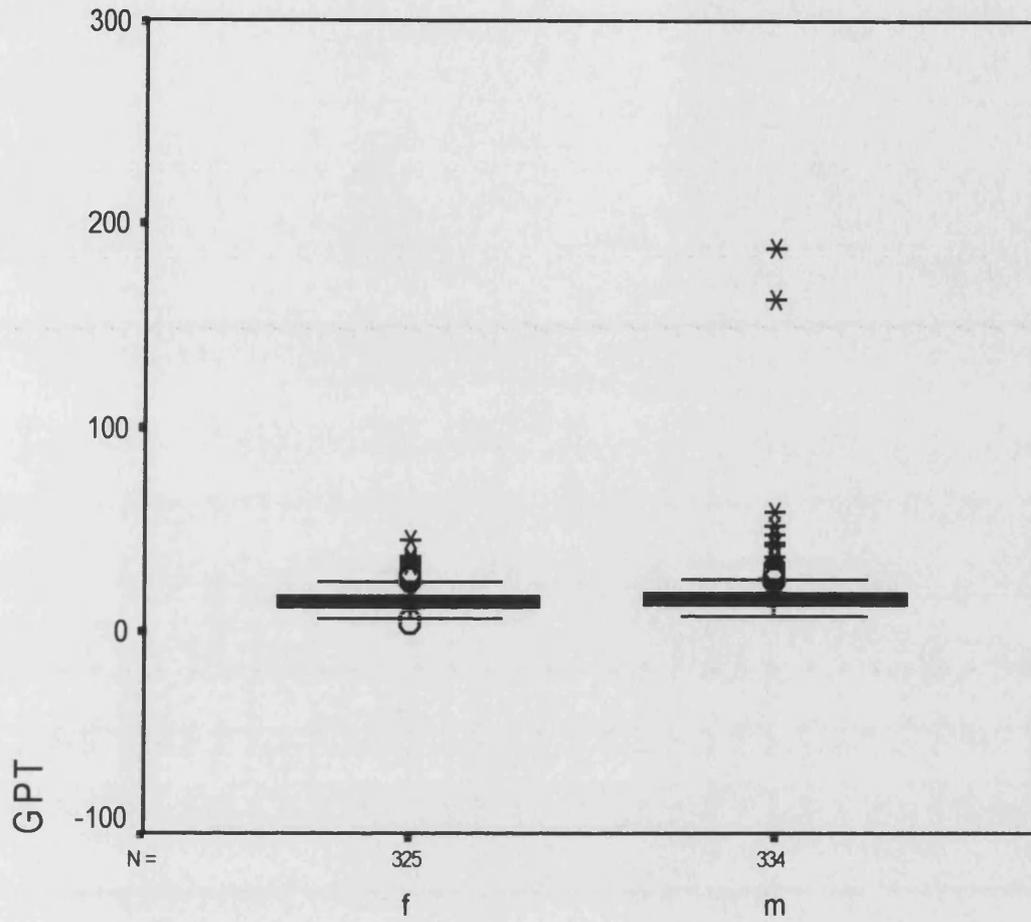
Sexo		GOT	GPT
<i>Femenino</i>	<i>Media</i>	24,28	15,34
	<i>N</i>	325	325
	<i>Desviación típica</i>	6,09	5,28
<i>Masculino</i>	<i>Media</i>	28,75	17,65
	<i>N</i>	334	334
	<i>Desviación típica</i>	10,36	10,48

**Tabla 9 .- Valores de GOT y GPT por sexos**

La distribución de la GOT y GPT por sexos se refleja en las siguientes figuras:



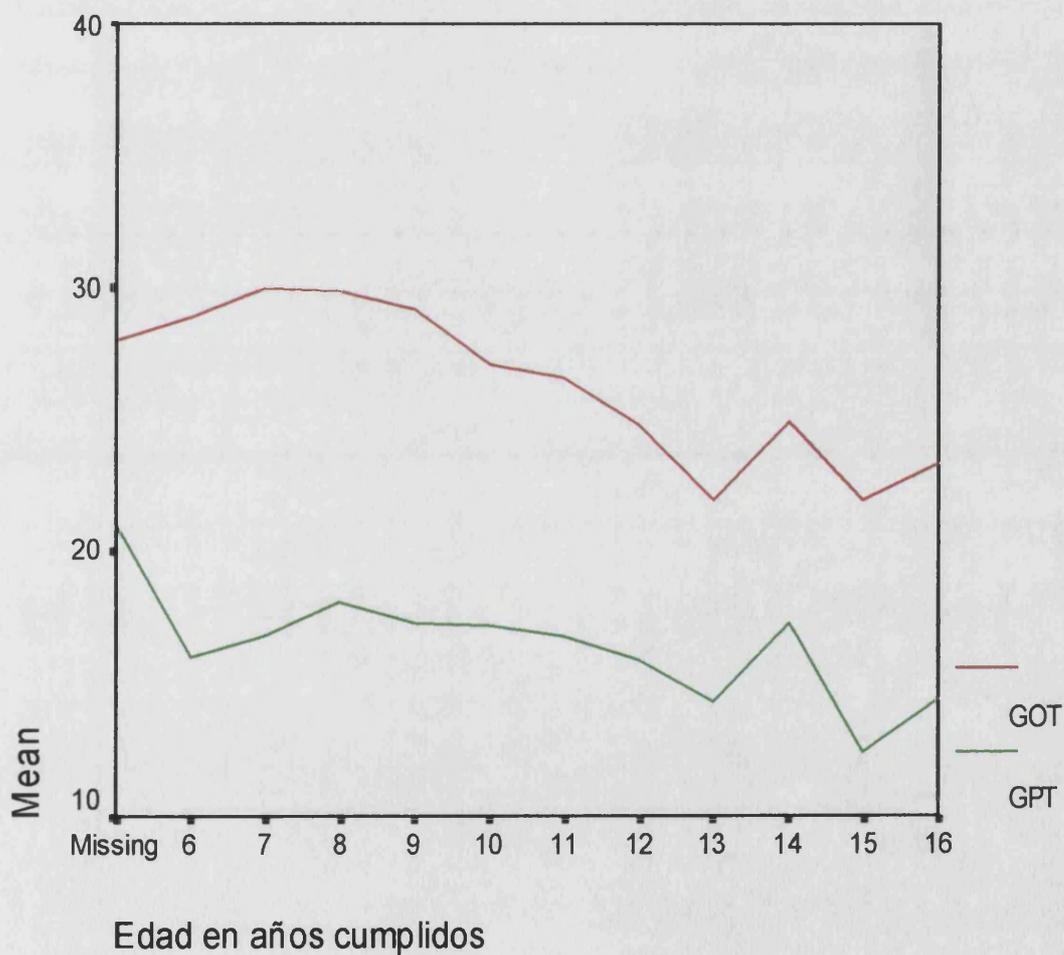
**Figura 11.- Diagrama de cajas de la distribución de la GOT por sexos**



Sexo M: masculino; F: femenino

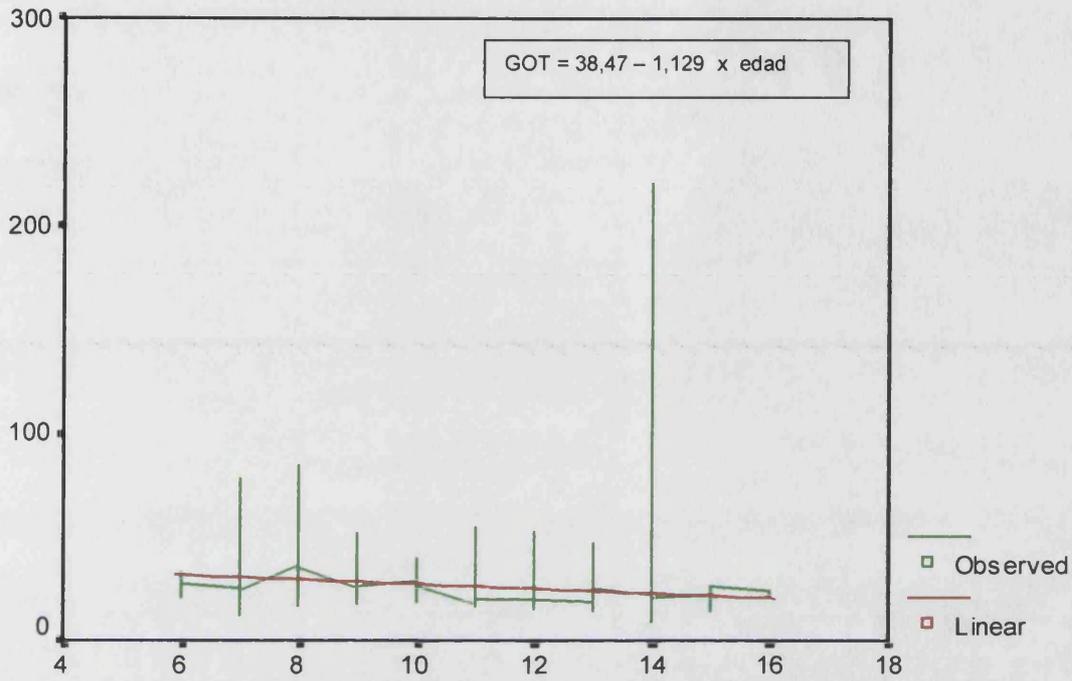
**Figura 12: Diagrama de cajas de la distribución de la GPT por sexos**

La relación entre las transaminasas GOT y GPT con la edad se exploró mediante una regresión lineal, encontrando una tendencia estadísticamente significativa para el descenso de las cifras de GOT ( $p = 0,000$ ) y en el límite para la GPT ( $p=0,05$ ), conforme aumenta la edad. Esto se resume gráficamente en las siguientes figuras:



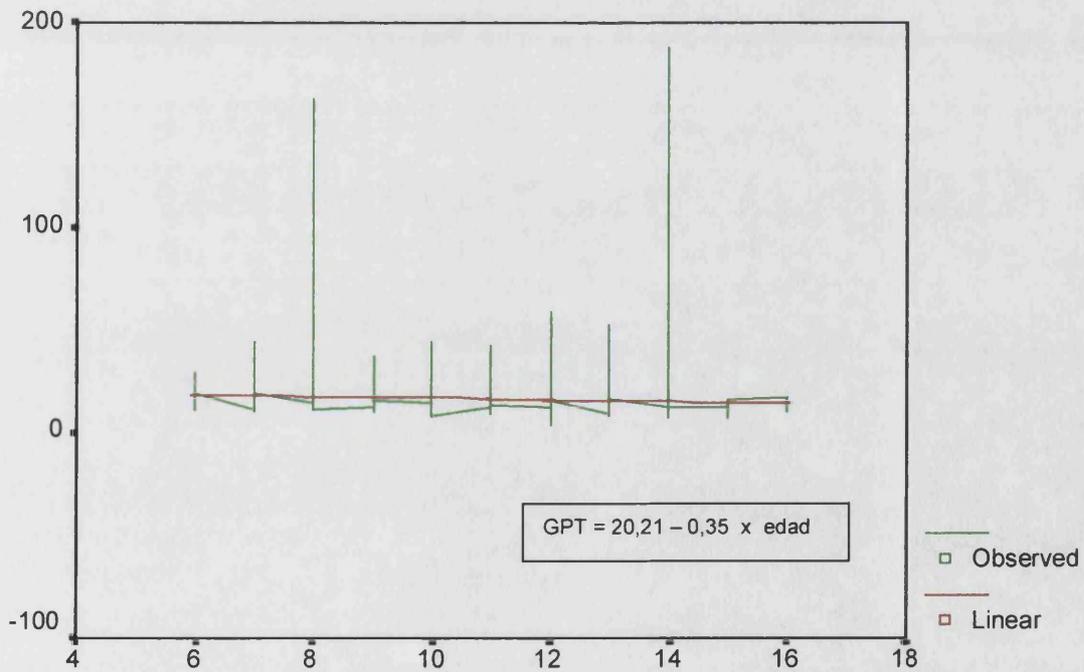
**Figura 13.- Valores medios de GOT y GPT por edades**

### GOT



Edad en años cumplidos

### GPT



Edad en años cumplidos

**Figura 14: Representación gráfica de la regresión lineal de las transaminasas GOT y GPT con la edad**

Finalmente, la distribución de las transaminasas en los escolares divididos en cuatro grupos por colegios no evidenció diferencias significativas mediante ANOVA ( $p = 0,382$  y  $P = 0,693$  para GOT y GPT, respectivamente).

## **1.4.- ESTUDIO DE LOS CASOS**

De los 686 niños estudiados citada se identificaron dos casos mediante el empleo de la definición.

El caso 1 era una alumna de 7º de EGB del Colegio San Andrés y el caso 2 un alumno de 8º de EGB del Colegio Heretats

En las tablas siguientes 10 a 13 se recogen los principales datos físicos y los parámetros bioquímicos analizados de los dos casos, así como los datos de la anamnesis:

Iniciales	MTA
Nº identificación	126
Edad (años cumplidos)	13
Sexo	Femenino
Talla (cm)	166
Peso (Kg)	55
Tensión Arterial (mm Hg)	120 / 80
Exploración física	Normal
Glucemia (mg / dl)	78
GOT (U / l)	17
GPT (U / l)	11
Colesterol total (mg / dl)	182
Colesterol HDL (mg / dl)	56
Triglicéridos (mg / dl)	32

**Tabla 10.- Caso 1: Datos físicos y biológicos**

Estado de salud	Normal
Hepatitis	No
Ingresos hospitalarios	No
Transfusiones sanguíneas	No
Intervenciones quirúrgicas	Sí (apendicectomía, 1991)
Visita Odontólogo	Sí (aparato dentario corrector, 1990)
Terapia parenteral	No
Otros antecedentes	No

**Tabla 11.- Caso 1: Anamnesis**

Iniciales	JPT
Nº identificación	453
Edad (años cumplidos)	13
Sexo	Masculino
Talla (cm)	155
Peso (Kg)	48
Tensión Arterial (mm Hg)	110 / 55
Exploración física	Normal
Glucemia (mg / dl)	80
GOT (U / l)	24
GPT (U / l)	11
Colesterol total (mg / dl)	132
Colesterol HDL (mg / dl)	42
Triglicéridos (mg / dl)	52

**Tabla 12 .- Caso 2: Datos físicos y biológicos**

Estado de salud	Normal
Hepatitis	No
Ingresos hospitalarios	No
Transfusiones sanguíneas	No
Intervenciones quirúrgicas	No
Visita Odontólogo	No
Terapia parenteral	Sí (antibióterapia intramuscular, 1995)
Otros antecedentes	No

**Tabla 13 .- Caso 2. Anamnesis**

LOS SUEROS DE AMBOS ESCOLARES FUERON REACTIVOS MEDIANTE EL TEST DE CRIBADO EIA ACCESS.

EL TEST DE CONFIRMACIÓN MEDIANTE RIBA RESULTO INDETERMINADO EN AMBOS CASOS ANTE LA POSITIVIDAD DE UNA ÚNICA BANDA: C33-C+.

LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL RNA DEL VHC MEDIANTE PCR FUE NEGATIVA EN AMBOS, TANTO EN LA MUESTRA OBTENIDA EN 1995 COMO EN UNA SEGUNDA EXTRAIDA EN 1999.

Los resultados de los marcadores serológicos de infección por el VHC se resumen a continuación en las tablas 14 y 15

	1995	1999
ACCESS HCVLUS	Reactivo: 1,11 S/CO	N.R.
RIBA HCV 3.0 SIA	Indeterminado: + C33	N.R.
PCR Cobas AMPLICOR HCV	Negativo	Negativo

**Tabla 14.- Caso 1: Marcadores de infección por VHC N.R. : No realizado**

	1995	1999
ACCESS HCVLUS	Reactivo: 1,13 S/CO	N.R.
RIBA HCV 3.0 SIA	Indeterminado: + C33	N.R.
PCR Cobas AMPLICOR HCV	Negativo	Negativo

**Tabla 15.- Caso 2: Marcadores de infección por VHC N.R. : No realizado**

#### 1.4.1.- ESTUDIO DE LOS FAMILIARES DE PRIMER GRADO CONVIVIENTES CON LOS CASOS

Con el objeto de investigar los posibles mecanismos de transmisión, se estudiaron los familiares de primer grado convivientes con los dos casos.

El caso 1 tenía un hermano de 3 años, nacido en 1996, con posterioridad al comienzo del estudio.

El caso 2 no tenía hermanos.

En ninguno de las dos familias había otros convivientes en el hogar.

Se practicó una exploración física general y se preguntó específicamente acerca del estado de salud y de antecedentes epidemiológicos relacionados con la posible transmisión de Hepatitis C.

SE REALIZÓ UNA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL VHC POR MÉTODO EIA ACCESS EN LOS PADRES DE LOS CASOS. EL RESULTADO FUE NEGATIVO EN LOS CUATRO.

No se realizó en el hermano del caso 1 porque no había nacido en 1995, fecha en que se obtuvo la primera muestra del caso 1 que resulto positiva con el EIA.

Los resultados se resumen en las siguientes tablas:

	Padre	Madre
Edad	36	35
Profesión	Agricultor	Labores domésticas
Lugar de nacimiento	L' Alcudia	Guadassuar
Exploración física	Normal	Normal
UDVP	No	No
Antecedente de Hepatitis	No	No
Ingresos hospitalarios	Sí, 1970	Sí (parto)
Intervenciones quirúrgicas	Apendicectomía, 1970	No
Transfusiones sanguíneas	No	No
Terapia parenteral	Sí (no recuerda fecha)	Sí (no recuerda fecha)
Visitas odontólogo	No	Sí
Anticuerpos VHC (EIA)	Negativo	Negativo

**Tabla 16.- Datos de los padres del caso 1 (1995, excepto serología de 1999)**

	Padre	Madre
Edad	40	37
Profesión	Empleado de banca	Administrativa
Lugar de nacimiento	Valencia	L'Alcudia
Exploración física	Normal	Normal
UDVP	No	No
Antecedente de Hepatitis	No	No
Ingresos hospitalarios	No	Sí (parto)
Intervenciones quirúrgicas	No	Cesárea, 1982
Transfusiones sanguíneas	No	No sabe
Terapia parenteral	Sí (no recuerda fecha)	Sí (no recuerda fecha)
Visitas odontólogo	Sí	Sí

**Tabla 17.- Datos de los padres del caso 2 (1995, excepto serología de 1999)**

## **2.- SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VHC POR EIA EN LOS ESCOLARES DE L' ALCUDIA**

Se detectaron 2 casos de positividad de anticuerpos frente al VHC en los 686 escolares estudiados.

LA PREVALENCIA GLOBAL PARA LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VHC CON LA TÉCNICA DE CRIBADO EIA ACCESS FUE, POR TANTO, DE UN 0,29 %.

## **3.- PREVALENCIA DE INFECCION ACTIVA POR EL VHC EN LOS ESCOLARES DE L'ALCUDIA**

Según la definición empleada por nosotros y expuesta previamente en el apartado 2.3, no se detectó ningún caso de infección activa por el VHC.

Por tanto, LA PREVALENCIA DE INFECCIÓN ACTIVA POR EL VHC FUE 0,00%.

## **4.- SEROPREVALENCIA DE MARCADORES DE INFECCION POR EL VHC EN LOS DONANTES DE SANGRE NUEVOS DE L' ALCUDIA Y LOS PUEBLOS COLINDANTES**

Durante el período 1995 a 1997 se reclutaron 565 donantes nuevos en los municipios de L' Alcudia, Massalavés, Alginet, Guadassuar y Carlet.

SE ENCONTRÓ UNA PREVALENCIA GLOBAL DE POSITIVIDAD DE ANTICUERPOS FRENTE AL VHC MEDIANTE LA TÉCNICA DE CRIBADO DE UN 0,71%, MIENTRAS QUE EL TEST DE CONFIRMACIÓN SÓLO FUE POSITIVO EN EL 0,35%.

En la siguiente tabla se resumen la positividad de los marcadores serológicos en estos sujetos:

	Nº donantes	Casos	EIA	RIBA	PCR +	Positividad Screening	Positividad Confirmación
<i>L' Alcudia</i>	126	1	+	+	+	0,79%	0,79%
<i>Massalavés</i>	26	0				0	0
<i>Alginet</i>	124	2	+	-	-	1,61%	0
<i>Guadassuar</i>	111	0				0	0
<i>Carlet</i>	178	1	+	+	+	0,56%	0,56%
<i>Total</i>	565	4	4	2	2	0,71%	0,35%

**Tabla 18.- Prevalencia de marcadores serológicos de infección por el VHC en los donantes de sangre nuevos de L'Alcudia y municipios colindantes (1995 – 1997)**

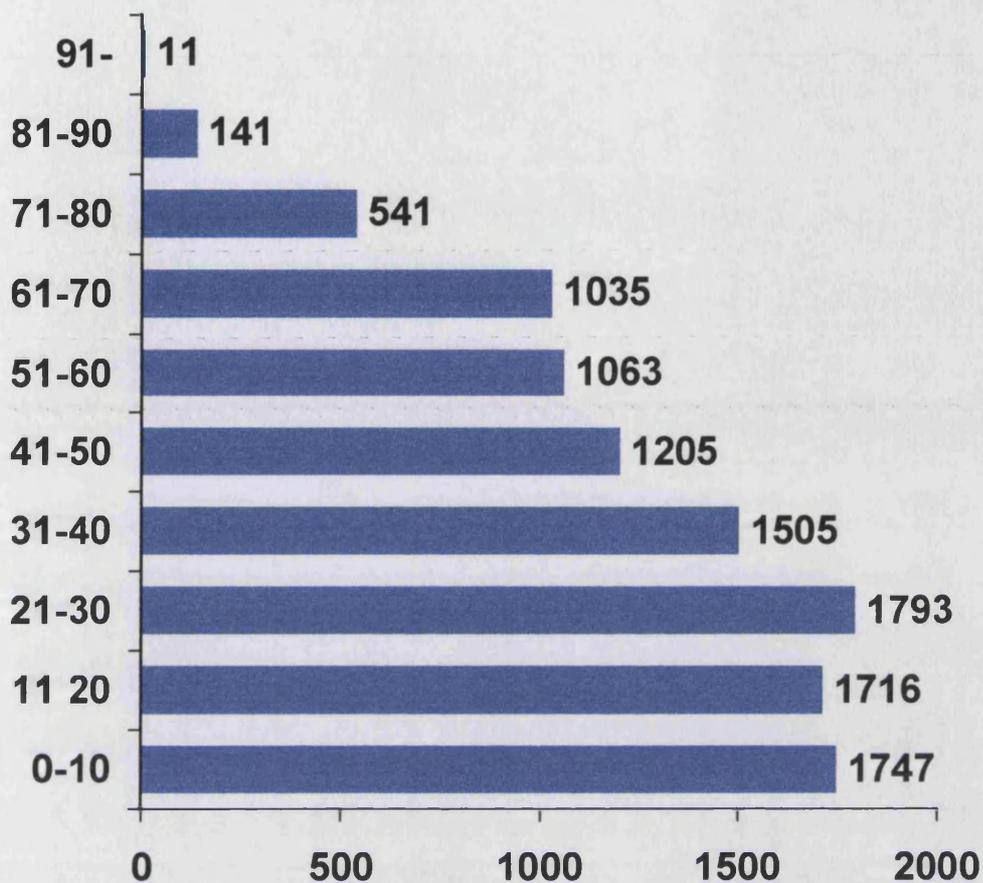


Está situado en la margen izquierda del río Júcar y se divide en dos sectores, separados por el municipio de Guadasuar. El sector norte más extenso, está cruzado por el río Magro, mientras que el sector sur corresponde al antiguo término de Montortal, anexionado en 1842. Sus límites territoriales son: al norte Carlet y Benimodo; al oeste Tous; al este y sur Guadasuar.

La mayor parte del término municipal está dedicado a los cultivos de regadío: naranjos, maíz, hortalizas, etc. En la zona de secano hay almendros, olivos, algarrobos y viñas (moscatel). La propiedad de las tierras está muy repartida. La ganadería es muy importante, principalmente la ovina y porcina; también hay dedicación apícola (miel de azahar).

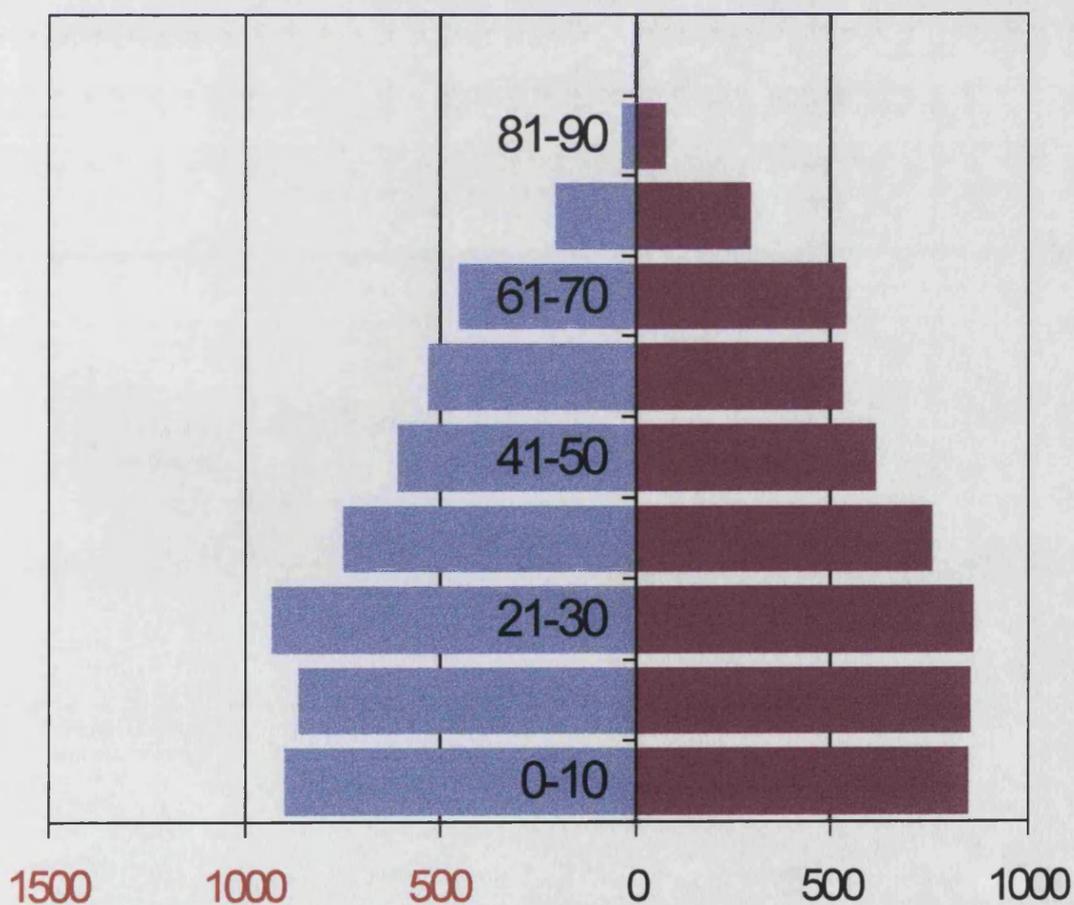
La población ha registrado un constante aumento desde finales de la década de los sesenta, debido al establecimiento de industrias, lo cual provocó una fuerte corriente migratoria. Así en 1972, la población de hecho era de 7549 habitantes mientras que en 1995 ascendía a 10481.

L'Alcudia comprende, por tanto, una población de 10481 habitantes (5146 hombres y 5335 mujeres) (datos censales 01-01-95). La pirámide de edades se muestra a continuación en las dos gráficas siguientes:



**Figura 16.- Distribución de la población por grupos de edad (datos globales).** Fuente: Datos del Exmo. Ayto. de L'Alcudia

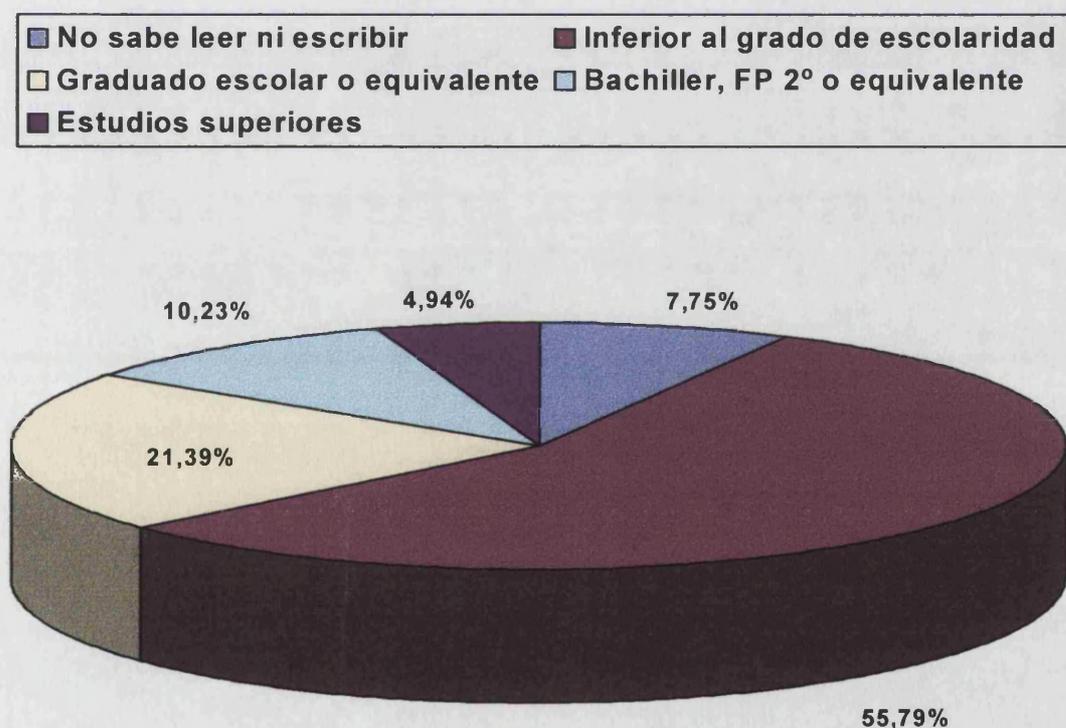
Edad	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	>90
Hombres	896	861	928	747	608	527	451	205	36	4
Mujeres	851	855	865	758	615	531	540	295	76	5



**Figura 17.- Distribución de la población por grupos de edad y sexo.** Fuente: Datos del Exmo. Ayto. de L'Alcudia

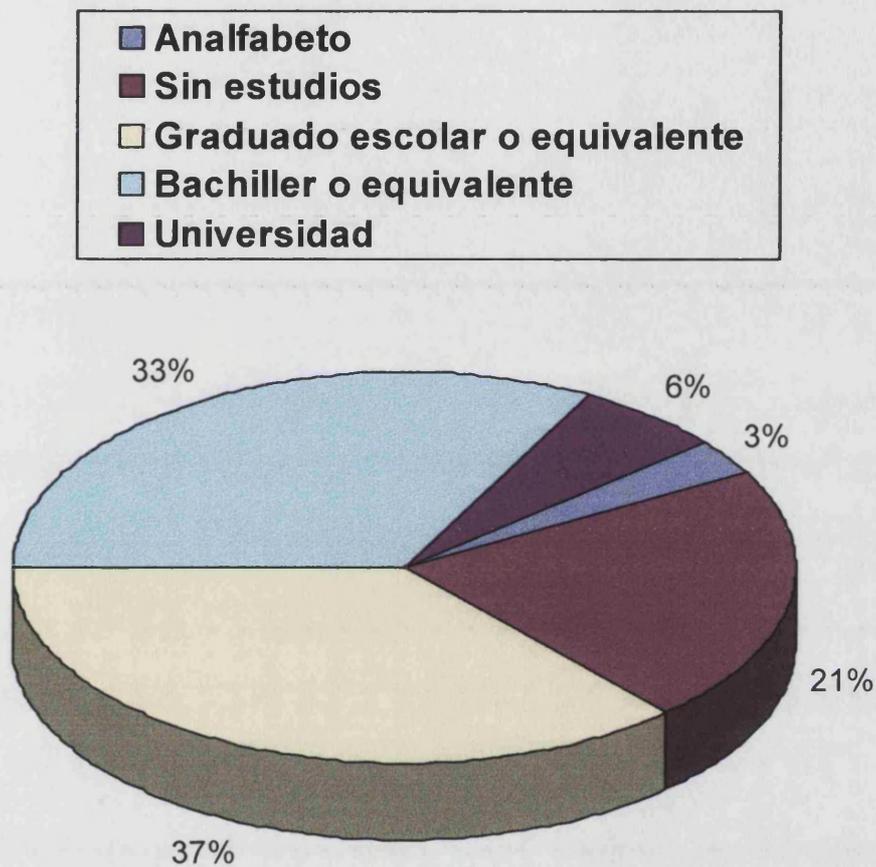
El nivel de estudios de la población queda reflejado en el gráfico siguiente, así como el correlato con los datos similares del global de la Comunidad Valenciana:

Puede apreciarse como la proporción de personas con estudios inferiores al grado de escolaridad es claramente superior en L'Alcudia (63,54%) con respecto a la media de la comunidad (24%).



**Figura 18.- Nivel de estudios de la población de L'Alcudia (1-1-95).**

Fuente: Datos del Exmo. Ayto. de L'Alcudia



**Figura 19.- Nivel de Instrucción de la población de la Comunidad Valenciana.** Fuente: Generalitat Valenciana, Institut Valencià d'Estadística, Cens de població de la Comunitat Valenciana, 1991

Los principales datos demográficos disponibles de la población de L'Alcudia y su correlato con los datos la provincia de Valencia y la Comunidad Autónoma Valenciana se resumen en la siguiente tabla:

	<b>L'Alcudia</b>	<b>Provincia de Valencia</b>	<b>Comunidad Valenciana</b>
<i>Nacimientos, 1995</i>	101	19396	36746
<i>Defunciones, 1995</i>	103	19226	34757
<i>Crecimiento vegetativo, 1995</i>	- 2	170	1989
<i>Tasa de Natalidad (/1000 habitantes), 1995</i>	9,49 (*)	9,09	9,41
<i>Tasa de Mortalidad (/1000 habitantes), 1995</i>	9,68 (*)	9,01	8,90
<i>Matrimonios, 1995</i>	56	11672	20733
<i>Tasa de nupcialidad (/1000 habitantes), 1995</i>	5,2	5,4	5,5
<i>Emigraciones, 1996</i>	148	34000	N.D.
<i>Inmigraciones, 1996</i>	66	38031	N.D.
<i>Saldo migratorio, 1996</i>	- 82	2385	N.D.

**Tabla 19 .- Demografía: movimiento de la población** (\*) = datos estimados  
N.D. = no disponibles. Fuentes: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1995. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1998. Anuari estadístic 1996 de la Comunitat Valenciana. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià Estadística. València 1996.

Del análisis de los datos se desprende que el movimiento natural de la población del municipio de L' Alcudia es similar a grandes rasgos al observado en la provincia y la comunidad autónoma. El crecimiento vegetativo fue ese año, no obstante, negativo. En cuanto al movimiento migratorio se aprecia un

ligero predominio de las emigraciones sobre las inmigraciones que produce un balance negativo de 82 personas en 1995.

En la tabla 20 podemos observar datos referentes a la distribución de la población en las viviendas de L'Alcudia, la provincia y la comunidad autónoma.

		L'Alcudia	Provincia de Valencia	Comunidad Valenciana
<i>Total hogares, 1991</i>		3.077	671.072	1.218.924
<i>Tamaño medio hogares, 1991 (nº habitantes/hogar)</i>		3,26	3,14	3,15
<i>Hogares con <math>\geq 4</math> menores de 16 años (%), 1991</i>		1	0,9	1,04
<i>Hogares con <math>\geq 2</math> personas mayores de 64 años (%), 1991</i>		11,2	10,4	10,8
<i>Hogares según estudios realizados por persona principal (%), 1991</i>	<i>Analfabeto</i>	5,06	3,3	3,4
	<i>Sin estudios</i>	35,5	26,3	27,21
	<i>Primaria</i>	40,5	38,22	38,11
	<i>Secundaria</i>	15,46	23,76	23,65
	<i>Tercer grado</i>	3,4	8,3	7,60
<i>Hogares según actividad de la persona principal (%), 1991</i>	<i>Parados</i>	6,7	6,32	7,03
	<i>Inactivos</i>	32,72	35,34	36,49
	<i>Agricultura</i>	13,16	5,48	5,55
	<i>Industria</i>	21,96	17,21	16,10
	<i>Construcción</i>	7,83	6,74	7,02
	<i>Servicios</i>	17,38	28,62	27,40

**Tabla 20.- Datos demográficos de los hogares.** Fuente: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1991-92. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1994.

Respecto a los datos de la provincia y la comunidad, se aprecia en L'Alcudia una mayor proporción de hogares cuyo cabeza de familia carece de estudios y se dedica a la agricultura.

La actividad más frecuente de la persona principal es la industria, seguida de los servicios y la agricultura. El porcentaje de trabajadores dedicados a los servicios es inferior a la media de la provincia y la comunidad.

A continuación se exponen los principales datos referentes a la actividad de la construcción y las características de las viviendas:

		L'Alcudia	Provincia de Valencia	Comunidad Valenciana
<i>Viviendas familiares según año de construcción (%), 1991</i>	<i>Antes 1951</i>	23,52	18,16	17,15
	<i>Post 1980</i>	12,5	14,9	20,54
<i>Viviendas familiares según servicios e instalaciones (%), 1991</i>	<i>Agua corriente</i>	99	99	99
	<i>Agua caliente</i>	91,51	93,23	93,6
	<i>Cocina</i>	99,24	99,50	99,4
	<i>E. eléctrica</i>	99,50	99,58	99,4
	<i>Teléfono</i>	71,13	78,67	75,4
	<i>Sin ducha</i>	1,97	1,75	2
	<i>Sin WC</i>	1,14	1,02	0,96
<i>Licencias de obras concedidas, 1995</i>		41	4133	N.D.
<i>Licencias de obras/1000 hab, 1995</i>		3,8	1,8	N.D.

**Tabla 21 .- Datos de construcción y viviendas.** N.D.= no disponibles Fuente: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1991-92. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1994. Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1995. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1998.

Puede apreciarse que la disponibilidad de servicios e instalaciones por viviendas es similar a la media de la provincia. Las condiciones higiénico sanitarias son semejantes a las del conjunto de la provincia y de la Comunidad.

El número de licencias de obras es sustancialmente superior en L'Alcudia que la media provincial lo que refleja una mayor actividad del sector de la construcción en el municipio estudiado durante 1995.

Los principales datos referentes al mercado laboral se reflejan en la siguiente tabla:

	L'Alcudia	Provincia de Valencia	Comunidad Valenciana
<i>Tasa de paro, 1991</i>	21,11	18,30	15,9
<i>Paro registrado (31 Marzo 1991)</i>	894	N.D.	N.D.
<i>Paro registrado (31 Marzo 1993)</i>	819	N.D.	N.D.
<i>Paro registrado (31 Marzo 1994)</i>	869	N.D.	N.D.
<i>Paro registrado (31 Marzo 1995)</i>	719	162212	280581
<i>Paro registrado (31 Marzo 1996)</i>	637	N.D.	N.D.
<i>Paro registrado (31 Marzo 1997)</i>	556	N.D.	N.D.
<i>Población ocupada por sectores económicos (%), 1991</i>	<i>Agricultura</i>	18	8
	<i>Industria</i>	36	28
	<i>Construcción</i>	10	9
	<i>Servicios</i>	36	55

**Tabla 22.- Mercado laboral**

Fuentes: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1991-92. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1994. Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1993. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1995. Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1994. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1996. Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1995. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1998. Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1996-97. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1999. Anuari estadístic 1996 de la Comunitat Valenciana. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València 1996.

Se aprecia la disminución del paro registrado en L'Alcudia en los últimos años. Además puede observarse que la proporción de población ocupada en la agricultura y la industria es superior a la media de la provincia y la comunidad en detrimento del sector servicios.

La distribución de las tierras se muestra a continuación:

		L'Alcudia	Valencia	C.Valenciana
<i>Distribución de tierras (%)</i> , 1995	<i>Cultivos</i>	76	40	N.D.
	<i>Prados</i>	0	1	N.D.
	<i>Forestal</i>	1	42	N.D.
	<i>Otros</i>	22	16	N.D.

**Tabla 23.- Distribución de las tierras.** Fuente: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1995. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1998.

Puede observarse que la mayoría de las tierras se dedican a la explotación agraria.

En la siguiente tabla se exponen algunos datos relativos al transporte y comunicaciones.

	L'Alcudia	Provincia de Valencia	C. Valenciana
<i>Parque de vehículos</i> , 1995	5005	1071310	2019442
<i>Vehículos/ 100 hab</i> , 1995	47,0	48,68	50,12
<i>Turismos</i> , 1995	3308	793245	1489839
<i>Turismos/100 hab</i> , 1995.	31,09	36,05	36,97
<i>Red telefónica (líneas)</i> , 1995	3220	856540	1590389
<i>Líneas telefónicas/100 hab</i> , 1995	30,26	38,92	39,47

**Tabla 24.- Transportes y comunicaciones.** Fuente: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1995. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1998.

Se aprecia una ligera disminución en el número de vehículos y de líneas telefónicas por habitante en el municipio de L' Alcudia con respecto a los datos de la provincia y la comunidad.

Por último pueden observarse los datos relativos a los servicios sanitarios:

		<b>L'Alcudia</b>	<b>Provincia de Valencia</b>	<b>Comunidad Valenciana</b>
<i>Centros de atención primaria, 1998</i>		0	429	651
<i>Consultorios médicos, 1993</i>		1	61	N.D.
<i>Centros de atención especializada</i>	<i>Hospitalaria</i>	0	27	60
	<i>Extrahosp.</i>	0	1562	2615
<i>Farmacias, 1993</i>		5	1074	N.D.

**Tabla 25.- Servicios Sanitarios.** Fuente: Anuari estadístic municipal i comarcal. Comunitat Valenciana 1993. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València, 1995. Anuari estadístic 1999 de la Comunitat Valenciana. © Generalitat Valenciana. Institut Valencià d'Estadística. València 2000.

**EN RESUMEN:**

- **L' ALCUDIA ES UN MUNICIPIO RURAL CON UNA POBLACIÓN JOVEN AUNQUE ESTABLE EN LOS ÚLTIMOS AÑOS.**
- **LAS PROPORCION DE POBLACIÓN DEDICADA A LA INDUSTRIA Y LA AGRICULTURA ES SUPERIOR A LA DE LA COMUNIDAD.**
- **EL NIVEL DE ESTUDIOS DE LOS HABITANTES ES INFERIOR AL PROMEDIO DE LA COMUNIDAD.**
- **LOS INDICADORES ECONÓMICOS SON SIMILARES A LOS DE LA COMUNIDAD.**
- **LAS CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS SON BUENAS Y EQUIPARABLES AL NIVEL DE LA COMUNIDAD.**

## DISCUSSION

## V. DISCUSION

Los escasos estudios de prevalencia de infección por el VHC realizados en niños sanos son unánimes en demostrar su escasa frecuencia. Así, dos estudios japoneses obtienen una prevalencia de anti-VHC de 0,00% en menores de 14 años (89) y de 0,36% en jóvenes de 16 a 20 años (88). Otro trabajo italiano encuentra una seroprevalencia de 0,40% en escolares de 14 años (90). De la lectura de estos resultados parece, pues, que sería la adolescencia el período en el que probablemente se contraigan la mayoría de las infecciones por el VHC que se informan en el amplio rango de edad que se conoce como infancia. Esto guarda relación con el principal mecanismo de infección por el VHC en el mundo occidental en la actualidad: la vía parenteral al compartir jeringuillas con el uso de drogas por vía intravenosa, así como punturas accidentales, tatuajes y "piercing". Estos hechos son excepcionales en edades inferiores a los 14 años. También merece consideración la transmisión inaparente, probablemente consecuencia de exposiciones parenterales inadvertidas, cuya frecuencia aumenta obviamente conforme lo hace la edad.

La importancia que tiene nuestro trabajo viene dada por haber podido estudiar una muestra homogénea de niños sanos con una media de edad de 10,65 años y en condiciones normales de escolarización. Esto nos permite conocer con precisión la verdadera situación de la infección por el VHC en una

población no seleccionada por su pertenencia a un determinado grupo de mayor riesgo.

Se asume que las tasas de prevalencia en la población pediátrica oscilan entre el 0,1 y 0,4% en los países desarrollados, sustancialmente inferiores si se comparan con las descritas en la población general del mismo entorno, alrededor del 1%. Estos datos son concordantes con el estudio de población adulta de la misma área, realizado por nosotros en los donantes de sangre nuevos durante el período de 1995 a 1997, que mostró una prevalencia de positividad de anti-VHC por el método de cribado del 0,71%. Los datos obtenidos deben ser matizados por el sesgo de selección que supone la autoexclusión para la donación de aquellos sujetos que tienen o han tenido comportamientos de riesgo para la infección por VHC y la omisión de las edades extremas de la vida en los grupos de donantes.

En nuestra población de escolares hemos obtenido una seroprevalencia de anticuerpos frente al VHC por el método de cribado de un 0,29%. El citado trabajo de Tanaka y cols. (89) realizado en 1442 escolares en Japón no demuestra ningún caso de positividad de los anti-VHC. Gessoni y cols (90), en cambio, en un estudio de 1015 escolares de 14 años de un área urbana del Veneto describen una prevalencia del 0,40%, algo superior a la encontrada por nosotros, si bien se trata niños mayores que los nuestros y además está realizado en un área urbana. Nuestros datos son asimismo superponibles a los descritos por los CDC en USA (0,20%) para el grupo de edad similar.

La edad de la población estudiada es sustancialmente inferior a la que del que podemos considerar como nuestro grupo control, los adultos jóvenes donantes de sangre del área geográfica de L'Alcudia. Por lo tanto, no es extraño encontrar diferencias entre la prevalencia de anticuerpos del 0,29% en los niños y la observada en el grupo de donantes voluntarios (0,79%) del municipio de L'Alcudia. Está claramente demostrado que la prevalencia aumenta con la edad aun en grupos sin factores de riesgo de infección por el VHC (84).

La prevalencia de infección por el VHC varía ampliamente en función del área geográfica estudiada y se ha sugerido que este hecho guarda relación con las condiciones higiénico-sanitarias. Al menos esto sugiere un estudio realizado en Camerún que investiga una población escolar similar en número y edad a nuestra muestra y que encuentra una prevalencia tan alta como el 14,5% (91). Estos autores parecen encontrar una asociación significativamente más alta de la presencia de anti-VHC con la clase social más baja de la familia. Otros factores deben, pues, estar implicados como se desprende de la lectura de un trabajo realizado en Nicaragua, donde a pesar de la gran prevalencia de marcadores serológicos para el VHA en los niños pequeños (72,7% en el grupo de 2-4 años de edad), expresión sin duda de unas pobres condiciones higiénico-sanitarias, los autores no encuentran una mayor prevalencia de anticuerpos frente al VHC, como cabría esperar si el nivel de higiene tuviera una importancia capital en la transmisión del VHC (87).

El análisis del municipio de L'Alcudia permite apreciar unas características típicas de una población rural relativamente cercana al área metropolitana de la capital de la provincia y bien comunicada con ella. En L'Alcudia coexisten elementos característicos del medio rural como el superior porcentaje de población dedicada a la agricultura junto con una presencia industrial y del sector servicios más que notable. Esto hace que en cierto modo pueda considerarse a L'Alcudia como un municipio en el que se engloban los distintos sectores socioeconómicos de la Comunidad Valenciana. Así, pensamos que la población infantil estudiada es suficientemente representativa del global de la comunidad y, por extensión, del estado español, cuyos resultados deben ser equiparables. El nivel económico y sanitario de esta área rural es muy bueno y equiparable al que se encuentra en cualquier país desarrollado. Por tanto, nuestros resultados son los esperados en una población infantil del mundo occidental.

En la definición de caso que hemos establecido, se ha utilizado la positividad del EIA, puesto que a efectos epidemiológicos interesa utilizar una prueba de screening que si bien pueda perder especificidad, nos permita ganar sensibilidad en la detección de positivos. Los métodos de EIA utilizan una mezcla de péptidos sintéticos, recombinantes o una combinación de ambos frente a los que se miden los anticuerpos IgG que tiene la muestra. Cuando se indica que un suero es reactivo se está diciendo que tiene anticuerpos frente a alguno o todos los componentes antigénicos empleados en la prueba, pero no sabemos frente a cual o cuales. El método ACCESS® empleado en nuestro estudio, posee diferentes mezclas de antígenos y es considerado de "3ª

generación". Las pruebas de 1ª y 2ª generación han caído en desuso y debido a su menor sensibilidad se debe ser precavido al interpretar datos epidemiológicos obtenidos con estas pruebas antiguas ya que, en algunos casos, los resultados pueden no reflejar la realidad.

El resultado positivo del método EIA indica, en general, exposición al VHC. En la mayoría de los casos, esto se correlaciona con la presencia de ARN-VHC en la sangre por lo que es un marcador de alto valor predictivo de infección actual. Esto es especialmente cierto con las reactividades elevadas de anticuerpos obtenidas con algunas marcas comerciales. Algunos laboratorios tienen la experiencia de que con algunas marcas de ELISA es posible relacionar el "índice de reactividad" con la positividad del RIBA y por tanto aplicar el valor predictivo de este para la presencia de RNA circulante. En nuestros dos casos los títulos obtenidos (1,11 y 1,13 S/O, respectivamente) pueden considerarse bajos si se comparan con los que se suelen observar en pacientes con enfermedad hepática crónica y anti-VHC +. En un 20-25% de los casos, la positividad del EIA también puede indicar exposición pasada y curada, pero esta situación, como discutiremos con posterioridad, debe ser confirmada mediante la detección del RNA viral.

Las pruebas confirmatorias (RIBA) se basan en analizar con los péptidos individualizados la reactividad obtenida mediante una prueba de ELISA convencional. Se realiza sobre una tira de nitrocelulosa a la que se han adherido estos péptidos en diferentes lugares. La adición de la muestra y su revelado visualizará frente a que péptidos existen anticuerpos. La prueba sólo

puede leerse como negativa (ausencia de bandas), positiva (reactividad al menos para dos antígenos) e indeterminada (cualquier otro patrón). Para aumentar la especificidad de la prueba, algunos autores defienden la necesidad de que las reactividades sean igualmente dos pero, además, frente a péptidos de genes diferente. En el 99% de los sueros anti-VHC positivos se ven bandas positivas tanto para el c33c como para el c22-3 (119). Al igual que con los ELISAS también estas pruebas han sido mejoradas tanto en sensibilidad como en especificidad.

Se han publicado numerosos artículos que demuestran el valor de los primeros RIBA para VHC, basados en antígenos recombinantes, como ensayos suplementarios a los procedimientos simple- y multi-antígeno de cribado anti-VHC (120,121). No obstante, hay una proporción de las muestras repetidamente reactivas según un procedimiento multi-antígeno de cribado anti-VHC que se clasifican como indeterminadas. Un resultado de test indeterminado indica que el anti-VHC puede o no estar presente y que no se puede llegar a una conclusión sobre si existe infección por VHC.

Con las pruebas de tercera generación como el RIBA 3.0® empleado por nosotros se sigue obteniendo resultados indeterminados, si bien de forma mucho más infrecuente. Una muestra indeterminada, que presenta reactividad única frente a un péptido, con una marca comercial concreta puede presentar, con otra marca, reactividad para otro péptido diferente o incluso ser positiva. En este caso, la interpretación es al menos conflictiva. Un test de confirmación positivo se correlaciona estrechamente con la infectividad, presencia de

enfermedad hepática y viremia positiva (ARN del VHC) en poblaciones de alto y bajo riesgo. Sin embargo, en algunos sueros RIBA positivo o indeterminado no se detecta ARN del VHC de forma repetida. Es muy probable que estos pacientes hayan aclarado el virus de la circulación, recuperándose de la infección (122). También es posible la presencia de ARN con títulos bajos y test de confirmación indeterminado en los pacientes inmunosuprimidos o alteraciones en la respuesta inmune. En el caso de que se descarten estas patologías deberá pensarse, incluso, en una primoinfección. Una viremia no detectada o resultados falsos positivos serían interpretaciones alternativas menos probables.

Entre los métodos diagnósticos de la infección por VHC, es fundamental la detección cualitativa del genoma viral mediante PCR. La PCR ha mostrado ser el método más sensible para la detección de ARN del VHC. Si esta prueba es positiva es expresión de la presencia del virus y, por tanto, de infección. La presencia de ARN del VHC se asocia con la transmisión del virus y constituye la mejor prueba predictiva de infectividad (123,124,125), siendo aceptada actualmente como patrón de referencia con el que el resto de las técnicas deben compararse (126).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el RNA del VHC se puede detectar en el suero de prácticamente la totalidad de los pacientes con infección aguda o crónica por el VHC (127). La positividad de la PCR del VHC en suero se produce muy tempranamente en el curso de la infección, por lo que constituye un método excelente para el diagnóstico precoz de la misma (128).

La viremia desaparece en los individuos con infección aguda resuelta mientras que permanece, a veces intermitentemente, durante años en los individuos que desarrollan infección crónica (129). Trabajos recientes señalan que los títulos de viremia tienden a ser más altos en pacientes con enfermedad hepática crónica que en donantes de sangre asintomáticos (124,130,131,132), así como si la adquisición del virus ha sido post-transfusional (133), si existe inmunodepresión farmacológica (134,135) y en la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (136). Los trabajos que investigan la relación del nivel de viremia y la gravedad de la enfermedad hepática muestran resultados contradictorios, ya que tanto títulos altos (131), como títulos bajos se han relacionado con el nivel de gravedad de la enfermedad (134, 137).

Mientras la inmensa mayoría de los pacientes anti-VHC positivos con enfermedad hepática crónica tienen una infección presente por el VHC confirmada por la positividad de la PCR sérica, sólo 35 % y 25% de los donantes de sangre anti-VHC + en el cribado son RIBA + y RNA-VHC +, respectivamente (59,138,139,140,141,). Estos datos coinciden con los obtenidos por nosotros en el estudio de donantes de L'Alcudia y pueblos colindantes, donde el test de cribado fue reactivo en el 0,71% pero la positividad del RIBA y la PCR descendió a la mitad (0,35%).

La proporción de donantes de sangre anti-VHC + que son confirmados como RNA-VHC +, varía entre el 70% para aquellos que además son RIBA positivos, al 2-25% para los RIBA indeterminados y ninguno entre los que son RIBA negativos. Estos datos proceden de trabajos realizados con RIBA de 1ª y

2ª generación. Por tanto, los tests confirmatorios para demostrar la infección por el VHC deben siempre realizarse en los sujetos asintomáticos con bajo riesgo de infección, particularmente si tienen transaminasas normales, pero podrían no ser necesarios en los pacientes anti-VHC + con enfermedad hepática crónica. No obstante, en un trabajo reciente de un grupo francés (142) se afirma que en los pacientes en los que se sospecha clínicamente una infección por el VHC, las pruebas de confirmación tipo inmunoblot no añaden ninguna información adicional en aquellos que han resultado positivos en el cribado con EIAs de 2ª o 3ª generación. La detección cualitativa de RNA del VHC por PCR se reservaría para aquellos casos de reactividad débil con el EIA o para cuando se precisa conocer el estado replicativo del VHC para tomar una decisión clínica.

En suma, el algoritmo diagnóstico de la infección por VHC varía en función de la presencia o no de factor de riesgo. En un sujeto con evidencia clínica, bioquímica (transaminasas elevadas de forma repetida) o histológica de enfermedad hepática, la positividad de anti-VHC por un método de EIA es suficiente para establecer el diagnóstico de infección por VHC. Así pues, como método de cribado se utilizará un EIA. En el caso de individuos de bajo riesgo para contraer infección por VHC (donantes de sangre), la positividad para anti-VHC por un método de EIA deberá ser confirmada por una prueba complementaria (RIBA). Un resultado positivo o indeterminado (reactividad para uno solo de los antígenos incluidos en el análisis) por RIBA, sin embargo, no aclara la cuestión de si se trata de una infección activa o pasada. Esta cuestión se plantea especialmente en individuos con cifras de ALT

repetidamente normales. Para dilucidarlo, recurriremos a la determinación de RNA del VHC por PCR: si esta es positiva, confirmaremos la existencia de replicación activa; por el contrario, la negatividad de la misma en una sólo ocasión no permite afirmar que se trate de una infección pasada y realizaremos un control bioquímico y virológico más prolongado.

Este proceder es el que hemos seguido en nuestro trabajo, mediante la realización de una ulterior PCR, que en los dos niños fue negativa. Por tanto, esto nos permite afirmar que los dos casos de presencia de anticuerpos en la fase de screening, no tenían RNA del VHC de forma repetida, es decir, no estaban infectados en el momento del estudio.

En la curación a partir de una hepatitis C aguda, sin tratamiento, los anticuerpos anti-VHC van disminuyendo lentamente y pueden desaparecer entre los 12 o 24 meses, si bien muchas veces persisten más de 5 años. El ARN, al cesar la replicación se negativiza persistentemente. En los pacientes que curan a partir de una forma crónica tras tratamiento antiviral se observa el mantenimiento de la reactividad frente a las proteínas c22 y c33-c, de forma indefinida. Se desconoce el motivo de esta persistencia, que puede ser debida a la larga estimulación antigénica que supuso esta forma de la enfermedad

Es probable que los dos casos estudiados, en algún momento tuvieran contacto con el VHC y que los dos fueran capaces de aclarar la infección. Se ha sugerido que la infección por VHC de comienzo precoz podría ser benigna (143). La remisión espontánea de la hepatitis crónica C pese a su rareza es,

asimismo, posible. Un trabajo del grupo de Fujisawa describe una tasa de remisión espontánea del 8,3% en 48 niños con hepatitis crónica por VHC seguidos más de tres años (115). Esta cifra es claramente más alta que la descrita en los adultos donde el aclaramiento espontáneo del VHC en los pacientes infectados crónicamente podría calificarse como anecdótico (114). Esta disparidad puede atribuirse a las diferencias entre el sistema inmune de los niños y los adultos o a que la tasa de mutación del VHC es más baja en los niños que en los adultos (144). No obstante, se conocen mal las interacciones del VHC con el sistema inmunitario inmaduro de los niños. Una mejor comprensión de los mecanismos por los que el sistema inmunitario aclara el VHC y previene la cronicidad, permitiría prever la historia natural de la infección por el VHC, tanto en paciente inmunodeficientes como inmunocompetentes.

También podría pensarse en la posibilidad de un falso positivo debido a una reactividad cruzada con otros virus de estructura antigénica similar o enfermedades autoinmunes (145), de las que no había ninguna evidencia clínica en los dos sujetos anti-VHC + de nuestra muestra

En definitiva, la evolución de la infección por el VHC en la población pediátrica no se conoce bien, al menos en los casos esporádicos no encuadrables en los grupos de riesgo para transmisión parenteral o vertical, probablemente porque el número de pacientes es relativamente pequeño, el curso clínico habitualmente asintomático de la infección, la ausencia de información acerca de seguimientos a largo y porque algunos de los pacientes

reciben tratamiento antiviral con la lógica alteración en el curso natural de la infección (146).

Los mecanismos de transmisión del VHC a la población infantil son inciertos. No hemos conseguido encontrar el posible origen de la infección en nuestros dos casos, habida cuenta de la negatividad de los resultados en el entorno familiar. Otros trabajos tampoco logran encontrar evidencias de transmisión intrafamiliar en los pacientes pediátricos (147). Cabría pensar en que en alguna de las actuaciones terapéuticas sufridas por los niños como la visita al dentista, la cirugía o las inyecciones parenterales pudiera haberse entrado en contacto con el VHC. No obstante, las condiciones higiénicas de la asistencia sanitaria en nuestro país en las últimas dos décadas eran óptimas, debido a la obligatoriedad de esterilización del instrumental quirúrgico, utilización de material de inyección de un solo uso, etc, lo que hace esta posibilidad poco plausible.

En nuestro estudio no hemos hallado ningún antecedente epidemiológico relevante que pudiera asociarse de forma inequívoca a la adquisición de la infección por el VHC. Considerando la prevalencia de infecciones por VHC con viremia en la zona de L'Alcudia (0,35%) y la población de mujeres en edad fértil (aproximadamente 2000), mediante una sencilla regla de tres, tendríamos alrededor de 7 mujeres con la posibilidad de transmitir una infección por el VHC a sus hijos. Si asumimos, como se ha expuesto en la introducción, que el riesgo de transmisión vertical a partir de una madre virémica (PCR VHC +) se sitúa en torno a un 5% y continuando con este razonamiento necesariamente

teórico, esto nos conduciría a un 0,017% de prevalencia esperada en la población infantil si las infecciones se contrajeran exclusivamente por vía perinatal. Esta cifra es aproximadamente 17 veces inferior a la encontrada por nosotros (0,29%). Aún más, en ninguno de los dos casos hay ninguna evidencia que permita hacer pensar en una hipotética transmisión vertical, ya que las madres fueron anti-VHC negativas. Por tanto, necesariamente deben existir otro/s mecanismo/s de transmisión del VHC en aquellos pacientes pediátricos que, como la población que hemos estudiado, no pertenecen a ninguno de los clásicos grupos de riesgo de exposición parenteral descritos previamente (transmisión inaparente).

## VI. CONCLUSIONES

1. LA PREVALENCIA DE MARCADORES SEROLÓGICOS DE INFECCIÓN POR EL VHC ES BAJA (0,29%) EN LOS ESCOLARES DEL MUNICIPIO DE L'ALCUDIA, A SEMEJANZA DE LO OBSERVADO EN LOS NIÑOS SANOS DEL MUNDO OCCIDENTAL.
2. NO HEMOS ENCONTRADO NINGÚN CASO DE INFECCIÓN ACTIVA POR EL VHC EN LOS ESCOLARES ESTUDIADOS.
3. LA INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA PARA INTENTAR DILUCIDAR EL MECANISMO DE INFECCIÓN POR EL VHC HA RESULTADO INFRACTUOSA EN LOS DOS CASOS ANTI-VHC+, SUGIRIENDO QUE LA TRANSMISIÓN INAPARENTE ES UNA REALIDAD COMÚN EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA.
4. LA SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE AL VHC EN LOS DONANTES DE SANGRE NUEVOS DEL ÁREA ES SUPERIOR (0,71%) A LA OBSERVADA EN LA POBLACIÓN ESCOLAR.
5. LA MITAD DE LOS DONANTES ANTI-VHC POSITIVOS EN EL CRIBADO NO SE CONFIRMAN COMO VERDADEROS POSITIVOS MEDIANTE EL TEST DE CONFIRMACIÓN Y LA PCR SÉRICA DEL VHC.

## BIBLIOGRAFIA

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Centers for Disease Control and Prevention (Hepatitis Branch): Epidemiology and Prevention of viral hepatitis A to E: an overview, 1997.
2. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EK, Shable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88:773-779.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner SJ, Overby LR, Bradley DN y Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
4. 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.
5. Purcell RH, Miller RH. The nature of genetic variation among viruses. *J Hepatol* 1991; 12 (Suppl 4): S2-S5.
6. Martell M, Esteban JL, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66:3255-3259.

7. Christie JM, Chapel H, Chapman RW, Rosenberg WM. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. *Hepatology* 1999; 30: 1037-44.
8. Brechot C. Hepatitis C virus genetic variability: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 1994; 84: 41-47.
9. Choo QL, Richman KH, Han JH, Han HJ, Berger K, Lee C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2451-2455.
10. Simmonds P, Alberti A, Alter H, Bonino F, Bradley D, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-1324.
11. Simmonds P. Variability of Hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21:570-583.
12. Zeuzem S, Lee J, Roth W. Mutations in the nonstructural 5 A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 1997; 25: 740-744.
13. Noursbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Brechot C. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 161-168.

14. Pernas M, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA, Pardo M, Carreño V. Sequence of non-structural regions 3 and 5 of hepatitis virus genomes from Spanish patients: existence of a predominant variant related to type 1 b. *J Gen Virol* 1995; 76:415-420.
15. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Superinfection of heterologous hepatitis C virus in a patient with chronic type C hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105: 583-587.
16. Bjoro K, Froland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T. Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N Engl J Med* 1994; 331: 1607-1611.
17. Brillanti S, Folli M, Gaiani S, Masci C, Miglioli M, Barbara L. Persistent hepatitis C viremia without liver disease. *Lancet* 1993; 341:464-465.
18. Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion associated hepatitis C. *N Engl J Med* 1995; 332:1463-1466.
19. Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 70-81.
20. Bianchi L, De Groote J, Desmet VJ et al. Acute and chronic hepatitis revisited. Review by an international group. *Lancet* 1977; 2: 914-919.

21. Hopf U, Muller B, Kuther D, Stemerowicz R, Lobeck H, Ludtke-Handjery A, et al. Long-term follow-up of post-transfusion and sporadic chronic non-A non-B hepatitis and frequency of antibodies to hepatitis C virus. *J Hepatol* 1990; 10:69-76.
22. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3468-3472.
23. Pozzato G, Moretti M, Franzin F, Croce LS, Tiribelli C, Masayu T, et al. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991; 2: 509-511.
24. Kuo G, Choo QL, Alter H, Gitnick GL, Redecker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364
25. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibodies to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321:1494-1500.
26. Esteban JI, González A, Hernández JM, Viladomiu L, Sánchez C, López-Talavera JC, et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion associated hepatitis. *N Eng J Med* 1990; 323: 1107-1112..

27. Stevens CE, Taylor PE, Pindych J, Choo QL, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Epidemiology of hepatitis C virus: a preliminary study in volunteer blood donors. *J Amer Med Ass* 1990; 263:49-53.
28. Lok AS, Ma OC, Chan TM, Lai CL, Chung HT, Nag CP, Lam JS. Overestimation of the prevalence of antibody to hepatitis C virus in retrospective studies on sorted sera. *Hepatology* 1991; 14:756-762.
29. Tibbs CJ, Palmer SJ, Coker R, Clark SK, Parsons GM, Hojvat S, et al. Prevalence of hepatitis C in tropical communities: the importance of confirmatory assays. *J Med Virol* 1991; 34: 143-147.
30. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Btay GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenic factor or false positive result?. *Lancet* 1990; 335:754-757.
31. MacKenzie RW, Davis JP, Peterson DE, Hibbard AJ, Becker G, Zarvan BS. Multiple false-positive serologic test for HIV, HTLV-1 and hepatitis following influenza vaccination. *JAMA* 1991; 268: 1015-1017.
32. Watanabe J, Matsumoto C, Fujimura K, Shimada T, Yoshizawa H, Okamoto H, et al. Predictive value of screening test for persistent hepatitis C virus infection evidenced by viraemia: Japanese experience. *Vox Sang* 1993; 65:199-203.

33. Prohaska W, Schroeter E, Kaars-Wiele P, Kleesiek K. Enzyme immunoassays for anti-hepatitis C virus antibodies improved specificity and analytical sensitivity by combination of three different recombinant viral proteins in second generation test. *Eur J Clin Biochem* 1992; 30:397-404.
34. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C. Evaluation of third generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994; 66:122-129.
35. Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Gabriek F, Branger M, Degott C, Elías A, et al. Chronic non-B non-C hepatitis among blood donor assessed with HCV 3<sup>rd</sup> generation test and polymerase chain reaction. *J Hepatol* 1993; 19:167-170.
36. Clemens JM, Tascar S, Chau K, Vallari D, Shih JW, Alter HJ, et al. IgM antibody response in acute hepatitis C viral infection. *Blood* 1992; 79:169-172.
37. Zaaijer HL, Mimms LT, Cuypers HT, Reesink HW, van der Poel CL, Taskar S et al. Variability of IgM response in hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1993; 40: 184-187.
38. Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Di Nello R, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337:317-319.

39. Vallari D, Jett B, Alter HJ, Mimms LT, Holzman R, Shih JW. Serological markers of post-transfusion hepatitis C viral infection. *J Clin Microbiol* 1992;30:552-556.
40. Persing DH. Indeterminate results of the 2<sup>nd</sup> generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of High-level c22-3 reactivity and influence of HCV genotypes. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (1): 311-312.
41. Brechot C. Polymerease chain reaction: A new tool for the study of viral infections in hepatology. *J Hepatol* 1990; 11:124-129.
42. Zaaijer HL, Cuypers HTM, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Leslie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993;341:722-724.
43. Scheuer PJ, Ashraf Zadeh P, Sherlock S, et al. The pathology of hepatitis C. *Hepatology* 1992; 15:567-571.
44. Rebulla P, Mozzi F, Contino G, et al. Antibody to hepatitis C virus in 1305 italian multiply transfused thalasemics: a comparision of first and second generation tests. *Transfus Med* 1992; 2: 69-70.
45. Anónimo. Hepatitis C: global prevalence. World Health Organization. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72:341-348.
46. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999; 341:556-562.

47. Zuckermann AJ, Thomas HC : Viral hepatitis : scientific basis and clinical management. Londres : Churchill Livingstone, 1993 ; 313.
48. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K et al. The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. N Engl J Med 1992; 327 : 1899-1905.
49. Ranger S, Martin P, Roussanne MC, Denis F. Prevalence of HCV antibodies in the general population and in selected groups in Limoges, France. Gut 1993 ; 34 Supl 2; 50-51.
50. Louis FJ, Mambert B, Le Hesram JY, Kemmegne J, Delaporte E, Louis JP. High prevalence of anti-HCV antibodies in a Cameroon rural forest area. Transact Royal Soc Tropical Med Hyg 1994 ; 88 : 53-54.
51. Farghaly AG, Barakat RM. Prevalence, impact and risk factors of hepatitis C infection. J Egypt Public Health Assoc 1993 ; 68 : 63-79.
52. Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, Yoshizawa K, Yabu K, Furuta K et al. Transmision of hepatitis C in an isolated area in Japon: community-acquired. Gastroenterology 1994;106:1596-1602.
53. Sheu J-Ch, Wang JT, Wang TH, Wang CY, Yang PM, Huang GT, et al. Prevalence of hepatitis C infection in a community in Taiwan. Detection by synthetic peptide-based assay and polymerase chain reaction. J Hepatol 1993; 17:192-198.

54. Montecalvo MA, Lee Ms, De Palma H, Wynn PS, Lowenfels AB, Jorde U, et al. Seroprevalence of human immunodeficiency virus-1, hepatitis B virus, Hepatitis C virus in patients having major surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 627-632.
55. Esteban R, Esteban JI, López-Talavera JC et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection. En : Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991 ; 413-415.
56. Muñoz Gómez R, García Monzón C, García Buey L, Lo Iacono O, Borque MJ, García Sánchez A, Pajares JM, Moreno Otero R. Hepatitis C virus infection in Spanish volunteer blood donors: HCV RNA analysis and liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 273-277.
57. García-Bengoechea M, Emparanza JI, Sarriugarte, Cortés A, Vega JL, González F, Arenas JL. Antibodies to hepatitis C virus: a cross-sectional study in patients attending a trauma unit or admitted to hospital for elective surgery. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995,7;237-241.
58. Sacristán B, Gastañares MI, Elena A, Sacristán M, Barcenilla J, García JC, et al. Infección por el virus de la hepatitis C: estudio seroepidemiológico en población general de la Rioja. *Med Clin (Barc)* 1996,107: 331-335.

59. Esteban JI , López-Talavera JC, Genescà J, Madoz P, Viladomiu L, Muñiz E, Martín-Vega C, Rosell M, Allende H, Vidal X, et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991;115: 443-449.
60. Salmerón FJ, Palacios A, Pérez-Ruiz M, Torres C, Oyonarte S, Fernández-Montoya A, Ruiz-Extremera A. Epidemiology, serological markers, and hepatic disease of anti-HCV ELISA-2-positive blood donors. *Dig Dis Sci* 1996; 41:1933-1938.
61. Montoro JA: Prevalencia de los marcadores serológicos de los virus de las Hepatitis B y C en donantes de sangre de la Comunidad Valenciana: Técnicas de despistaje de portadores en los bancos de sangre. En : Herrera Ballester A, Ortega González E y Soler Ros JJ (eds.): *Hepatitis Viricas*.1992, Editorial Aguilar. Valencia.
62. Bukh J, Wantzin P, Krogsdgaard K, et al. High prevalence of HCV RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody test to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis* 1993; 168: 1343-1348.
63. Pereira BJJ, Mildford EL, Kirkman RL et al. Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. *N Eng J Med* 1992; 327: 910-915.
64. Mitjans Lafont L. Prevalencia del Virus de la Hepatitis C en la Comunidad Valenciana. V Curso de Hepatitis Víricas. Resumen de ponencias. pp 27-28. Valencia, 1995.

65. Morales MA, Pineda JA, Leal M, Pino R, Torronteras R, Sánchez-Quijano A, Lissen E. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en varones homosexuales. *Med Clin (Barc)*; 1993; 100: 50-52.
66. Osella AR, Joekes S, Blanch N, Yacci MR, Centonze S, Sileoni S. Hepatitis B and C virus sexual transmission among homosexual men. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 49-52.
67. Ortega E, Avila E, Soler JJ, Tuset C, Maínez MJ, Herrera A. Virus de la hepatitis C y Homosexualidad. VIII Congreso Nacional del Grupo Español para el estudio de las ETS. Bayona (Vigo), Octubre 1990.
68. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB et al. Hepatitis C virus infection in posttransfusion hepatitis. An analysis with first and second generation assays. *N Engl J Med* 1991; 325: 1325-1329.
69. Koretz RL, Abbey H, Coleman E et al. Non A, non B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med* 1993; 119: 110-115.
70. Brettler DB, Alter HJ, Dienstag JL, et al. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990; 76: 254-256.
71. Scriber GB, Busch MP, Kleinman SH et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996; 334:1685-1690.
72. Pereira BJG, Mildford EL, Kirkman RL, et al. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Eng J Med* 1991; 325: 454-460.

73. Laycock KA, Wright TL, Pepose JS. Lack of evidence for hepatitis C virus in corneas of seropositive cadavers. *Ann J Ophthalmol* 1994; 117: 401-402.
74. Bolumar F, Hernández Aguado I, Ferrer L, Ruiz I, Aviñó MJ, Rebagliato M. Prevalence of antibodies to hepatitis C in a population of intravenous drug users in Valencia, Spain, 1990-1992.
75. Santana Rodríguez OE, Malé Gil ML, Hernández Santana JF, Limiñana Cañal JM, Martín Sanchez AM. Prevalence of serologic markers of HBV, HDV, HCV and HIV in non-injecting drug users compared to injection drug users in Gran Canaria, Spain. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 555-561.
76. Alter HJ, Coleman PJ, Alexander J et al. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A non-B hepatitis. *JAMA* 1989; 262:1201-1202.
77. Kiyosawa K, Sodeya T, Tanaka E et al. Hepatitis C virus infection in health care workers. In Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds.) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo: Springer-Verlag 1994: 479-482.
78. Mitsui T, Iwano K, Masuko K et al. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology* 1992; 16:1109-1114.
79. Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T et al. Risk of needlestick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol* 1992; 16:56-58.

80. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993; 19: 820-828 .
81. Osmond DH, Padian NS, Sheppard HW, Glass S, Shiboski SC, Reingold A. Risk factors for hepatitis C seropositivity in heterosexual couples. *JAMA* 1993; 269:361-365.
82. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore- an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1992; 117:887-890.
83. Bortolotti F, Vajro P, Cadrobbi P, Lepore L, Zancan L, Barbera C et al. Cryptogenic chronic liver disease and hepatitis C virus infection in children. *J Hepatol* 1992 ; 15 :73-76.
84. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Hepatitis C Virus Infection. *Pediatrics* 1998; 101(3):481-485.
85. Wejtal R, Hermodsson S, Iwarson S, Norkrans G. Mother to infant transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1990 ; 30 : 178-180.
86. Ruiz Moreno M, Sánchez V, Rúa MJ. Infección por virus C de la hepatitis en niños. *Rev Hepatol Clin (Madrid)* 1993 ; 1 :65-70.

87. Pérez OM, Morales W, Paniagua M, Strannegard O. Prevalence of antibodies to hepatitis A, b, C and E viruses in a healthy population in Leon, Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 17-21.
88. Oshita M, Hayashi N, Kasahara A et al. Prevalence of hepatitis C virus in family members of patients with hepatitis C. *J Med Virol* 1993; 41 : 251-255.
89. Tanaka E, Kiyosawa K, Sodeyama T et al. Prevalence of antibody to HCV in Japanese school children : comparision with adults and blood donors. *Am J Tropic Med Hyg* 1992 ; 46: 460-464.
90. Gessoni G, Manoni F. Prevalence of anti-HCV antibodies among teenagers in the Venetian area : a seroepidemiological study. *Eur J Med* 1993 ; 2 : 79-82.
91. Ngatchu T, Stroffolini T, Rapicetta M, Chionne P, Iantum D, Chiaramonte M. Seroprevalence of anti-HCV in an urban child population: a pilot survey in a developing area, Cameroon. *J Trp Med Hyg* 1992; 95: 1 57-61.
92. Montes Martínez I, Agulla Budiño A. Prevalencia de marcadores de hepatitis víricas en niños del norte de Extremadura. *An Esp Pediatr* 1996; 45:133-136.
93. Gil Miguel A, Ruedas A, Santos Santos M, Rey Calero J. Prevalencia de infección por el virus de la hepatitis C en escolares de un área urbana y periurbana de Madrid. *Aten Primaria* 1996; 17: 521-522.

94. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of hepatitis C virus associated with intravenous immunoglobulin administration-United States, October 1993-June 1994. *MMWR* 1994; 43: 505-509.
95. Bresee JS, Mast EE, Coleman PJ, et al. Hepatitis C virus infection associated with administration of intravenous immune globulin: a cohort study. *JAMA* 1996; 276: 1563-1567.
96. Yap PL, McOmish F, Webster AD, et al. Hepatitis C virus transmission by intravenous immunoglobulin. *J Hepatol* 1994; 21: 455-460.
97. Reinus JF, Leikin EL, Later HJ, et al. Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1992;1 17:881-886.
98. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N Engl J Med* 1994;330:744-750.
99. Resti M, Azzari C, Mannell F, Moriondo M, Novembre E, de Martino M, Vierucci A y Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection in Children. Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. *BMJ* 1998; 317:437-441.
100. Zanetti AR, Tanzi E, Paccagnini S, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1995; 345: 289-291.
101. Zimmermann R, Perucchini D, Fauchere JC et al. Hepatitis C virus in breast milk. *Lancet* 1995; 345: 928.

102. Karauchi O, Furui T, Itakura A, et al. Studies on transmission of hepatitis C virus from mother-to-child in the perinatal period. *Arch Obstet Gynecol* 1993; 253; 121-126.
103. Ogasawara S, Kage M, Kosai K, Shimarnatsu R, Kojiro M. Hepatitis C virus RNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mothers. *Lancet* 1993; 341: 561.
104. Uehara S, Abe Y, saito T, et al. The incidence of vertical transmission of hepatitis C virus. *Tohoku J Exp Med* 1993; 171: 195-202.
105. Haber BA, Maller ES, Watkins JB. Hepatitis C virus infection in infants whose mothers took illicit drugs intravenously. *J Pediatr* 1991; 119:929-931.
106. Nagata I, Shiraki K, Tanimoto K, Harada Y, Tanaka Y, Okada T. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J Pediatr* 1992; 120:432-434.
107. Cilla G, Pérez-Trallero E, Iturriza M, Carcedo A, Echevarria J. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:417.
108. Everhart JE, Di Bisceglie AM, Murray LM, et al. Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. *Ann Intern Med* 1990; 112: 544- 545.

109. Nakashima K, Ikematsu H, Hayashi J, Kishihara Y, Mutsutake A, Kashieagi S. Intrafamilial transmission of hepatitis-C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA* 1995; 274 : 1459-1461.
110. Díaz Morant V, de la Mata M, Costán G, Delgado M, Fraga E, Montero JL, Montero J y Miño G. Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis C. *Rev Esp Enf Digest* 1996; 88: 340-343.
111. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 5-14.
112. Kage M, Fujisawa T, Shiraki K, Tanaka T, Fujisawa T, Kimura A, Shimamatsu K, et al. Pathology of chronic hepatitis C in children. Child Liver Study Group of Japan . *Hepatology* 1997; 26:771-775.
113. Badizadegan K, Jonas MM, Ott MJ, Nelson SP, Pérez-Atayde A. Histopathology of the Liver in Children With Chronic Hepatitis C Viral Infection. *Hepatology* 1998; 28: 1416-1423.
114. Yousuf M, Nakano Y, Tanaka, Sodeyama T, Kiyosawa K. Persistence of viremia in patients with type-C chronic hepatitis during long-term follow-up. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 812.-816.
115. Fujisawa T, Komatsu H, Inui A, MiyagawaY, Onoue M, Sekine I, Yokota S, Hanada R, Yamamoto K, Inui M. Spontaneous remission of crhonic hepatitis C in children. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 774-776.

116. Vogt M, Lang T, Frösner G, Klinger C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J. Prevalence and clinical outcome of Hepatitis C Infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999; 341:866-870.
117. Ebeling F, Naukkarinen R, Leikola J. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as a predictor of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 982-983.
118. Skidmore S. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C antibody. *Lancet* 1990; 336:63.
119. Li XM, Reddy KR, Jeffers LJ, et al. Indeterminate Hepatitis C. *Lancet* 1993; 341-345.
120. Chaudhary RK, MacLean C. Evaluation of first and second generation RIBA kits for detection of antibody to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2329.
121. Alter HJ, Tegtmeier GE, Jet BW, Quan S, Shih JW, Bayer WL, Polito A. The use of a recombinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis C virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors and random donors. *Transfusion* 1991; 31:772.
122. Farci P, Alter HJ, Wong D et al. A long term study of hepatitis C virus replication in non-A non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335:1-3.

123. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, et al. Detection of hepatitis viral sequences in non-A non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335:1-3.
124. Hagiwara H, Kayashi N, Mita E, et al. Quantitation of hepatitis C virus RNA in serum of asymptomatic blood donors and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology* 1993; 17:545-550.
125. Villa E, Ferretti I, De Palma M, et al. HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors involved in post transfusion hepatitis (PTH). *J Hepatol* 1991; 13: 256-259.
126. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y. Detection of hepatitis C RNA by a two stage PCR with two pairs of primers deduced from 5' non-coding region. *Jpn J Exp Med* 1990; 60: 215-222.
127. Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. *N Engl J Med* 1991; 325:98-104.
128. Nakagawa H, Shimonura H, Hasui T, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus genome in liver tissue and circulation by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 225-253.
129. Garson JA, Tedder RS. The detection of hepatitis C infection. *Rev Med Virol* 1993; 3: 75-83.
130. Gretch D, Corey L, Wilson J, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J Infect Dis* 1994;169:1219-25.

131. Kato N, Yokosuka O, Hosoda K, et al. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: increase of the virus in advanced liver disease. *Hepatology* 1993;18:16-20.
132. Gordon SC, Kodali VP, Silveiman AL, et al. Levels of hepatitis C virus RNA and liver histology in chronic type C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1458-61.
133. Lau JYN, Davis GL, Kniffen J, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 341: 1501-1504.
134. Magrin SA, Craxi A, Fabiano C, et al. Hepatitis C viremia in chronic liver disease: relationship to interferon alpha or corticosteroid treatment. *Hepatology* 1994; 19:273-279.
135. Chazouillers O, Kim M, Combs C, et al. Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in liver transplant recipients. *Gastroenterology* 1994; 106: 994-999.
136. Sherman KE, O'Brien J, Gutierrez AG, et al. Quantitative evaluation of hepatitis C virus RNA in patients with concurrent HIV virus infection. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2679-2682.
137. Shindo M, Arai K, Sokawa Y, et al. The virological and histological states of anti-hepatitis C virus-positive subjects with normal liver biochemical values. *Hepatology* 1995; 22: 418- 25.

138. Prieto M, Olaso V, Verdu C, et al. Does the healthy hepatitis C virus carrier state really exist? An analysis using polymerase chain reaction. *Hepatology* 1995; 22: 413- 7.
139. Zanella A, Conte D, Prati D, et al. Hepatitis C virus RNA and liver histology in blood donors reactive to a single antigen by second-generation recombinant immunoblot assay. *Hepatology* 1995;21:913-7.
140. McGuinness P, Bishop GA, Lien A, et al. Detection of serum hepatitis C virus RNA in HCV antibodyseropositive volunteer blood donors. *Hepatology* 1993; 18:485-90.
141. Bresters D, Zaauer HL, Cuypers HTM, et al. Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion* 1993;33:634-8.
142. Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy JR, Soussy CJ, Dhumeaux D. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories?. *Hepatology* 1998; 27: 1700-1702.
143. Jonas MM. Hepatitis C infection in children. *N Eng J Med* 1999; 341: 912- 913.
144. Fujisawa T, Inui A, Ohkawa T, et al. Response to interferon therapy in children with chronic hepatitis C. *J Pediatr* 1995; 127: 660-662.
145. Pawlotsky JM. Diagnostic tests for hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 71-79.

146. Ruiz-Moreno M, Leal-Orozco A, Millán A. Hepatitis virus infection in children. J Hepatol 1999; 31: (Suppl 1): 124-129 .
  
147. Bortolotti F, Resti M, Giacchino R et al. Changing epidemiologic pattern of chronic hepatitis C virus infection in Italian Children. J Pediatr 1998; 133: 378- 381.