
Caracterización molecular del virus de la Hepatitis C en pacientes remitidos al Laboratorio Regional de Salud Pública del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Venezuela.

María Zulay Sulbarán¹, Lérica Montaña², Yoneira Sulbarán³, Carmen Luisa Loureiro³,
Carmen Rosa Flores⁴, Yurviris Farías², Antonio Maldonado¹, Genny Guillen²,
Héctor Rangel³ y Flor Pujol³

¹Laboratorio de Virología, Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo Sucre, Cumaná Venezuela

²Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo Sucre, Cumaná, Venezuela

³Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela

⁴Laboratorio de Regional de Salud Pública, Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Venezuela.

Palabras clave: VHC; ELISA; 5'NC; NS5b; genotipos.

Resumen. La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 170 millones de personas están crónicamente infectadas por el virus de la hepatitis C (VHC). En este estudio se evaluó la presencia de anticuerpos contra el VHC en pacientes remitidos durante enero de 2010 a febrero de 2013, al Laboratorio Regional de Salud Pública del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” en Cumaná, Venezuela. La presencia de anticuerpos se hizo mediante dos ensayos de ELISA y se determinaron los genotipos circulantes a través de análisis filogenéticos de fragmentos de genoma viral amplificados por la región 5' no codificante (5'NC) y región no estructural 5b (NS5b) usando la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en dos rondas (RT-PCR). Se encontró una prevalencia de anticuerpos contra el VHC del 0,57 % (17/3005), siendo el grupo etario mayor de 41 años el más afectado (0,9 %). Un total de 16 muestras resultaron positivas para la presencia del ARN viral por RT-PCR en la región 5'NC (16/17, 94 %). El análisis filogenético de la región 5'NC permitió identificar la circulación del genotipo 2 y 1 y de un genotipo 3 y uno 4. Mediante análisis filogenéticos de la región NS5b, se observó la presencia de diversos subtipos dentro del genotipo 2 (2a, 2j y 2s), lo que concuerda con estudios anteriores que muestran que este genotipo es relativamente diverso en nuestro país.

Molecular characterization of hepatitis C virus in patients referred to a reference laboratory of public health, University Hospital “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Venezuela.

Invest Clin 2016; 57(1): 13-24

Keywords: VHC; ELISA; 5'NC; NS5b; genotypes.

Abstract. The World Health Organization estimates that approximately 170 million people are chronically infected with hepatitis C virus (HCV). This study evaluated the presence of antibodies against HCV by two immunoassays. HCV genotypes were analyzed by phylogenetic analysis of viral genome fragments amplified from the 5' non-coding (5'NC) region and non-structural region 5b (NS5b), using reverse transcription and nested polymerase chain reaction (RT-PCR), in patients referred from January 2010 to February 2013 to the Reference Laboratory of Public Health, University Hospital “Antonio Patricio de Alcalá”. The prevalence of anti-HCV antibodies was 0.57% (17/3005), being the group of patients older than 41 years the most affected (0.9%). A total of 16 samples were found positive for HCV RNA by RT-PCR in the 5'NC region (16/17, 94%). Phylogenetic analysis of the 5'NC region allowed to identify the circulation of genotypes 2 and 1, and one genotype 3 and one 4. By phylogenetic analysis of the NS5b region, diverse subtypes of HCV genotype 2 were identified (2a, 2j and 2s). This finding is in accordance with previous studies that indicate that this genotype is relatively diverse in our country.

Recibido: 19-11-2014. Aceptado: 29-10-2015

INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que el 3% de la población mundial (aproximadamente 170 millones de personas) está crónicamente infectado por el virus de la hepatitis C (VHC). Este virus se considera el agente causal del 80% de las hepatitis crónicas con posible evolución a cirrosis o carcinoma hepatocelular, consideradas como unas de las posibles causas de morbilidad y mortalidad en el futuro (1-3).

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus hepatotrópico del género *Hepacivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae* (4,5). Es un virus envuelto con genoma de ácido ribonucleico (ARN) de simple cadena de sentido positivo, de aproximadamente 9600 nucleótidos de longitud. Se han descrito 7 principales genotipos del VHC (numerados del 1 al 7) y un gran número de subtipos (designados a,b,c,d,e,...) (6,7). La secuencia de nucleótidos varía de 31 a 33% entre

genotipos y de 20 a 25% entre subtipos (6,8). Esta alta variabilidad genética se debe no solo al alto nivel de replicación viral (10^{12} partículas virales diarias) (9), sino también a la alta tasa de mutación ($1,1$ y $1,5 \times 10^3$ mutaciones por sitio y por año) (10,11) y a la falta de actividad correctora de la ARN polimerasa (12). Por consiguiente, en el individuo infectado, el virus circula como un complejo de cuasiespecies virales (13) cuya composición está sujeta a cambios continuos debido a selección competitiva (14) y las interacciones entre variantes con diferentes niveles de *fitness* (15).

Esta tasa de fijación de mutaciones no se distribuye uniformemente a lo largo del genoma debido a que presenta regiones altamente variables como los genes que codifican las proteínas de envoltura y regiones bien conservadas, tales como la región 5' no codificante (5'NC). La consecuencia práctica de la alta conservación de la 5'NC en la genotipificación es que esta región

varía muy poco para resolver la clasificación a nivel de los subtipos virales (16,17) mientras que la región NS5B, menos conservada, conocida como la “región de Okamoto “ (nt 8282 a 8.610 según el genoma de referencia H77) (16) proporciona una mejor concordancia con la filogenia del genoma de longitud completa, para la precisa identificación de genotipos y subtipos.

En Canadá, Australia y Europa se calcula que la prevalencia de la infección por el VHC está alrededor del 1%; en la mayoría de países de África y Asia Oriental se estima que está por encima del 2%; en Egipto entre 11% y 14%, pudiendo llegar hasta 60%; en Francia e Italia 1,7% (18) y en Argentina entre 1,5% y 2,5% (19). En Venezuela, se han reportado prevalencias de 1,1% y 2,1%, en poblaciones urbanas, rurales y amerindias (20), y de 0% a 71% en poblaciones de riesgo, como trabajadoras sexuales (0%), usuarios de drogas intravenosas (1%), crack oral (43,1%), receptores de transfusiones múltiples (24%) y pacientes hemodializados (39% a 71%) (21-23).

La caracterización genotípica del VHC tiene interés clínico y epidemiológico. Además, es crítica para el correcto manejo terapéutico del paciente infectado. En efecto, el genotipo viral es un factor pronóstico con significación estadística propia e independiente de otros factores (carga viral o daño hepático previo) de respuesta virológica sostenida al tratamiento antiviral (interferón estándar o pegilado en monoterapia o en combinación con ribavirina e inhibidores de proteasa) (24-26). Por ello se consideró oportuno determinar la frecuencia y distribución genotípica de la infección por el VHC en muestras de sueros colectados de pacientes remitidos a un laboratorio regional, con el propósito de aportar una valiosa información epidemiológica y molecular, además de tener importantes consecuencias para las políticas de salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el período enero 2010 a febrero 2013, un total de 3005 muestras de sueros fueron

colectadas de pacientes con diversas patologías, remitidos al Laboratorio de Regional de Salud Pública del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Venezuela. La edad y el sexo de los pacientes fueron obtenidos de las fichas epidemiológicas de cada uno de ellos.

La determinación de anticuerpos anti-VHC se realizó a través del ensayo inmunoenzimático ELISA de tercera generación, en la presentación comercial UMELISA VHC-SUMA. Es una técnica indirecta que utiliza como fase sólida placas de tiras de ultramicroELISA recubiertas con péptidos sintéticos, correspondientes a la región del *core*, región no estructural NS4 y NS5 y una proteína recombinante de la región NS3 del VHC, que capturan a los anticuerpos específicos presentes en las muestras de suero. A los complejos formados, se unen anticuerpos conjugados (anti-IgG humana/fosfatasa alcalina) y al añadir el sustrato fluorogénico (4-metilumbeliferil fosfato), éste se hidroliza y la intensidad de la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la presencia de anticuerpos anti-VHC en la muestra (27). La validación, interpretación e impresión de resultados fueron efectuadas automáticamente por el lector SUMA mediante el programa UMELISA VHC. Las muestras negativas por RT-PCR y con valores indeterminados (en la franja inferior del valor umbral) fueron evaluadas por un segundo estuche comercial con el fin de confirmar la positividad serológica (HCV Ab Sistedia).

Los sueros que resultaron positivos a IgG anti-VHC fueron sometidos a RT-PCR. Para la amplificación del RNA y genotipificación inicial se usó la región 5'NC y la región NS5b para la tipificación adicional. Se extrajo ARN de 140 µl de suero mediante el uso de la *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Se aplicaron estrictamente las medidas para prevenir contaminación (28). Se utilizaron iniciadores específicos que permitieron la amplificación de la región 5'NC del VHC (29). En esta RT-PCR anidada, se usó el iniciador 209N para la generación del ADNc y para la primera ronda de amplificación se utilizaron los iniciadores

externos 939P y 209N, que limitan la región del genoma entre los nucleótidos 45 y 349 de la cepa de referencia H77-AF009069 subtipo 1a, obteniéndose un producto de 304 pb; mientras que los iniciadores internos 940P (sentido) y 211N (antisentido), los cuales bordean la región entre los nucleótidos 63 y 313, generaron un producto de 250 pb. Para amplificar la región NS5b se utilizaron los iniciadores sugeridos por Sulbarán y col. (17). En la RT-PCR semianidada, se usó el iniciador 8645N para la generación del ADNc y para la primera ronda de amplificación se utilizaron los iniciadores externos 8245P y 8645N, que bordean la región comprendida entre los nucleótidos 8245 y 8645 de la cepa H77-AF009069 subtipo 1a, obteniéndose un producto de 400 pb; mientras que los iniciadores internos 8276P y 8645N, los cuales bordean la región entre los nucleótidos 8276 y 8645, generaron un producto de 369 pb (17).

Los sueros controles positivos que se utilizaron para amplificar las regiones 5'NC y NS5b fueron muestras previamente identificadas como francamente positivas para el ARN del VHC y como controles negativos se usaron mezclas de reactivos sin ADN. Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y fueron visualizados usando bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. Se realizó la purificación de los productos usando el kit *QIAquick PCR* según las recomendaciones del fabricante, para su posterior secuenciación en el Centro de Servicios Macrogen (Seúl, Corea).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas, correspondientes a la región 5'NC y NS5b del VHC, fueron comparadas utilizando el programa BLASTN v2.0.8 para establecer las relaciones filogenéticas con cepas de otros países y así identificar los genotipos correspondientes. Las

secuencias obtenidas fueron alineadas con un panel de secuencias de referencias depositadas en la base de datos del GenBank para la construcción de árboles filogenéticos. Se aplicó el método de "el vecino más cercano" (*Neighborjoining*), basado en matrices de distancias, estimadas por el método de Kimura dos parámetros, usando el programa DNAMAN versión 5.2.2. Los análisis fueron avalados con valores de confianza (*bootstrap*) basados en 1000 réplica.

Las muestras fueron consideradas positivas para la infección o exposición por el VHC si observaba la presencia de reactividad a los dos ensayos serológicos o al ARN viral. Para los análisis estadísticos se aplicó la prueba de Chi cuadrado o prueba Exacta de Fisher (cuando un valor de celda fue inferior a 5) a un nivel de confianza de 95% (30).

RESULTADOS

De las 3005 muestras, 76 muestras resultaron inicialmente reactivas: 17 positivas y 59 con valor indeterminado (en la franja del 10% por debajo del valor umbral de positividad). Estas 59 muestras resultaron negativas cuando fueron evaluadas por un segundo ensayo comercial y negativas para la presencia del ARN viral. De este análisis se concluye que la prevalencia de infección o exposición al VHC fue de 0,57 % (17/3005) (Tabla I). No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de anticuerpos anti-VHC en función del sexo. Se observó una tendencia a una mayor prevalencia de exposición al VHC en el grupo de pacientes con edades mayores a los 41 años (0,8 %) con respecto a los menores de 18 años (0,15 %), aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística.

TABLA I
 FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VHC EN PACIENTES DEL LABORATORIO REGIONAL DE SALUD PÚBLICA, HOSPITAL UNIVERSITARIO “ANTONIO PATRICIO DE ALCALÁ”, CUMANÁ, VENEZUELA (ENERO 2010-FEBRERO 2013)

	Anti-VHC positivo N/tot (%)
Edad (años)	
0-17	1/661 (0,15 %)
18-41	8/1.343 (0,6 %)
>41	8/1001 (0,8 %)
Sexo	
Femenino	8/1.447 (0,55%)
Masculino	9/1.558 (0,58%)
Total	17/3005 (0,57%)

N: número de pacientes positivos, tot: total

VHC: virus de la hepatitis C

El análisis y la distribución de los genotipos y subtipos del VHC se realizó por amplificación de las regiones 5'NC y NS5B del ARN del virus de la hepatitis C por RT-PCR. Se logró amplificar por la región 5'NC 16 muestras de las 17 con evidencia de exposición al VHC (94 %). Los análisis con el programa BLASTN v2.0.8 y los análisis filogenéticos por el programa DNAMAN de esta región, evidenciaron que el genotipo 2 fue el más frecuente (56%, 9/16) en los individuos

infectados, seguido por el genotipo 1 (31 %, 5/16), hallándose igualmente un genotipo 3 y uno 4 (Tabla II, Fig. 1). El análisis filogenético de 6 muestras para las cuales se logró la amplificación de la región NS5b permitió obtener con mayor definición los subtipos de las mismas (Fig.2), encontrándose una diversidad de subtipos dentro de los aislados genotipo 2 (2a, 2j y 2s) (Fig. 2, Tabla III).

TABLA II
 GENOTIPOS Y SUBTIPOS ASIGNADOS DE LOS AISLADOS DEL VHC, USANDO SECUENCIAS DE LA REGIÓN 5' NO CODIFICANTE (5'NC)

Genotipo VHC	N (%)	Subtipo VHC 5'NC
		N: subtipo (%)
1	5 (31%)	5: 1aeh (31%), 2: 2ajk (13%)
2	9 (56%)	6: 2b (38%) 1: 2 ¹ (6%)
3	1 (6%)	1: 3a (6%)
4	1 (6%)	1: 4adn (6%)
Total	16	16

N: numero de pacientes con genotipo, VHC: virus de la hepatitis C

¹para este aislado no fue posible la asignación de subtipo mediante el análisis de la región 5'NC.

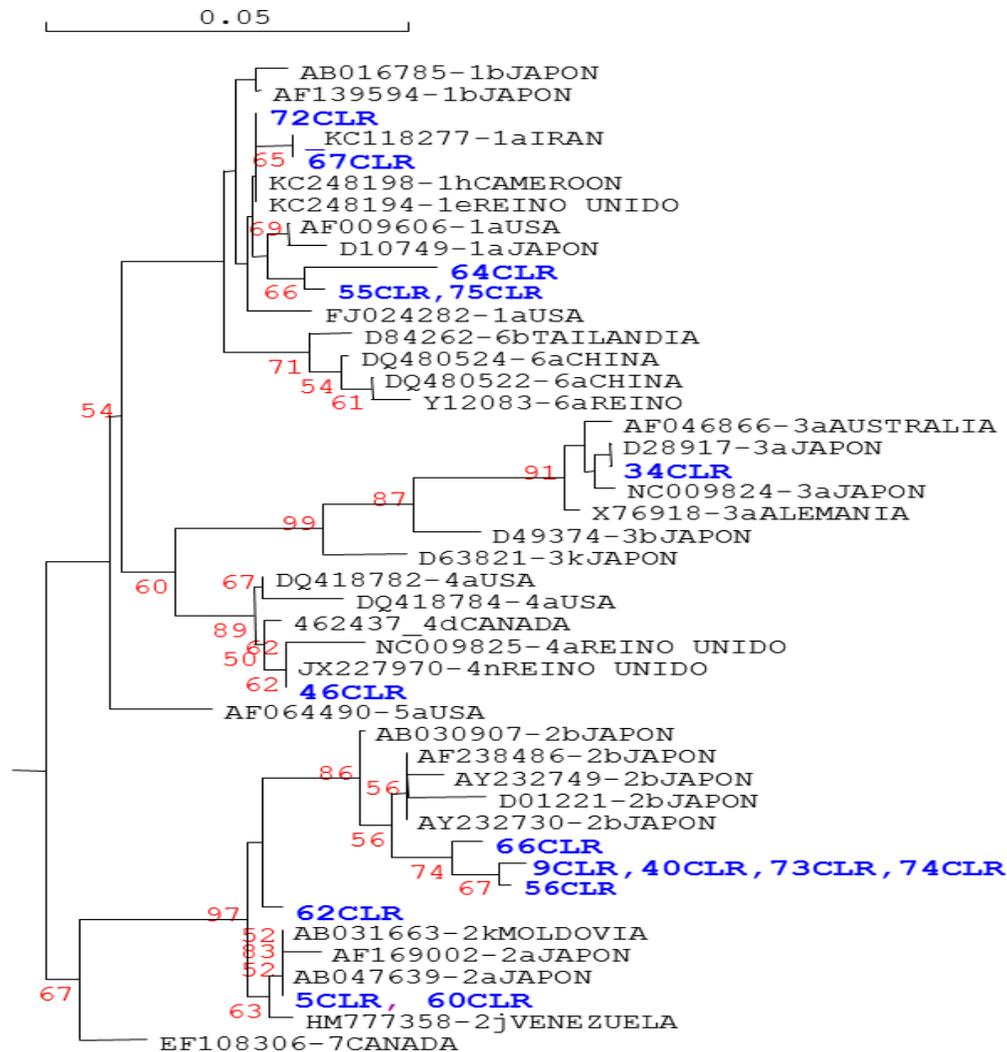


Fig. 1. Árbol filogenético de 50 aislados del VHC de los subtipos 1aeh,1b,2ajk,2b,3a,3b,3k,4adn,6a,6b,7 correspondiente a un fragmento de 192pb de la región no codificante 5' (nucleótidos 96 al 286 según la cepa H77- AF009069, subtipo 1a). Los aislados de referencia son designados por el número de acceso en el banco de genes (en azul). Estos aislados de referencia para asignar genotipo fueron las siguientes: genotipos 1a (AF009606, D10749, FJ024282, KC118277), genotipos 1b (AF139594, AB016785), genotipo 1e (KC248194), genotipo 1h (KC248198), genotipos 2a (AB047639, AF169002), genotipos 2b (AY232730, AY232749, AB030907, AF238486, D01221), genotipo 2k (AB031663), genotipo 2j (HM777358), genotipo 3a (AF046866, X76918, D28917, NC009824), genotipo 3b (D49374), genotipo 3k (D63821), genotipos 4a (DQ418782, DQ418784, NC009825), genotipo 4d (462437), genotipo 4n (JX227970), genotipo 5a (AF064490), genotipo 6a (DQ480524, DQ480522, Y12083), genotipo 6b (D84262) y genotipo 7 (EF108306). Al lado del nombre se indica el genotipo y lugar de aislamiento de la cepa. En azul se señalan los nombres de las secuencias correspondientes a este estudio. Para comprobar el nivel de confianza del agrupamiento se utilizó el programa BOOTSTRAP del paquete (ADNman versión 5.2.2) para generar 1000 árboles replicas a partir del alineamiento de las secuencias. La escala de la barra está en unidades de sustituciones de nucleótidos por sitio.

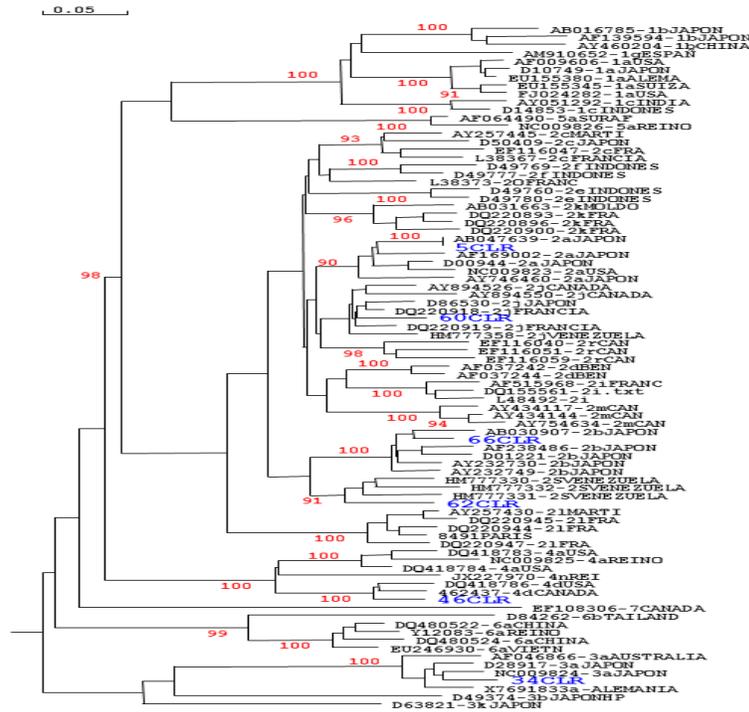


Fig. 2. Árbol filogenético de 85 aislados del VHC de los subtipos 1a,1b,1c,1g,2a,2b,2c,2d,2e,2f,2i,2j,2k,2l,2m,2o,2r,2s,3a,3b,3k,4a,4d,4n,5a,6a,6b,7 correspondiente al fragmento de 246 pb de parte de la región no estructural 5b (nucleótidos 8364 al 8610 según la cepa H77- AF009069, subtipo 1a). Los aislados de referencia son designados por el número de acceso en el banco de genes (en azul). Estos aislados de referencia para asignar genotipo fueron las siguientes: genotipo 1a (AF009606, D10749, EU155345, FJ024282, EU155380), genotipo 1b (AY460204, AF139594, AB016785), genotipos 1c (D14853, AY05C1292), genotipo 1g (AM910652), genotipo 2a (AB047639, AF169002, D00944, AY746460, NC009823), genotipos 2b (AY232730, AY232749, AB030907, AF238486, D01221), genotipo 2c (AY257445, D50409, EF116047, L38367), genotipo 2d (AF037242, AF037244), genotipo 2e (D49760, D49780), genotipo 2f (D49769, D49777), genotipo 2i (AF515968, DQ155561, L48492), genotipo 2j (AY894526, AY894550, D86530, DQ220919, HM777358), genotipo 2k (AB031663, DQ220893, DQ220896, DQ220900), genotipo 2l (AY257430, DQ220945, DQ220944, L48491, DQ220947), genotipo 2m (AY434117, AY434144, AY754634), genotipo 2o (L38373), genotipo 2r (EF116040, EF116051, EF116059), genotipo 2s (HM777330, HM777332, HM777331), genotipo 3a (AF046866, D28917, NC009824, X7691833), genotipo 3b (D49374), genotipo 3k (D63821), genotipos 4a (DQ418782, DQ418783, DQ418784, NC009825), genotipo 4n (JX227970), genotipo 4d (DQ418786, FJ462437), genotipo 5a (AF066490, NC009826), genotipo 6a (EU246930, DQ480524, DQ480522, Y12083), genotipo 6b (D84262) y genotipo 7 (EF108306). Al lado del nombre se indica el genotipo y lugar de aislamiento del aislado. En azul se señalan los nombres de las secuencias correspondientes a este estudio. Para comprobar el nivel de confianza del agrupamiento se utilizó el programa BOOTSTRAP del paquete (ADNman versión 5.2.2) para generar 1000 árboles replicas a partir del alineamiento de las secuencias. La escala de la barra está en unidades de sustituciones de nucleótidos por sitio.

TABLA III
CONCORDANCIA Y DISCRIMINACIÓN EN LA ASIGNACIÓN DE SUBTIPOS DE SEIS AISLADOS DEL VHC, AL ANALIZAR SECUENCIAS DE LA REGIÓN 5' NO CODIFICANTE (5'NC) Y REGIÓN NO ESTRUCTURAL 5B (NS5B).

Aislado del VHC	Subtipo VHC 5'NC	Subtipo VHC NS5b
5CLR	2ajk	2a
60CLR	2ajk	2j
62CLR	2	2s
66CLR	2b	2b
34CLR	3a	3a
46CLR	4adn	4d

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró una prevalencia de anticuerpos IgG anti-VHC de 0,57 % en 3005 pacientes remitidos al Laboratorio de Regional de Salud Pública del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, durante el período enero 2010 a febrero 2013, en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Es importante señalar que la población estudiada es un buen reflejo de la población general de Cumaná y sus zonas aledañas, dado que estos pacientes acudieron a consulta por diversas patologías no relacionadas con sintomatología hepática. Esta prevalencia es algo inferior a las publicadas en otros estudios realizados en Venezuela y en otros países de América Latina (Argentina, Brasil, México, Perú, Puerto Rico) donde se han reportado prevalencias promedios de 1 a 2,3 % (19).

La prevalencia de la infección por el VHC es variable según la zona geográfica y los diferentes grupos de riesgo. En Venezuela, no existen muchos estudios dirigidos específicamente a determinar la frecuencia de la infección en la población general. Sin embargo, se han reportado prevalencias de infección para el VHC de 1,1% a 2,1% (20). La mayoría de los estudios de seroprevalencia en Venezuela se han centrado principalmente en pequeñas comunidades o grupos de alto riesgo, con prevalencias de 1% a

71% (21,31-34). Se observó la tendencia esperada de aumento de prevalencia de exposición al VHC en función de la edad.

En los países en desarrollo, las pruebas complementarias como las basadas en neutralización o ensayos de inmunotransferencia recombinante (RIBA) a menudo se omiten debido a su costo. La confirmación del diagnóstico del VHC se realiza a través de la determinación del ARN viral o de la realización de un segundo test inmunoenzimático (35). La presencia de anticuerpos contra el VHC indica infección presente o pasada por el virus, mientras que la presencia de ARN del VHC en suero revela una infección activa. En el presente estudio se observó una relativa alta frecuencia de muestras inicialmente reactivas (indeterminadas) a los antígenos virales, que resultaron luego negativas a la presencia del ARN viral y a un segundo ensayo inmunoenzimático, sugiriendo fuertemente la presencia de resultados falsos positivos mediante la evaluación por un solo ensayo. Es conveniente mencionar que el ensayo inmunoenzimático Tecnosuma, en un estudio de comparación de estuches diagnósticos comerciales, arrojó el más alto número de falsos positivos en poblaciones amerindias, aunque es importante señalar que estudios en poblaciones amerindias no son forzosamente extrapolables a otros grupos poblacionales (36). Sin embargo, este estudio sugiere que es frecuente encontrar numerosos

resultados falsos positivos al usar este estuche comercial en población venezolana.

Los análisis filogenéticos mostraron que el genotipo 2 fue el más común (56 %), seguido por los genotipos 1, 3 y 4 (Tabla II). Estos resultados contrastan con investigaciones realizadas en varios países de América Latina, donde señalan al genotipo 1 como el más prevalente en Argentina (37,38), Brasil (39,40), México (41,42), Puerto Rico (43), Perú (44) y Venezuela (21,22,45). Aunque el genotipo 1 es el más frecuente en los aislados venezolanos, un trabajo reciente indica una tendencia al aumento del genotipo 2 en nuestra población en los próximos años (17). Sin embargo, la relativa alta frecuencia observada para el genotipo 2 puede deberse también al número reducido de muestras estudiadas.

La secuenciación directa es el estándar de oro para el análisis de la secuencia genómica del VHC. La región 5'NC es una zona del genoma altamente conservada que se utiliza para la genotipificación de los aislados del VHC. Sin embargo, el análisis de subtipos utilizando la región 5'NC no permitió agrupar a todos los aislados del virus dentro de subtipos particulares (Fig. 1). Debido a ello se requirió extender el análisis a la región codificante NS5B. La amplificación de esta región del genoma solo se obtuvo en 6/16 muestras positivas para la región 5'NC. En resumen, los análisis filogenéticos de la región NS5B permitió dilucidar el subtipo de muestras no subtipificadas por la región 5'NC (Figs. 1 y 2, Tabla IV). El hallazgo del subtipo 2s corrobora la circulación del mismo en Venezuela y la presencia de diversos subtipos (2a,2b,2j,2s) dentro del genotipo 2 demuestra la heterogeneidad de este genotipo en el país (17). Investigaciones en el Oeste de África (46,47), Canadá (48), Martinica (49) y Francia (50, 51), han demostrado la existencia de una mayor diversidad del genotipo 2 de la inicialmente reportada. Por otra parte, la mayor frecuencia del genotipo 2b en lugar del 2j -de amplia circulación en el centro del país (17)- merece investigar si el subtipo 2j está menos representado en zona Oriental. A pesar de la importancia de la información epidemiológica

aportada por la región NS5b, el inconveniente real de usar esta región fue el bajo número de muestras amplificadas (6/16), lo cual limita el conocimiento de la distribución de los subtipos (17). La presencia del genotipo 2 en varias muestras es un hallazgo relevante debido a que en los pacientes infectados por este genotipo la respuesta al tratamiento es más efectiva, reduciendo la duración del mismo y el costo del tratamiento (52,53). Aunque existen en la actualidad tratamientos muy eficaces contra esta enfermedad (54), el costo de los mismos limita todavía su uso masivo en Venezuela, por lo que el tratamiento con IFN-pegilado y ribavirina sigue siendo una alternativa en el país, en particular para los pacientes infectados con genotipo 2. Finalmente, este estudio proporciona información epidemiológica para mejorar las políticas de vigilancia y hacer frente a esta infección silenciosa.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Regional de Salud Pública, Cumaná, Venezuela y Laboratorio de Virología Molecular del IVIC, Caracas, Venezuela. Este proyecto recibió financiamiento del proyecto PEI No. 2012000805.

REFERENCIAS

1. **Chen S, Morgan T.** The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3: 47-52
2. **Blonski W, Reddy K.** Hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 661-674.
3. **Te H, Jensen D.** Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 2010; 14: 1-21
4. **Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
5. **Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P.** Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011; 19: 95-103.
6. **Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S.** Consensus proposals

- for a unified system of nomenclature of hepatitis C genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973.
7. **Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E.** A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology* 2007; 46: 623A.
 8. **Li G, Li K, Lea A, Li N, Abdulla N, Eltorky M, Ferguson M.** In situ hybridization for the detection of hepatitis C virus RNA in human liver tissue. *J Viral Hepat* 2013; 20: 183-192.
 9. **Neumann A, Lam N, Dahari H, Gretch D, Wiley T, Layden T, Perelson A.** Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282: 103-107.
 10. **Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Muchmore E, Peterson D, Ito Y, Mishiro S.** Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894-899.
 11. **Quer J, Esteban J, Cos J, Sauleda S, Ocaña L, Martell M, Otero T, Cubero M, alou E, Murillo P, Esteban R, Guàrdia J.** Effect of bottlenecking on evolution of the nonstructural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *J Virol* 2005; 79: 15131-15141.
 12. **Powdrill M, Tchesnokov E, Kozak R, Russell R, Martin R, Svarovskaia E, Mo H, Kouyos R, Gotte M.** Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 20509-20513.
 13. **Martell M, Esteban J, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J.** Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229. .
 14. **Domingo E, Holland J.** High error rates, population equilibrium, and evolution of RNA replication systems in RNA Genetics. Boca Raton (FL): CRC Press, 1988; 3-36.
 15. **Vignuzzi M, Stone J, Arnold J, Cameron C, Andino R.** Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 2006; 439: 344-348.
 16. **Hraber P, Fischer W, Bruno W, Leitner T, Kuiken C.** Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology J* 2006; 3: 103-111.
 17. **Sulbarán M, Di Lello F, Sulbarán Y, Cosson C, Loureiro C, Rangel H, Cantaloube J, Campos R, Moratorio G, Cristina J, Pujol F.** Genetic history of hepatitis C virus in Venezuela: high diversity and longtime of evolution of HCV genotype 2. *PLoS One* 2010; 5(12): 1-15.
 18. **Chun I, Bor C.** A new insight into hepatitis C vaccine development. *J Biomed Biotechnol* 2010; 3: 12-17.
 19. **Kershenovich D, Razavi H, Sánchez J, Bessone F, Coelho H, Dagher L, Gonçalves F, Quiroz J, Rodriguez F, Rosado B, Wallace C, Negro F, Silva M.** Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int* 2011; 31 (Suppl 2): 18-29.
 20. **Aguilar M, Cosson C, Loureiro C, Devesa M, Martínez J, Villegas L.** Prevalence of infection with hepatitis C virus in Venezuela, as assessed with an immuno-assay based on synthetic peptides. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95: 187-195.
 21. **Monsalve F, Gómez L, Albillos A, Álvarez M, Costa L, Araujo M.** Hepatitis C virus in populations at risk for infection. Venezuela. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 315-319.
 22. **Pujol F, Loureiro C.** Replacement of hepatitis C virus genotype 1b by genotype 2 over 10-year period in Venezuela. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 518-520.
 23. **Fischer B, Powis J, Firestone M, Rudzinski K, Rehm J.** Hepatitis C virus transmission among oral crack users: viral detection on crack paraphernalia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 29-32.
 24. **Zein, N.** Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 223-235
 25. **Hnatyszyn, H.** Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther* 2005; 10: 1-11.
 26. **Kwo P, Lawitz E, McCone J, Schiff E, Vierling J, Pound D, Davis M, Galati J, Gordon S, Ravendhran N, Rossaro L, Anderson F, Jacobson I, Rubin R, Koury K, Pedicone L, Brass C, Chaudhri E, Albrecht J.** Efficacy

- of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 2010; 376: 705-716.
27. **TECNOSUMA.** 2004. UMEELISA HCV. Inserto UMEELISA, La Habana, Cuba.
 28. **Kwok S, Higuchi R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.
 29. **Chan S, McOmish F, Holmes E, Dow B, Peutherer, J.** Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131-1141.
 30. **Sokal R, Rohlf J.** Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Editorial W. Freeman y Co. San Francisco. 1980.
 31. **Pujol F, Ponce J, Lema M, Devesa M, Sirit F, Salazar M, Vásquez G, Monsalve F, Blitz L.** High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in units with high prevalence. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1633-1636.
 32. **Agobian G, Agobian S, Lyon N, Leal J.** Seroprevalencia de anti-VHC, coexistencia de AgHBs, anti-HBc y factores de riesgo de infección en pacientes con insuficiencia renal crónica, unidad de diálisis "Barquisimeto". UCLA. Decanato de Medicina. Barquisimeto-Venezuela. *Bol Med Postg* 2003; 19(3): 134-137.
 33. **León R, Gamboa A, Quiróz E, Hinestroza H, Lecuna V, Garassini M, Lecuna P, Dagher L, Giménez W, González M, Capozzolo N, Aparcero M, Zuramay C, Paez R, Mendoza S, Beker B, Piñero R, Diestefano M, Píters C, Caamaño J, Poleo J, Bello A, Rodríguez L, Albornoz A, Escalante N, Fernández J, Pinto A, Garassini M, Lara J, Marcano T, Bronstein M, Santos Z, Martínez A.** Seroprevalencia de anticuerpos antiviral de hepatitis C en trabajadores y empleados de instituciones sanitarias en Venezuela. *Gen* 2003; 57: E12-17.
 34. **Mora O, Rodríguez L, Bongioanni H, Bolívar G, Wever W, Delgado F.** Incidencia del virus de la hepatitis c en una población de alto riesgo. *Gen* 2008; 62(4): 296-299.
 35. **Pawlotsky J, Lonjon M, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy C, Dhumeaux D.** What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998; 27:1700-1702.
 36. **Cardona N, González K, Garzaro D, Loureiro C, Duarte M, García D., Paccheco M, Pujol F.** Desempeño de estuches comerciales para el diagnóstico serológico de las hepatitis virales B y C en poblaciones yanomami y piaroa del estado Amazonas. *Rev Soc Venezolana Microbiol* 2010; 30:72-77.
 37. **Golemba M, Di Lello F, Bessone F, Fay F, Benetti S, Jones L, Campos R.** High prevalence of hepatitis C virus genotype 1b infection in a small town of Argentina. Phylogenetic and Bayesian coalescent analysis. *PLoS One* 2010; 5: e8751.
 38. **Ridruejo E, Adrover R, Cocozzella D, Fernandez N, Reggiardo M.** Efficacy, tolerability and safety in the treatment of chronic hepatitis C with combination of PEG-Interferon-Ribavirin in daily practice. *Ann Hepatol* 2010; 9: 46-51.
 39. **Silva C, Costi C, Krug L, Ramos A, Grandi T, Gandolfi V, Menezes M, Ocampos M, Niel C, Rossetti M.** High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 867-870.
 40. **Perone C, Del Castillo D, Pereira G, Carvalho N, Januário J, Teixeira R.** High prevalence of genotype 1 in individuals with hepatitis C in Belo Horizonte, MG. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41: 238-242.
 41. **Dehesa M, Bosques F, Kershenobich D.** Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Mexican patients. *Rev Gastroenterol Mex* 2007; 72: 344-348.
 42. **Jimenez R, Uribe F, Lopez P, Cisneros L, Castaneda G.** Distribution of HCV genotypes and HCV RNA viral load in different regions of Mexico. *Ann Hepatol* 2010; 9: 33-39.
 43. **Rodríguez F, Suarez E, Alvarez M, Toro D.** Prevalence of chronic hepatitis C virus genotypes among patients between 21 to 65 years old in Puerto Rico. *P R Health Sci J* 2004; 23: 49-56.
 44. **Sanchez J, Sjogren M, Callahan J, Watts D, Lucas C, Abdel M, Constantine N, Hyams K, Hinostroza S, Figueroa R, Cuthie J.** Hepatitis C in Peru: risk factors for infection, potential iatrogenic transmission, and genotype distribution. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 242-248.
 45. **Fortes M, Trómpiz A, Canónico Y, Vargas B,**

- Machado I.** La frecuencia del genotipo 1 del virus de hepatitis C no ha variado en Venezuela. *Rev Col Gastroenterol* 2009; 24(3): 256-258.
46. **Candotti D, Temple J, Sarkodie F, Allain J.** Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C virus infection in Ghana, West Africa. *J Virol* 2003; 77(14): 7914-7923.
47. **Jeannel D, Fretz C, Traore Y, Kohdjo N, Bigot A, Gamy E, Pe, Jourdan G, Kourouma K, Maertens G, Fumoux F, Fournel J, Stuyver L.** Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *J Med Virol* 1998; 55: 92-97.
48. **Murphy D, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah, S.** Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1102-1112.
49. **Martial J, Morice Y, Abel S, Cabie A, Rat C, Lombard F, Edouard A, Pierre S, Garsaud P, Bera O, Chout R, Gordien E, Deny P, Cesaire R.** Hepatitis C virus (VHC) genotypes in the Caribbean island of Martinique: Evidence for a large radiation of VHC-2 and for a recent introduction from Europe of VHC-4. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 784-791.
50. **Cantaloube J, Gallian P, Laperche S, Elghouzzi M, Piquet Y, Bouchardeau F, Jordier F, Biagini P, Attoui H, de Micco P.** Molecular characterization of genotype 2 and 4 of genotype 2 and 4 hepatitis C virus isolates in French blood donors. *J Med Virol* 2008; 80:1732-1739.
51. **Thomas F, Nicot F, Sandres K, Dubois M, Legrand F, Alric L, Peron J, Pasquier C, Izopet J.** Genetic diversity of HCV genotype 2 strains in south western France. *J Med Virol* 2007; 79: 26-34.
52. **Van Soest H, Boland G, Erpecum K.** Hepatitis C: changing genotype distribution with important implications for patient management. *Neth J Med* 2006; 64: 96-98.
53. **Wong J.** Hepatitis C: cost of illness and considerations for the economic evaluation of antiviral therapies. *Pharmacoeconomics* 2006; 24: 661-672.
54. **Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH.** From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol* 2015;62:S87-S99.