

Epidemiología molecular del virus de la hepatitis C.

Karina Salvatierra¹

Resumen

La infección crónica provocada por el virus de la hepatitis C (VHC) sigue siendo un gran problema de salud pública a nivel mundial, afecta a unos 200 millones de personas en el mundo. Se trata de la primera causa de trasplante y de muerte de origen hepático. La evolución natural de la enfermedad es el desarrollo de cirrosis y el riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma. Es una enfermedad silenciosa, cuyo diagnóstico mediante la clínica supone detectarla en fases avanzadas. El diagnóstico inicial se realiza mediante la detección de anticuerpos anti-VHC y se confirma demostrando la replicación viral. La indicación de tratamiento se establece tras la evaluación del grado de fibrosis y el genotipo de VHC que ha infectado al paciente.

Palabras Claves: hepatitis C, cirrosis, hepatocarcinoma.

Hepatitis C virus: A global public health problem

Abstract

Chronic infection caused by the hepatitis C virus (HCV) continues to be a public health problem worldwide, affecting about 200 million people worldwide. This is the first leading cause of death and transplantation of hepatic origin. The natural course of the disease is the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk development. It is a silent disease, whose diagnosis by clinical signs supposed to detect in advanced stages. The initial diagnosis is made by detecting antibodies anti-HCV and confirmed by demonstrating viral replication. The indication for treatment is established after assessing the degree of fibrosis and HCV genotype has infected the patient.

Key words: hepatitis C, cirrhosis, hepatocellular carcinoma.

Introducción

El virus de la hepatitis C (VHC) fue caracterizado molecularmente en 1989, reconociéndose como la causa mayor de hepatitis no-A, no-B (NANB) y una causa importante de las hepatitis crónicas a nivel mundial^{1,2}. Durante este mismo año se desarrolló el primer ensayo inmunoenzimático (ELISA) cuyo uso demostró que el VHC constituía la principal causa de hepatitis NANB post-transfusional en todo el mundo, el mayor responsable de la hepatitis NANB esporádica³.

Clasificación taxonómica

El VHC pertenece al género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. Comparte esta familia con miembros del género *Flavivirus* (Por Ej. Virus del dengue, virus de la fiebre amarilla y virus del Nilo occidental) y con miembros del género *Pestivirus* (Por Ej. Virus de la diarrea bovina, virus del cólera porcino)^{4,5}.

Características estructurales

Mediante microscopía crio-electrónica se ha demostrado que los viriones del VHC tienen una forma esférica con proyecciones en puntas y son heterogéneas de tamaño, desde 40 hasta 100nm de diámetro⁶. Mediante el análisis de partículas recombinantes del VHC con anticuerpos contra glicoproteínas, se ha identificado una envoltura externa, que consta de una bicapa lipídica donde se encuentra anclada la glicoproteína E1 del virus formando un heterodímero con la glicoproteína E2 envolviendo ambas la icosaédrica de 30-35 nm de diámetro formada por unidades repetitivas de la proteína *core*, cuya función es proteger al genoma ARN⁷.

Sorprendentemente, varios estudios ponen de manifiesto la naturaleza del VHC, como una lipo-viro partícula⁸, con una capa gruesa de apolipoproteínas derivadas del huésped que recubren la envoltura viral, y que presumiblemente ayudarían

1. Grupo de investigación Innovación en Tecnologías de Información (ITI) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (Colombia)
Correspondencia: Karina Salvatierra, grupo de investigación Innovación en Tecnologías de Información (ITI) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas (Colombia), Carrera 7 No. 40B - 53, Bogotá, Colombia., Teléfono (+57) (1) 3239300 Ext. 5044. kariales@gmail.com

Recibido: 28/08/2016; Aceptado: 18/11/2016

Cómo citar este artículo:

tanto a la liberación y entrada del virus como al escape de los anticuerpos neutralizantes en la circulación sanguínea⁶.

Organización genómica

El genoma del VHC consiste en una única molécula de ARN monocatenario lineal de cadena simple y polaridad positiva con un único marco de lectura abierto y de aproximadamente 9.6 kilobases de tamaño, flanqueado por una región no codificante en cada extremo: hacia el 5', la región 5' NC (5' no codificante o 5' UTR) (341 bases) y hacia el 3', la región 3' NC (3' no codificante o 3' UTR) (200 bases). El genoma se encuentra asociado al *core*; única proteína constituyente de la cápside viral, mediante la región 5' UTR formando la nucleocápside.

La región 5' NC es conservada, con analogías superiores al 98% entre aislados y se yuxtapone con el sitio interno de entrada al ribosoma, IRES (*internal ribosome entry site*), regulador de la traducción de la poliproteína viral. En el extremo 5' NC, alberga dos sitios conservados que interaccionan con el miR-122 necesario para una replicación eficiente del genoma del VHC⁹⁻¹¹ posiblemente protegiendo de exonucleasas¹² y de receptores de reconocimiento de la inmunidad innata, tales como RIG- I^{10,11,13}. La región 3' NC comprende la secuencia variable de 40 bases que precede a una región rica en poli-U de longitud variable, seguida por una secuencia muy conservada de 100 bases, que también regula la traducción de la poliproteína. El marco abierto de lectura (ORF), codifica una única poliproteína precursora de alrededor 3.011 aminoácidos, la cual es traducida por ribosomas unidos al retículo endoplasmático (RE) de forma IRES-dependiente y es cortada co- y post- traduccional por peptidasas celulares y proteasas virales en al menos 10 proteínas virales maduras¹⁴.

Se ha descrito un marco de lectura alternativo (ARFP) o *core+1* o proteína F (*frameshift*), cuya función no está clara (15). Se han detectado durante la infección por el VHC genotipo 1a anticuerpos antiproteína F, lo que indicaría que se expresa de manera natural, pero se cree que la proteína F no es necesaria para la infección y replicación¹⁶, aunque su papel en la propagación del virus y el desarrollo de enfermedad crónica no ha sido descartado¹⁷.

Las proteínas virales desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal son las proteínas estructurales (*core*, E1 y E2), P7 y las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Figura 1).

En la porción cercana al extremo 5' se codifican las proteínas estructurales, el *core*, con funciones en la formación de la cápside proteica, en la regulación, en la traducción y en la replicación del ARN y partículas de montaje; y las proteínas estructurales E1 y E2, glicoproteínas de la envoltura que participan en la adsorción y en la endocitosis mediada por receptores. La proteína integral de membrana P7 (viroporina), actúa como canal iónico dependiente de calcio en el retículo endoplasmático, y es necesaria para la morfogénesis y secreción de partículas virales infecciosas¹⁸⁻²¹.

En cuanto a las proteínas no estructurales, la proteína integral de membrana NS2, junto con NS3, constituyen la serin-proteasa NS2-3 que cataliza el corte entre NS2 y NS3 (con un papel importante en el ensamblaje del VHC). La proteína NS3 posee actividad de ATPasa y ARN helicasa utilizada durante la replicación y, junto a su cofactor NS4A, participa en el procesamiento de la poliproteína actuando como serin-proteasa para el corte de las proteínas no estructurales remanentes. NS4B es una proteína integral de membrana, que funciona como un andamio sobre el cual se ensamblan los componentes restantes del complejo asociado a la replicación. NS5B es la ARN polimerasa dependiente de ARN. NS5A, fosfoproteína multifuncional, es un cofactor de NS5B requerido para la replicación viral y podría estar involucrado en la resistencia al interferón²².

Una vez cortadas las proteínas no estructurales, éstas se ensamblan dentro del complejo de replicación. El VHC se replica a través de un intermediario de polaridad negativa. NS5B es capaz de sintetizar tanto ARN de cadena positiva como de cadena negativa. Las nuevas copias de ARN viral (+) interaccionan con la proteína *core* para formar la nucleocápside, que es finalmente rodeada por la envoltura viral que se forma por extrusión del RE. Los viriones maduros se liberan de la célula hospedadora a través de la vía secretoria celular²³.

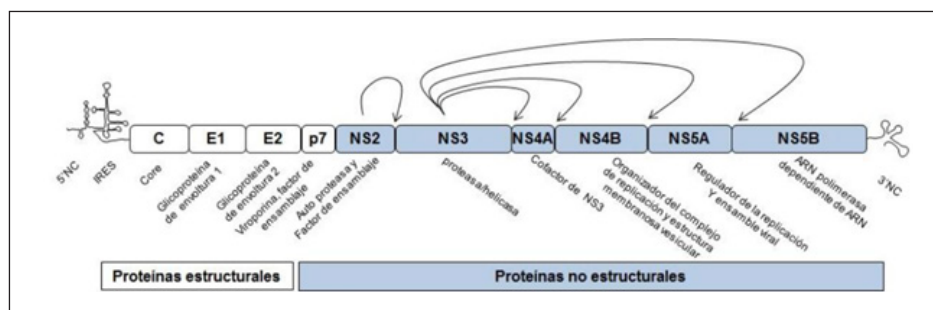


Figura 1. Organización genómica del virus de la hepatitis C. La cadena ARN positiva del genoma de 9,6-kb (parte superior), contiene un único marco de lectura abierto flanqueado por las estructuras secundarias de ARN en el extremo 5' y 3', regiones no codificante (NC). La traducción de la poliproteína precursora, mediada por el IRES, será procesa co- y post traduccional para obtener las proteínas estructurales y no estructurales (parte inferior). Se indica las funciones individuales de las proteínas del VHC.

Variabilidad genética, mutación y evolución

Como otros virus ARN el VHC presenta una alta variabilidad genética y evolución rápida. Este acontecimiento se debe a que la ARN polimerasa dependiente de ARN carece de actividad reparadora de errores (ausencia de actividad exonucleasa 5'-3') provocando una acumulación de sustituciones nucleotídicas durante la replicación genómica²⁴. Esta particularidad junto a un tamaño poblacional alto da lugar a dos niveles de variabilidad genética: intergenómica (genotipos, subtipos y aislados) e intragenómica (cuasiespecie).

La tasa de error durante la replicación es de aproximadamente 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido (tasa natural evolutiva de 10^{-4} sustituciones/sitio/año), encontrado típicamente con la ARN polimerasa viral²⁵, siendo la mayoría de las mutaciones generadas deletéreas^{26, 27}, combinado con la elevada tasa de producción de viriones (10^{10} - 10^{12} diarios) (Neumann *et al.* 1998), y su corta vida media (2-5 horas) contribuyen a la variabilidad²⁸. En un paciente infectado con VHC la población de secuencias genómicas virales que coexisten y circulan están estrechamente relacionadas entre sí (homología >98%) pero a su vez son heterogéneas genéticamente y a esa población de 29). La tasa de mutación no es homogénea a lo largo del genoma y hay regiones altamente variables (como E1 y E2) y otras regiones muy conservadas, como la región 5'NC o 3'NC³⁰.

Genotipos y subtipos

El análisis filogenético de secuencias del VHC se ha traducido en una nomenclatura que reconoce distintos tipos y subtipos de virus. Se han definido siete grupos genéticos que difieren entre sí en más de un 30% sobre el genoma del virus completo. Estos genotipos de virus incluyen varios subtipos más estrechamente relacionados que varían en más de un 20%, mientras que dentro de cada subtipo la variación es menos del 10%^{31,32}. El consenso del año 1994, proponía la clasificación del VHC en 6 genotipos diferentes (designados del 1 al 6) con una identidad de secuencias del orden de 69%; a su vez, cada genotipo incluía varios subtipos con una identidad cercana al 79%³³. En 2005, se propone la actualización de la clasificación en genotipos y subtipos del VHC según el análisis filogenético de las secuencias de las regiones *core*/E1 y NS5B, y las secuencias genómicas completas⁴. El estudio más reciente disponible³², representa una importante actualización de la clasificación del VHC, previo consenso, con la incorporación de información adicional de secuencia derivada de más de 1.300 secuencias completas del genoma del VHC disponibles en bases de datos públicas en mayo de 2013. El análisis realizado, ha resuelto varios conflictos de nomenclatura entre las designaciones de genotipo, y el uso de criterios de consenso ha establecido la clasificación del VHC en 7 genotipos confirmados y 67 subtipos (Figura 2).

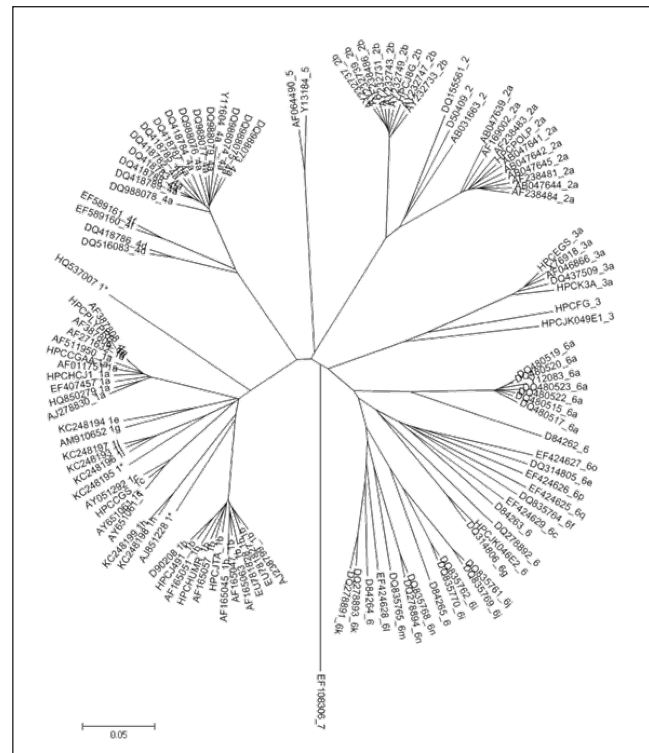


Figura 2. Árbol filogenético representativo de 118 secuencias de la región NS5B. Se construyó el árbol por neighbour-joining usando una aproximación a máxima verosimilitud, utilizando el Programa MEGA 5 (34). Las secuencias fueron elegidas (extraídas de bases de datos internacionales: GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y Los Alamos HCV database (<http://hcv.lanl.gov/components/sequence/HCV/search/searchi.html>), para ilustrar la máxima diversidad dentro de un subtipo. Los 7 genotipos etiquetados por el número de acceso y subtipo (* subtipo sin asignar). La barra de escala 0,05 representa una distancia evolutiva de 0,05 sustituciones/año.

Distribución geográfica de distintos genotipos y subtipos

Los 7 clados filogenéticos son epidemiológicamente distintos, con diferencias en el área geográfica original, en el grupo de riesgo y distribución geográfica actual, reflejando su reciente propagación epidémica a nuevos grupos de riesgo³¹. Se ha relacionado a los diferentes genotipos con su distribución geográfica actual (1a, 1b, 2a, 2b y 3a distribuidos en todo el mundo y 5a, 6a y 4 sólo en ciertas regiones específicas), con la vía de transmisión de la infección (por ej. 3a y 1a predomina en drogadictos endovenosos) y la respuesta al tratamiento antiviral. En Europa y Norteamérica predomina el subtipo 1a (70%), seguido del 2b y 3a (25%)^{4, 35-38}.

El subtipo 1b tiene una distribución mundial, siendo más prevalente en Europa, China y Japón, en especial en personas de edad avanzada que contrajeron la infección mediante transfusión sanguínea antes de 1992^{36,37}. El subtipo 2a es frecuente en

Japón y China^{35,37}, el 2c en el sur de Italia³⁹, el 4a principalmente en Egipto⁴⁰, en Sudáfrica el genotipo 5 y en el Sudeste Asiático el 6^{41,42}. Se sospecha aún más, aunque con datos muy limitados que los genotipos 5 y 7 se concentran en el centro y sur de África. La alta diversidad genética que existe entre los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b y 3a, sugiere que fueron introducidos en la población durante el siglo XX por conductas de riesgo parenterales⁴³.

El VHC circula *in vivo* como distribución dinámica de genomas divergentes pero estrechamente relacionados sometidos a un proceso continuo de variación genética, competencia, y selección. definida alrededor de una secuencia "master" o consenso, representativa de las variaciones mayoritarias. La aplicación de la teoría de las "cuasiespecies" al comportamiento de los virus ARN es un tema controvertido entre los biólogos evolutivos, que se basan en el principio de la genética de poblaciones⁴⁴. Aunque la población vírica que infecta a un paciente suele presentar niveles elevados de variación genética, independientemente de su hospedador³⁰. Esta heterogeneidad genómica tiene una relevancia biológica y clínica ya que confiere una ventaja notable a la población viral permitiendo una rápida adaptación a un entorno cambiante cuando el virus está sujeto a las restricciones selectivas ejercidas por el huésped, como la inmunidad, o por factores externos, como la terapia antiviral. La gran generación de variantes o representa un desafío para el control de la infección por el VHC y tiene implicaciones importantes en el desarrollo de una vacuna y en la resistencia a antivirales, efecto que se observa durante la monoterapia con la nueva generación de inhibidores específicos de las proteínas del VHC.

Para la identificación de las "cuasiespecies" o poblaciones virales circulantes en un individuo infectado con VHC, la técnica de referencia es la clonación de los productos de ADN obtenidos mediante transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), y posterior secuenciación de un determinado número de clones por paciente⁴⁵. Los resultados obtenidos por la técnica de clonación, nos darán una información sobre la heterogeneidad genética de las "cuasies-

pecies" circulantes en el paciente, descrita mediante el estudio a dos niveles: el número de variantes (número de haplotipos) presente en la población viral del paciente, y lo diferente que son entre ellos (diversidad genética). Existen diferentes opiniones en cuanto al número de clones a secuenciar. Para algunos la secuenciación de 10 variantes virales es suficiente para evaluar las virales presentes en un compartimiento⁴⁶, para otros, se necesitan 20 clones para tener una representación del 95% de las variantes mayoritarias no serán detectadas⁴⁷.

Con el desarrollo de las técnicas de pirosecuenciación ultra-profunda⁴⁸, también es posible secuenciar una mayor proporción de las variantes víricas existentes de forma rápida, a expensas de obtener unas lecturas de menos de 400 pares de bases (pb). La ultrasecuenciación está siendo utilizada para detectar las variantes minoritarias que pudieran estar implicadas con el desarrollo de resistencias a los antivirales específicas contra el VHC y VIH⁴⁹.

Algunas poblaciones minoritarias podrían ser potencialmente resistentes a drogas, y podrían estar siempre presentes cuando se inicia una terapia antiviral. Normalmente, en las "cuasiespecies" virales, se suele detectar una variante mayoritaria o "dominante" junto con las variantes que están presentes a frecuencias más bajas. La frecuencia de las distintas variantes depende de su eficacia biológica y factores del huésped⁵⁰. Por lo general, la selección de muchas mutaciones tienen un coste para la eficacia biológica (*fitness*), aunque las variantes minoritarias pueden ser rápidamente seleccionadas durante un cambio ambiental, como la terapia con antivirales, eso no significa que perduren en la población del virus. Los factores que influyen en desarrollo de resistencias (Figura 3) incluyen: a) el número de las mutaciones necesarias para introducir el cambio de aminoácido, b) *fitness* del virus variante, c) la frecuencia de la variante dentro de la "cuasiespecie", d) el nivel de resistencia que confiere, e) la potencia y biodisponibilidad del agente antiviral, y f) el nivel de presión selectiva del sistema inmune, que puede provocar mutaciones de escape inmunológico que, de forma indirecta, causen resistencias⁵¹.

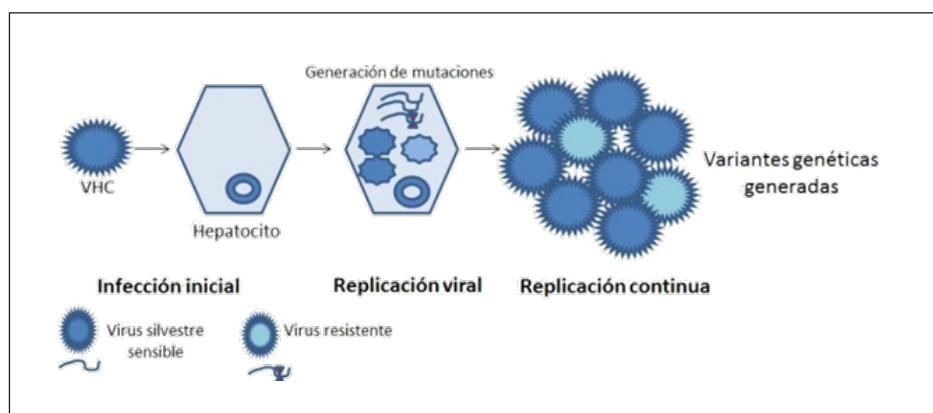


Figura 3. Generación de variantes virales de tipo salvaje y resistente, característica inherente de la infección por VHC. Después de la infección inicial de un hepatocito, el VHC comienza a replicar y con una frecuencia de alrededor 10^{-4} la polimerasa viral incorporará un nucleótido erróneo en el ARN, generando variantes virales. Cuando la mutación se produce en un sitio que se asocia con la resistencia a los antivirales, la variante generada puede ser resistente al antiviral.

El ciclo infectivo del VHC

El VHC infecta solamente a chimpancés y humanos, circula en suero de varias formas, viriones maduros libres, viriones unidos a inmunoglobulinas, nucleocápsides sin envoltura, y viriones físicamente asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de muy baja densidad (VLDL) representando la fracción infecciosa, denominada lipovirionpartícula (LVP)⁵². El VHC se replica principalmente en citoplasma del hepatocito siguiendo los pasos claves en su ciclo de infección: 1) Las lipovirionpartículas (LVP) del VHC entran en el hepatocito a través de endocitosis mediada por receptores. 2) La proteína de la cápside y el genoma viral son liberados en el citoplasma de la célula infectada. 3) La poliproteína es procesada co- y post-traduccionalmente mediante proteasas celulares y virales para obtener 10 proteínas virales maduras. 4) La cadena positiva de ARN se replica por la ARN polimerasa dependiente de ARN a través de un intermedio de cadena negativa, las nuevas moléculas de ARN son estabilizadas mediante la unión del miR-122. 5) La cadena positiva de ARN recién sintetizada se encapsida en la nucleocápside viral (core) en estrecha proximidad a las gotas lipídicas, y las glicoproteínas de la envoltura se adquiere a través de gemación en el lumen del retículo endoplasmático. Las lipovirionpartículas maduran en el retículo endoplasmático a través de interacciones con lipoproteínas, y salen de la célula a través de la ruta secretora por el aparato de Golgi y finalmente se liberan nuevos viriones⁵³.

Vías de transmisión, prevalencia, morbilidad y mortalidad

El único reservorio conocido es el ser humano. La transmisión del VHC es fundamentalmente parenteral y puede ser vertical, en los casos de co-infección con VIH el riesgo de transmisión puede alcanzar al 6% dado que las cargas virales son más elevadas, aunque la transmisión del VHC a través del contacto sexual o de madre a hijo es ineficiente y poco frecuente^{54,55}.

La adicción por vía intravenosa es la principal ruta actualmente de transmisión del VHC, con una prevalencia del 70-90% en este grupo de riesgo⁵⁶. La transfusión de sangre o de hemoderivados, constituye la segunda causa de transmisión, con una prevalencia del 10% en este grupo de pacientes. Actualmente el riesgo de transmisión por transfusión es de 1/2.000.000 unidades⁵⁷. La transmisión dentro de la unidad de hemodiálisis parece ser el mecanismo principal de la infección nosocomial por VHC⁵⁸.

Finalmente, el trasplante de órgano sólido a partir de donantes infectados es otra causa de infección por VHC, junto con las prácticas médicas no seguras⁵⁹ la exposición ocupacional a sangre infectada y, posiblemente, la realización de tatuajes, *piercing* y acupuntura⁶⁰. La transmisión por vía sexual en personas con múltiples parejas, es mayor que en parejas monógamas, siendo el riesgo elevado cuando se transmite junto con el VIH⁶¹. La seroprevalencia del VHC en HSH (hombres que tienen relaciones sexuales con hombres) oscila entre 4 y 8%, siendo mayor que la prevalencia del VHC en la población europea en general⁶².

Historia natural de la hepatitis C

El VHC inicia su ciclo de replicación en los hepatocitos, causando hepatitis aguda, suele pasar generalmente desapercibida en un 70-80% de las personas infectadas siendo asintomática y en un 10-20% cursa con síntomas inespecíficos (astenia, anorexia, dolor en el hipocondrio derecho) dentro de los primeros tres a seis meses de iniciada la infección. El período de incubación puede variar entre 14 a 180 días (promedio 6-7 semanas). Entre el 10-15% de los pacientes infectados resuelven favorablemente la infección, en los que el ARN-VHC en suero se vuelve indetectable y los niveles de Alanina transaminasa (ALT) retornan a la normalidad, pero la mayoría de los individuos VHC positivos (> 80%) desarrollan una infección persistente a pesar de la presencia de anticuerpos séricos contra el mismo y de una respuesta de las células T citotóxica antiviral multi-específica, debido tanto a la alta tasa de mutación, a su estructura genómica en cuasiespecie y a su elevada producción de viriones (10¹² viriones/día, con una vida media del virión de sólo 2,7 h). La mayoría de estos individuos evolucionan hacia la cronicidad, padecerán de fatiga y presentarán niveles séricos de ALT elevados o fluctuantes, mientras que un tercio presentará niveles persistentes normales, a pesar de la viremia y la lesión hepática continua. Una vez establecida la infección crónica, de ellos un 10% desarrolla insuficiencia hepática, 20% muestra signos de cirrosis en un período de 15 años desde su infección, el 13-15% desarrolla una descompensación hepática y entre el 2-7% sufre un hepatocarcinoma celular⁶³. La mortalidad global oscila del 4-9% y el estadio terminal de la infección crónica por VHC es una de las principales indicaciones de trasplante hepático⁶⁴. Desafortunadamente, la infección crónica recurrente se establece de manera prematura en el órgano trasplantado, y se acelera la progresión de la enfermedad⁶⁵.

Tras la exposición al virus, el ARN-VHC puede ser detectado en suero entre la y 2a semana. Los niveles séricos de ALT (indicador indirecto de inflamación hepática) aumentan hasta 10 veces superior a lo normal 2-8 semanas después de la exposición al virus, debido a la lisis de los hepatocitos infectados mayoritariamente por los linfocitos T CD8⁺ específicos, generalmente con un patrón fluctuante (Figura 4).

Entre los pacientes con infección crónica, el riesgo de cirrosis tras 20 años de infección varía entre 10-15% para los hombres y 1-5% para las mujeres, la razón de esta diferencia no se conoce, algunos estudios muestran estimaciones de hasta al 50%⁶⁶. Una vez que se establece la cirrosis, la tasa de desarrollo de carcinoma hepatocelular es de 1-4% por año⁶⁷.

Tras la infección aguda, las células T específicas del VHC son normalmente detectables 5-9 semanas después de la infección⁶⁸, y los anticuerpos específicos del VHC son detectados 8-20 semanas después de la infección⁶⁹. El título de anticuerpos se reduce en 10-20 años, aunque la respuesta específica de las células T CD4⁺ y CD8⁺ persiste incluso después de varias décadas⁷⁰.

La infección por el VHC induce grandes cambios en el metabolismo de los lípidos celulares, incluyendo una reducción de los niveles de lipoproteínas séricas y una acumulación de lípidos en las células parenquimatosas del hígado (esteatosis) (VHC genotipo 3a)^{71,72}.

Diagnóstico

La presencia de anticuerpos contra el VHC indica que una persona ha sido infectada. El diagnóstico de la infección crónica se realiza cuando los anticuerpos para el VHC están presentes en la sangre durante más de seis meses. La infección aguda a menudo no es sintomática, y los anticuerpos IgG anti-VHC suelen ser negativos durante la fase aguda y la infección sólo se puede determinar detectando en suero el ARN del VHC⁷³. Otras pruebas útiles para integrar la presunción diagnóstica, son las pruebas de funcionalidad hepática, los niveles elevados de las enzimas ALT y AST (aminotransferasa de aspartato), y la FA (fosfatasa alcalina) y la GGT (gamma glutamil transferasa), indicadoras de daño hepático y alteraciones del tracto biliar, así como otras anomalías⁷⁴.

Diagnóstico indirecto

El ELISA, método de diagnóstico indirecto serológico basado en el estudio de la respuesta inmune específica frente al VHC mediante la detección de anticuerpos circulantes, que se utiliza como cribado y diagnóstico de primera línea. Indica exposición al virus sin diferenciar infección aguda, crónica o resuelta.

Las pruebas confirmatorias de los resultados positivos del ELISA basadas en la técnica de "Western blot", también conocido Recombinant immunoblot assay (RIBA-3) de tercera generación, como han quedado obsoletas debido a la mejora de la sensibilidad de los sistemas de ELISA de tercera generación y a la aparición de técnicas de detección del ARN-VHC circulante que tienen una elevada sensibilidad y especificidad^{75,76}.

Diagnóstico directo

Se basa en la detección de componentes virales, como diferentes fragmentos del genoma del VHC (ARN-VHC) o de-

terminadas proteínas virales, esto implica la existencia de replicación vírica activa. Las técnicas de diagnóstico molecular permiten una detección tanto cualitativa como cuantitativa del ARN-VHC circulante en suero, plasma o tejido.

Diagnóstico cualitativo (ARN-VHC)

El ARN-VHC es detectable entre la primera y segunda semana después de la infección, y se utiliza para predecir precozmente la respuesta virológica sostenida (RVS), también para el diagnóstico durante el periodo de ventana serológico, para detectar la infección en pacientes inmunocomprometidos que no hayan desarrollado la repuesta inmune, y para el diagnóstico precoz en la infección perinatal.

Diagnóstico cuantitativo (viremia)

Las técnicas cuantitativas permiten cuantificar la carga vírica basal y evaluar la presencia de respuesta virológica temprana (RVT) a las 12 semanas del tratamiento. La RT-PCR en tiempo real es la técnica de elección para detectar y cuantificar el ARN-VHC en la práctica clínica⁷⁵⁻⁷⁷.

La detección cuantitativa del antígeno *core* del VHC con la técnica ELISA, se utiliza para el diagnóstico precoz de la infección aguda, pero la desventaja de este método es que tiene una sensibilidad menor al 95% (niveles de ARN-VHC inferiores a 20.000UI/ml no detecta), y una especificidad cercana al 100% que las técnicas de diagnóstico molecular, pero su coste-eficacia, facilidad de utilización y ausencia de contaminantes hacen que sea una alternativa para la detección de viremia en zonas geográficas donde no disponen de la tecnología molecular⁷⁸.

Genotipado del VHC

El genotipo de VHC que ha infectado al paciente, es un factor importante para tener en cuenta sobre el pronóstico y duración del tratamiento (generalmente puede ser más corto para los pacientes infectados con los genotipos 2 o 3 en comparación con los pacientes infectados con los genotipos 1 o 4⁷⁹, el fármaco, la dosis y la probabilidad de responder al tratamiento antiviral⁸⁰. En cuanto al significado clínico a nivel de subtipo está teniendo importancia con la terapia que actualmente se trata de establecer, en aquellos pacientes que no responden al tratamiento estándar, el interferón- (peg-IFN-); y en aquellos pacientes naïve genotipo 1, con los nuevos antivirales de acción directa (AAD)⁸⁰. Finalmente el genotipo del VHC es relevante para el tratamiento con peg-IFN- con AAD⁵³.

La determinación del genotipo del VHC, basada en la secuenciación de la región no codificante 5' NC o de la región NS5B, mediante técnicas *in house* seguido de un análisis filogenético de las secuencias obtenidas junto a las secuencias prototípicas, es considerada la técnica de referencia, pero su complejidad técnica hace que solo en centros con personal cualificado puedan utilizarla⁸¹.

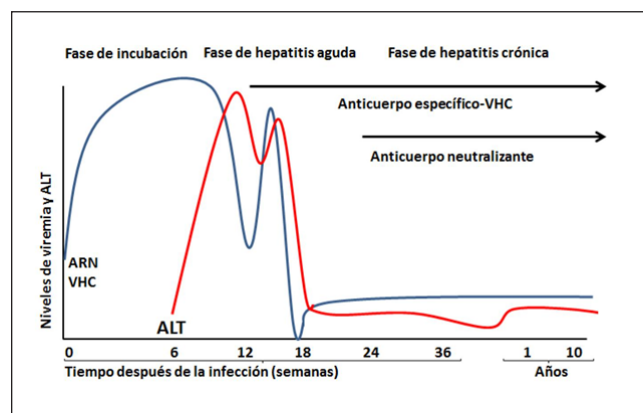


Figura 4. Marcadores serológicos en infección con VHC.

Aunque la región 5' NC es altamente conservada entre los genotipos, pero con diferencias en la secuencia de nucleótidos específicas para cada genotipo y los principales subtipos, la discriminación de ciertos genotipos (aislados del genotipo 6 han sido identificados como genotipo 1) y entre subtipos (1a *versus* 1b y 2a *versus* 2c) no siempre es fiable al utilizar esta región. Esto se debe a la elevada homología que presentan entre sus secuencias; los subtipos 1a y 1b difieren en un nt (A/G) en la posición 99 y los subtipos 2a y 2b en dos nt en la posición 124 y 164 respectivamente. Sin embargo, la secuencia de la región *core* o NS5B es más fiable ya que tienen una variabilidad genética suficiente para poder diferenciar entre subtipos^{77,82}.

Epidemiología de la infección por VHC

Se estima que 200 millones de pacientes en todo el mundo están infectados con el VHC y que aproximadamente 130-150 millones (3% de la población mundial) vive con hepatitis C crónica. Alrededor de 3-4 millones de personas son infectadas por año, y más de 350.000 personas mueren cada año a partir de enfermedades relacionadas con la hepatitis C (81). La seroprevalencia de la infección del VHC varía geográficamente (Figura 5). El VHC tiene una incidencia de 8,7 por 100.000 en los Estados miembros de la Unión Europea (UE) con alta prevalencia en usuarios de drogas inyectables⁸³. Se estima que hay 2-5 millones de personas infectadas con VHC en Europa. La incidencia ha tendido a aumentar durante los últimos años, además la inmigración procedente de África Subsahariana, Asia y Pakistán, donde la prevalencia es muy elevada (9-11%) ha contribuido al incremento de la prevalencia en Europa^{36,84}. La alta prevalencia se debe también a la propagación iatrogénica en la población de edad avanzada que tuvo lugar hace más de medio siglo, seguido 3 décadas más tarde por otro aumento de la prevalencia en individuos jóvenes por la adicción a drogas por vía parenteral.

Las tasas han disminuido en el mundo occidental desde la década de 1990 debido a la detección del VHC en sangre antes de la transfusión⁸⁵. En los EE.UU. se estima un aumento significativo del 24% en la prevalencia de cirrosis y carcinoma hepatocelular de los casos reportados en ese país (86). El VHC causa el 27% de las cirrosis y el 25% de los casos de carcinoma hepatocelular en el mundo, y principal causa de trasplante hepático de EE.UU. y Europa occidental⁸⁷. En Europa la alta prevalencia de la infección de VHC se registra con un 53 % en el grupo de 25 y 44 años de edad, y el 64,4% son hombres⁸⁸.

Conclusiones y Perspectivas

La infección crónica provocada por el VHC sigue siendo un gran problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que 200 millones de personas (3% de la población mundial) se encuentran infectadas por este virus. La hepatitis crónica C supone la primera causa de muerte de origen hepático y la primera indicación para el trasplante hepático en los países desarrollados.

El VHC tiene una alta variabilidad genética, asociada a diferencias en la progresión de la enfermedad, y en la eficacia del tratamiento antiviral. Hoy en día esta enfermedad cuenta con más afectados que el VIH, sin embargo como la inmensa mayoría de los casos no están diagnosticados, se considera que la cifra es mucho mayor y de ahí que se le llame. Es por ello que el sistema de salud pública precisa de medidas enfocadas a un diagnóstico precoz y prevención de la transmisión.

El tratamiento basado en la combinación de dos fármacos no específicos peg-IFN-, provoca numerosos efectos secundarios, el tratamiento es de larga duración y además es costoso y tiene poco éxito en pacientes infectados con genotipo 1. Por otra parte, la reinfección del injerto post-trasplante es universal, ocasionando una hepatitis más agresiva y más difícil de tratar con peg-IFN-. Esto ha impulsado al desarrollo

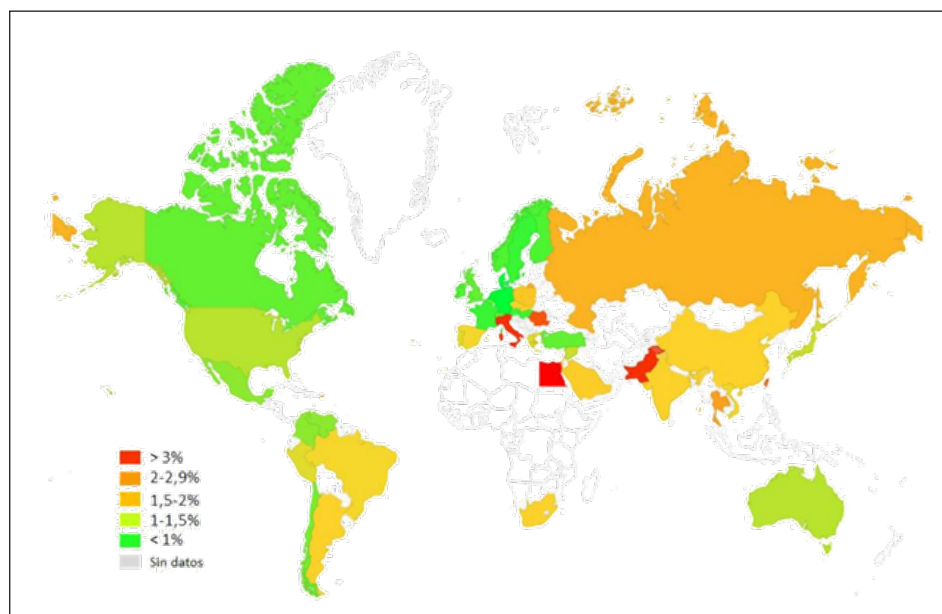


Figura 5. Distribución geográfica de la prevalencia del VHC a nivel mundial.

de nuevos fármacos más específicos, los AAD que están dirigidos contra proteínas del virus, como la proteasa NS3, la proteína NS5A o la polimerasa NS5B, y han mostrado una gran efectividad con mínimos efectos secundarios. A pesar de su alto precio, en pacientes con enfermedad avanzada o trasplantados el acceso a los nuevos tratamientos con AAD es fundamental para mejorar su pronóstico y detener la progresión de la enfermedad.

Agradecimientos

Al director del grupo de investigación ITI (Innovación en Tecnologías de Información) Prof. Hector Florez, que pertenece a la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por su colaboración y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Referencias

- Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244:359-62.
- Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, Houghton M. Identification of the major, putative non-A, non-B hepatitis agent (hepatitis C virus) using a recombinant cDNA approach. *Semin Liver Dis*. 1992;12(3):279-88.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker 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: 362-64.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-73.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5:453-63.
- Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(23):9505-10.
- Yu X, Qiao M, Atanasov I, Hu Z, Kato T, Liang TJ, Zhou ZH. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*. 2007;367(1):126-34.
- Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*. 2011;19(2):95-103.
- Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3193-8.
- Shimakami T, Yamane D, Jangra RK, Kempf BJ, Spaniel C, Barton DJ, *et al.* Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109:941-6.
- Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol*. 2012; 86:7372-83.
- Li Y, Masaki T, Lemon SM. miR-122 and the Hepatitis C RNA genome: more than just stability. *RNA Biol*. 2013;10(6):919-23.
- Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, Tang GQ, Gale M, Patel SS, *et al.* Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature*. 2011;479:423-7.
- Waris G, Tardif K, Siddiqui A. Endoplasmic Reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces and ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem. Pharmacol*. 2002;64:1425-1430.
- Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis*. 2005;25(1):105-17.
- McMullan LK, Grakoui A, Evans MJ, Mihalik K, Puig M, Branch AD, Feinstone SM, Rice CM. Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(8):2879-84.
- Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Berland JL, Khouri V, Perret M, Van Roosmalen M, Pol S, Negro F, Paranhos-Baccalà G. Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2004;40(4):900-9.
- Lavie M, Goffard A, Dubuisson J. Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2007;9:71-86.
- Carrère-Kremer S, Montpellier C, Lorenzo L, Brulin B, Cocquerel L, Belouzard S, Penin F, Dubuisson J. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J Biol Chem*. 2004;279:41384-92.
- Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*. 2007;3(7):e103.
- Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, Weinman SA. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog*. 2010;6(9):e1001087.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*. 1996;334(2):77-81.
- Block T, Mehta A, Fimmel C, Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2003; 22:5093-5107.
- Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(8):3392-6.
- Belshaw R, Gardner A, Rambaut A, Pybus OG. Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends Ecol Evol*. 2008;23(4):188-93.
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 7):1631-48.
- Duffy S, Shackleton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. 2008;9(4):267-76.
- Lam NP, Neumann AU, Gretsch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology*. 1997;26(1):226-31.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca 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(5):3225-9.
- González-Candelas F, López-Labrador FX. Clinical Relevance of Genetic Heterogeneity in HCV. *Future Virology*. 2010;5(1):33-49.
- Simmonds P. The origin of hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:1-1.
- Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, *et al.* A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994;19(5):1321-4.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). 2011.
- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):223-35.
- Esteban JI, Saulea S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48(1):148-62.
- Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. 2006;3(2):41-6.
- Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, Dalgard O, Dillon JF, *et al.* A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int*. 2011;31(2):30-60.
- Ansaldi F, Bruzzzone B, Salmaso S, Rota MC, Durando P, Gasparini R, Icardi G. Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med Virol*. 2005;76(3):327-32.
- Pybus OG, Drummond AJ, Nakano T, Robertson BH, Rambaut A. The epidemiology and iatrogenic transmission of hepatitis C virus in Egypt: a Bayesian coalescent approach. *Mol Biol Evol*. 2003;20(3):381-7.
- Smuts HE, Kannemeyer J. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(6): 1679-81.
- Fung J, Lai CL, Hung I, Young J, Cheng C, Wong D, Yuen MF. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin. *J Infect Dis*. 2008;198(6):808-12.
- Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Ho SY, Shapiro B, Pybus OG, Allain JP, Hatzakis A. The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylogenetic and phylogeographic analysis. *PLoS Med*. 2009;6(12):e1000198.

44. Holmes EC. Does hepatitis C virus really form quasispecies?. *Infect Genet Evol.* 2010;10(4):431-2.
45. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):103-26.
46. Torres-Puente M, Bracho MA, Jiménez N, García-Robles I, Moya A, González-Candelas F. Sampling and repeatability in the evaluation of hepatitis C virus genetic variability. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 9):2343-50.
47. Gretch DR, Polyak SJ, Wilson JJ, Carithers RL Jr, Perkins JD, Corey L. Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol.* 1996;70(11):7622-31.
48. Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.
49. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky JM. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1303-1313.e1.
50. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2010;138(2):447-62.
51. Thompson AJ, McHutchison JG. Antiviral resistance and specifically targeted therapy for HCV (STAT-C). *J Viral Hepat.* 2009;16(6):377-87.
52. Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem.* 2011;286(4):3018-32.
53. Scheel Troel KH, Rice Charles M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013;19(7):837-49.
54. Pradat P, Trépo C. HCV: epidemiology, modes of transmission and prevention of spread. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2000;14(2):201-10.
55. European center for disease prevention and control (ECDC). http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/hepatitis_C/Pages/index.aspx
56. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):705-14.
57. Center for Disease Control and prevention (CDC). Hepatitis C information for health professionals. <http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/HCVfaq.htm>
58. Salvatierra K, Florez H. Analysis of hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Infectio.* 2015;20:130-37. doi:10.1016/j.infect.2015.10.002
59. Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, Fàbregas S, Vega R, Salmerón J, Diago M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M; Spanish Acute HCV Study Group. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol.* 2008;48(1):20-7.
60. Hwang LY, Kramer JR, Troisi C, Bull L, Grimes CZ, Lyster R, Alter MJ. Relationship of cosmetic procedures and drug use to hepatitis C and hepatitis B virus infections in a low-risk population. *Hepatology.* 2006;44(2):341-51.
61. Yen T, Keefe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol.* 2003;36(1):47-53.
62. Boesecke C, Vogel M. HIV and hepatitis C co-infection: acute HCV therapy. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(6):459-64.
63. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26(4):401-12.
64. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004;12(2):96-102.
65. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology.* 2008;47(1):321-31.
66. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, Ronchi G, Romeo R, Manini M, Del Ninno E, Morabito A, Colombo M. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology.* 2006;43(6):1303-10.
67. Yu ML, Chuang WL. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(3):336-45.
68. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15661-8.
69. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(27):10149-54.
70. Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):215-29.
71. André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis.* 2005;25(1):93-104.
72. Petit JM, Benichou M, Duvalier L, Jooste V, Bour JB, Minello A, Verges B, Brun JM, Gamber P, Hillon P. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(5):1150-4.
73. Pawlotsky JM, Martinot-Peignoux M, Poveda JD, Bastie A, Le Breton V, Darthuy F, Rémiré J, Erlinger S, Dhumeaux D, Marcellin P. Quantification of hepatitis C virus RNA in serum by branched DNA-based signal amplification assays. *J Virol Methods.* 1999;79(2):227-35.
74. Esteban JI. Treatment of acute hepatitis C. In Arroyo V, ed. *Treatment of Liver Disease.* Barcelona: Masson. 1999; 279-86.
75. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. *Ann Hepatol.* 2009;8(1):7-12.
76. Lange C, Sarrazin C. Diagnostic tests in acute and chronic hepatitis C. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. *Hepatology A Clinical Textbook.* 2nd ed. Düsseldorf: Flying Publisher; 2010; p. 159-70.
77. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virology of hepatitis C virus infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26(4):381-9.
78. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1161-8.
79. Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* 2006;55(9):1350-9.
80. European Association for the Study of the Liver (EASL) Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;60(2):392-420. http://www.easl.eu/_newsroom/latest-news/easl-recommendations-on-treatment-of-hepatitis-c-2014
81. Organización Mundial de la Salud (OMS). Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines>
82. Chevaliez S, Pawlotsky JM. How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:9-14.
83. Guidance on prevention of viral hepatitis B and C among people who inject drugs. Geneva: OMS. 2012. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/hepatitis/en/index.html>
84. Rantala M, van de Laar MJ. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - Euro Surveill. 2008;13(21). pii: 18880.
85. Ozaras R, Tahan V. Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(3):351-61.
86. Kanwal F, Hoang T, Kramer JR, Asch SM, Goetz MB, Zeringue A, Richardson P, El-Serag HB. Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2011;140(4):1182-1188.e1.
87. Perz JF, Alter MJ. The coming wave of HCV-related liver disease: dilemmas and challenges. *J Hepatol.* 2006;44(3):441-3.
88. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis.* 2010;14(1):1-21, vii.