

Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C

en población mexicana seleccionada

Palabras clave: Virus de la hepatitis C, genotipo, carga viral, frecuencia, distribución.

Key words: Hepatitis C virus, genotype, viral load, frequency, distribution.

Recibido: 11/04/2008
Aceptado: 17/04/2008

María Guadalupe Márquez-Rosales,* Fernando A Santoscoy-Tovar,**
Héctor Montoya-Fuentes*

* Departamento de Biología Molecular (DBM). Unidad de Patología Clínica (UPC). Guadalajara, Jalisco.

** Departamento de Microbiología. UPC.

Correspondencia:

D. en C. Héctor Montoya Fuentes
Departamento de Biología Molecular. Unidad de Patología Clínica.
Guadalajara, Jalisco. Av. México núm. 2341,
Col. Ladrón de Guevara, 44650 Guadalajara, Jalisco.
Tel: (33) 3669-0310 ext. 281 E-mail: schlagzeugger@hotmail.com

Resumen

Antecedentes: El virus de la hepatitis C (VHC) es la principal causa de la hepatitis postransfusión. Por ser un problema de salud pública, es trascendental estimar la frecuencia y distribución de los genotipos del VHC en nuestro país, para así obtener un mejor perfil epidemiológico para cada genotipo en población mexicana. **Métodos:** Se analizaron 403 muestras de pacientes con VHC de Unidad de Patología Clínica. La obtención del genotipo fue mediante LiPA, la carga viral con COBAS AMPLICOR y el análisis estadístico con EBM calculador. **Resultados:** Sesenta por ciento de los pacientes fueron mujeres y 39.7% hombres. La frecuencia de los genotipos fue: 58.3% tipo 1, 30.5% tipo 2, 8.7% tipo 3, 1% tipo 4, 1.5% tipos mixtos. La frecuencia de subtipos fue: 1b 26.8%, 1a 21.3%, 2a/2c 12.4%, 2b 9.2%, 3a 8.4%. La distribución de los genotipos por zonas en el país fue: Norte (n = 43): 1b 46%, 1a 18.6%, 2a/2c 9.3%, 2b 7%; Occidente y Bajío (n = 345): 1b 24.1%, 1a 20.9%, 2a/2c 13.3%, 2a 9.6%, 3a 9.6%; Centro y Sur (n = 15): 1a 40%, 1b 33%, 1a/1b 20%, 2b 7%. En 289 pacientes la carga viral (CV) fue: 69% dentro del rango lineal, con promedio de 314,795 UI/mL y 31% con CV > 700,000 UI/mL. **Conclusiones:** El genotipo 1b fue el más frecuente. Este estudio mostró frecuencia de genotipos del VHC diferentes dentro del país. El genotipo 2a/2c fue más frecuente en nuestro estudio en contraste con lo registrado en otras poblaciones.

Abstract

Introduction: Hepatitis C virus is the main cause of post-transfusional hepatitis. Because it is considered as a public health problem, its transcendental to estimate the frequency and distribution of hepatitis C genotype in our country, in order to obtain a better epidemiological profile for each genotype in Mexican population. **Methods:** 403 samples were analyzed from hepatitis C patients of Unidad de Patología Clínica. The genotype was obtained by means of LiPA, viral load was estimated with COBAS AMPLICOR test and the statistical analysis with EBM calculator program. **Results:** 60% of patients were women and 39.7% men. The genotype frequencies were: 58.3% type 1, 30.5% type 2, 8.7% type 3, 1% type 4, 1.5% mix types. The frequencies of subtypes were: 1b 26.8%, 1a 21.3%, 2a/2c 12.4%, 2b 9.2%, 3a 8.4%. The distribution of genotype by region of the country was: North n = 43 1b 46%, 1a 18.6%, 2a/2c 9.3%, 2b 7%; West and Central n = 345 1b 24.1%, 1a 20.9%, 2a/2c 13.3%, 2a 9.6%, 3a 9.6%; South n = 15 1a 40%, 1b 33%, 1a/1b 20%, 2b 7%. In 289 patients the viral load was: 69% within linear range (average 314,375 UI/mL) and the 31% greater than the upper limit, with viral load > 700,000 UI/mL. **Conclusion:** The 1b genotype was the most frequent. This study showed different VHC genotype frequencies within the country, besides against other populations, which the predominant genotypes are mainly 2a/2c.

Introducción

El virus de la hepatitis C (VHC), reconocido inicialmente como no A no B, fue descubierto en 1989 mediante clonación por Choo Q y colaboradores.¹ Es la principal causa de infección postransfusión y el responsable de la mayoría de los casos de hepatitis viral crónica.² Las complicaciones a largo plazo incluyen cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular en 30% de los casos. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se calcula una prevalencia mundial de 3%, por lo tanto, 169.7 millones de personas están infectadas. En contraste, nuestro país tiene una prevalencia de 0.7%, lo que significa que aproximadamente 700,000 mexicanos están infectados por virus de hepatitis C.³

Dado que en la mayoría de los casos la infección por VHC es asintomática, la detección del virus es el primer frente para la prevención de la transmisión, especialmente en los bancos de sangre y personas de riesgo. Para la detección, diagnóstico y el monitoreo de la respuesta de la enfermedad a los esquemas terapéuticos, existen diferentes técnicas tanto inmunológicas como moleculares. Los ensayos inmunológicos son los que detectan anticuerpos contra el VHC y se subdividen en ensayos de escrutinio (ELISA) o confirmatorias (RIBA). Los ensayos moleculares pueden detectar, cuantificar y caracterizar el genoma de VHC, como las pruebas cualitativas que detectan la presencia de una región del virus en la sangre para uso diagnóstico o las pruebas cuantitativas (carga viral) en donde se estima la cantidad de virus por volumen de sangre, por lo que son de gran importancia para el control y monitoreo de la enfermedad; las pruebas de genotipo analizan las diferencias o variabilidades genéticas en la secuencia del genoma para así identificar el tipo y subtipo del VHC. Es por eso que son imprescindibles para establecer el tipo y tiempo de tratamiento antiviral y es el primer paso en cualquier estudio de epidemiología, aunque también se debe tomar otros factores como: edad, duración

de la infección, presencia de cirrosis y particularmente la carga viral (CV).⁴

De acuerdo con las propiedades genómicas del VHC, se estableció como el único miembro de *Hepaciviridae* perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Tiene un diámetro de 30 a 60 nm con un genoma de ARN de sentido positivo y tiene envoltura. El genoma del VHC es de aproximadamente 9,100 nucleótidos y codifica 10 proteínas.⁵ El extremo 5' UTR es un segmento de 324 a 341 nucleótidos que corresponde a la región más conservada y es por ello que la mayoría de los métodos de detección cualitativa, cuantitativa y de secuenciación utilizan esta secuencia como el blanco de amplificación. También se utiliza para la identificación del genotipo con base en la clasificación de Simmonds⁶ en la cual se ha catalogado en tipos y subtipos.

El virus de la hepatitis C tiene una gran heterogeneidad genómica debido a la elevada replicación viral y la baja fidelidad de la enzima (la tasa de error es de 1 nucleótido por cada 200 incorporados en la replicación). La heterogeneidad genética puede ser clasificada en cuatro niveles, dando lugar a tipos, subtipos, aislados y cuasiespecies. El grado de homología intergenómica da lugar al genotipo, en el cual, si existe homología del genoma entre 66-69%, se le llama *tipo* y se designa con número arábigo (se han descrito del 1 al 6, principalmente); dentro de un mismo tipo, si la homología es de 77-80%, se clasifica en *subtipo* designándose con una letra después del número del genotipo (a, b, c, d, e, f, g y h, principalmente); si dentro de un mismo subtipo existe una homología de 81-90% se denominan *aislados*. En cambio el grado de homología introgenoma de 91-99% da lugar *cuasiespecie* que es el resultante de la acumulación de las mutaciones durante la replicación viral en un individuo⁷ (*cuadro 1*).

La frecuencia de los diversos genotipos varía de un país a otro y se han encontrado diferencias importantes en cada región; los genotipos 1, 2, y 3 tienen distribución mundial, pero sus prevalencias

Cuadro I. Terminología de acuerdo a la homología del genotipo del virus de la hepatitis C (VHC).

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

relativas varían de un área geográfica a otra. Los subtipos 1a y 1b son los más comunes en Estados Unidos, Europa y Japón; los subtipos 2a y 2b son relativamente comunes en Estados Unidos, Europa y Japón; el genotipo 2c es frecuente en el Norte de Italia; el genotipo 3a tiene una relación con las drogas de abuso en Europa y Estados Unidos. El genotipo 4 es prevalente en África y Medio Oriente; los genotipos 5 y 6 se han observado en Sudáfrica y Hong Kong, respectivamente; los genotipos 7, 8 y 9 han sido identificados únicamente en pacientes vietnamitas; el 10 y 11 en pacientes de Indonesia. Aunque los genotipos del VHC pueden ser en parte un predictor independiente de la respuesta a la terapia con interferón, es más probable que los sujetos con genotipos 2 y 3 tengan una respuesta favorable al tratamiento que aquéllos infectados por el genotipo 1a ó 1b.⁸

Es por eso que la determinación del genotipo es una herramienta útil en estudios como transmisión del VHC, epidemiología molecular, patogénesis, ensayos de diagnóstico, historia natural y tratamiento de la infección. La variabilidad geográfica de los genotipos, así como factores de riesgo específicos ha dado lugar a estudios epidemiológicos a gran escala a nivel mundial.

Material y métodos

Tipo de estudio. Observacional, descriptivo, transversal analítico.

Periodo y lugar de estudio. Muestras durante el periodo de enero de 2002 a junio de 2007 de la Unidad de Patología Clínica que se recolectaron en los Servicios de referencia y toma de muestras. El proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación de la Unidad de Patología Clínica y el Departamento de Enseñanza. El estudio se manejó con estricto apego a las especificaciones de confidencialidad y anonimato de los sujetos participantes de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud descritas en el Título Sexto de Ejecución de la Investigación en las Instituciones de Atención a la Salud, así como el manejo del expediente clínico según la Norma Oficial Mexicana (NOM-168SSA1-1998) Numeral 5.6.

Tipo de muestra. Fueron incluidas 403 muestras de pacientes con virus de la hepatitis C. La muestra consistió en sangre tomada en tubo seco, de la cual se obtuvo el suero, que fue transportado al Departamento de Biología Molecular y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

Obtención de la carga viral. La carga viral se obtuvo mediante el método de COBAS AMPLICOR HCV MONITOR versión 2.0. Esta prueba se basa en cinco procesos principales: preparación de la muestra mediante lisis de partículas virales; transcripción reversa del ARN objetivo para generar el ADN complementario (cDNA); amplificación por PCR del cADN objetivo, usando iniciadores complementarios específicos de la región 5' no traducida del (UTR) del VHC; hibridación de los productos amplificados a sondas oligonucleótidas específicas para los objetivos y detección de los productos amplificados unidos a la sonda por determinación colorimétrica. Este proceso da como resultado la concentración de ARN del VHC expresada en UI/mL.⁹

Obtención del genotipo. El genotipo fue identificado mediante HCV Genotype Assay LiPA (Line Probe Assay), el cual está diseñado para identificar los tipos (1-6 y el 10) y los subtipos (1a, 1a/1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a y 10a).

La obtención del genotipo consta de cuatro etapas principales: aislamiento de ARN-VHC, síntesis de cADN, amplificación mediante PCR y PCR anidada de la región 5' no traducida del 5' UTR del VHC e hibridación de los genotipos.

En la etapa de hibridación de genotipos se emplea una técnica de hibridación inversa en donde el ADN biotinilado, obtenido mediante la técnica de amplificación es sometido a hibridación con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas. Las sondas que están unidas a una tira de nitrocelulosa por una cola poli-(T) son específicas de la región 5' UTR de los diferentes genotipos del VHC. Tras la etapa de hibridación se elimina de la tira el ADN no hibridado y se une estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (conjugado) al híbrido biotinilado. El cromógeno BCIP/NBT (sustrato) forma un precipitado de color morado cuando reacciona con el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina, dando lugar a un patrón de bandas en la tira¹⁰ (figura 1).

Para la interpretación del genotipo, las tiras de nitrocelulosa tienen dos líneas de control y 19 líneas de sonda de ADN paralelas que contienen secuencias específicas de los genotipos 1-6 del VHC. La línea de control del conjugado (CONJ CTRL) controla la reacción de desarrollo de color. La línea de control de amplificación (AMPL

CTRL) contiene sondas universales que hibridan con el amplicón del VHC. Los genotipos del VHC se determinan mediante la alineación de las tiras de nitrocelulosa con la tarjeta de referencia del ensayo y la comparación de los patrones de bandas de la tira con los patrones de la tarjeta de referencia en el gráfico de interpretación.

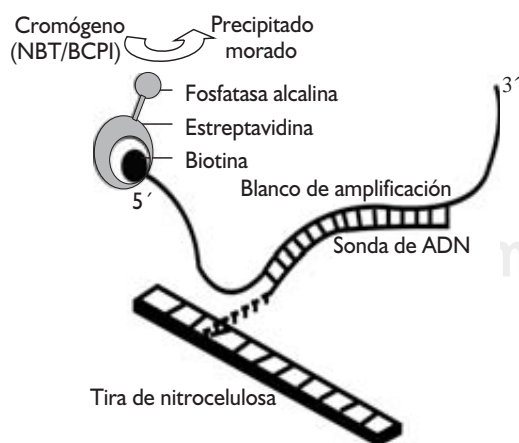
Análisis estadísticos. El estudio de análisis estadísticos fue realizado con el software EBM calculator v.1.1.a. Los valores de p menores de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. En los casos en donde los valores eran igual a cero, se aplicó la corrección de Haldane¹¹ con la siguiente fórmula: $RR = (2a+1) (2d+1) / (2b+1) (2c+1)$.

Resultados

Generalidades de genotipos del VHC. De las 403 muestras analizadas, 183 fueron de los Servicios de referencia y 220 de toma de muestras; con estos datos y para fines de este estudio, la República Mexicana fue dividida en tres zonas principales: 1) Norte, 2) Occidente y Bajío, 3) Centro y Sur (cuadro II).

Edad promedio y sexo. La distribución por sexo fue 60.0% mujeres y 39.7% hombres (sólo en 99.7% se determinó el género), con edad pro-

Principio de ensayo



Tarjeta de referencia del ensayo para la interpretación del genotipo

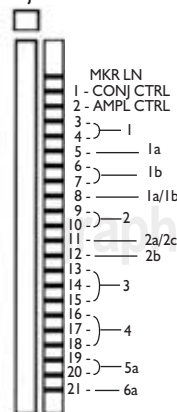


Figura 1. Ensayo e interpretación del HCV Genotype Assay LiPA.

Cuadro II. Distribución de los pacientes en la República Mexicana de acuerdo a la zona.

Norte	n	Occidente y Bajío	n	Centro y Sur	n
BCN	2	Aguascalientes	2	Hidalgo	1
Coahuila	2	Colima	4	Puebla	9
Nuevo León	1	Jalisco	306	Tabasco	3
Sinaloa	18	Michoacán	8	Yucatán	2
Sonora	18	Nayarit	20		
Tamaulipas	2	Querétaro	2		
		SLP	2		
		Zacatecas	1		
Total	43		345		15

BCN = Baja California Norte. SLP = San Luis Potosí.

medio de 50 años (rango: 12 a 84 años). La edad de mayor frecuencia fue entre 40 a 69 años. Para el análisis estadístico cotejamos el sexo frente a cada uno de los genotipos y no encontramos diferencias significativas.

Frecuencia y distribución de genotipos del VHC. La frecuencia que encontramos de genotipos del VHC fue la siguiente: 58.3% tipo 1, 30.5% tipo 2, 8.7% tipo 3, 1% tipo 4 y 1.5 % con tipos mixtos (*figura 2*). Logramos identificar los subtipos del VHC en la mayoría de los casos (85.8%); la mayor frecuencia de subtipos fue 1b 26.8%, 1a 21.3%, 2a/2c 12.4%, 2b 9.2%, 3a 8.4% en nuestra población (*cuadro III*).

Con los resultados de la distribución de los genotipos por zonas de la República Mexicana, se realizó análisis estadístico de cada zona frente a cada uno de los genotipos. Observamos que el genotipo 1b en la zona Norte tiene diferencia significativa en comparación con la zona Occidente y Bajío; el genotipo 1a/1b en la zona Centro y Sur mostró diferencia significativa en contraste con la zona Occidente y Bajío (*figura 3*). En cuanto a la distribución de los genotipos del VHC en Jalisco con respecto a su zona de Occidente y Bajío encontramos diferencias significativas con los genotipos 1a, 2a/2c y 4. En cambio Jalisco en contraste con el resto del país observamos diferencias significativas con el genotipo 1b.

Genotipos del VHC y cargas virales. Encontramos 289 pacientes que solicitaron carga viral (CV) del VHC cercana al genotipo (219 a la misma fecha y 70 con CV hasta tres meses antes) en donde se observó que 69% tienen CV del VHC dentro del rango lineal, teniendo así CV promedio de 314,795 UI/mL con \log_{10} de 5.49 (rango promedio de 5.43 a 5.55 \log_{10}) y 31% de los genotipos son > 700,000 UI/mL. Los genotipos

Cuadro III. Frecuencia de tipos y subtipos del virus de la hepatitis C (VHC) en población mexicana.

Genotipos	n	%
1b	108	26.8
1a	86	21.3
2a/2c	50	12.4
2b	37	9.2
3a	34	8.4
2	28	6.9
1	25	6.2
1a/1b	16	4
2a/2b/2c	5	1.2
2a	3	0.7
4	3	0.7
1/3a	2	0.5
2a/2c/4e	2	0.5
3	1	0.2
4c/4a	1	0.2
1a/2a/2c	1	0.2
1a/3a	1	0.2

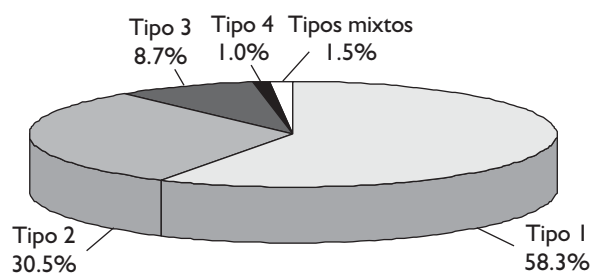


Figura 2. Frecuencia de los genotipos del virus de la hepatitis C (VHC) en población mexicana seleccionada de acuerdo al tipo.

con CV dentro del rango lineal no mostraron diferencias significativas entre sus logaritmos. Comparamos la frecuencia de cada uno de los tipos del VHC con CV > 700,000 *versus* los tipos del VHC con CV dentro del rango lineal. El genotipo 2 con CV > 700,000 UI/mL mostró una diferencia significativa frente a los demás tipos de genotipo VHC. Específicamente, el genotipo 2b con CV > 700,000 UI/mL en comparación con todos los subtipos encontrados (figura 4).

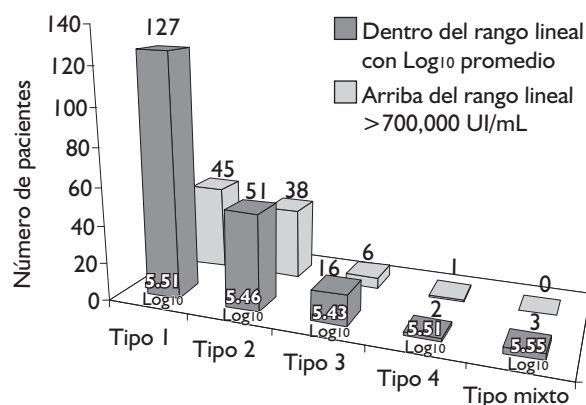


Figura 4. Relación del genotipo de virus de la hepatitis C (VHC) con la carga viral.

Observamos 50 pacientes con carga viral a la par con el genotipo y una carga viral dentro de los seis meses posteriores al estudio, en los cuales 2% subió su carga viral > 0.5 log₁₀, 16% no aumentó ni bajó carga viral > 0.5 log₁₀ y 82% de los pacientes bajó su carga viral > 0.5 log₁₀. Hicimos el análisis estadístico comparando tipos de genotipos que bajaron su CV > 0.5 log₁₀ *versus* los tipos que no subió ni bajó más de 0.5 log₁₀ y encontramos una diferencia significativa en el tipo 1 y 2. Hicimos el mismo análisis con los subtipos encontrados y ninguno presentó una diferencia significativa (figura 5).

De 113 muestras con CV del VHC posteriores al genotipo, 27 muestras mantuvieron de uno a tres años después cargas virales < 600 UI/mL, 63% fue genotipo 2, 22.2% genotipo 1, 7.4% genotipo 3 y 7.4% genotipos mixtos. No encontramos pacientes con cargas virales > 700,000 UI/mL constantes durante más de un año.

Siete pacientes solicitaron un segundo genotipo entre uno y dos años después. Seis de los genotipos tuvieron el mismo tipo y subtipo, en una muestra la primera vez sólo se determinó el tipo y en la segunda tuvo el mismo tipo y se determinó el subtipo.

Discusión

En otras poblaciones del mundo, la proporción de varones predomina sobre los casos femeni-

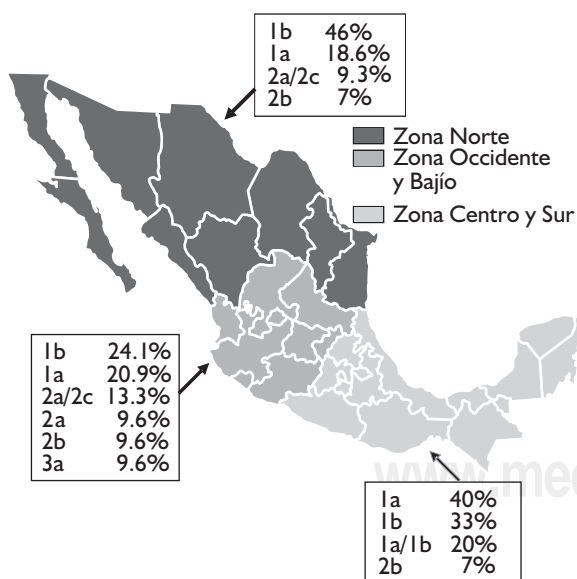


Figura 3. Distribución de los genotipos del virus de la hepatitis C (VHC) por zonas en la República Mexicana.

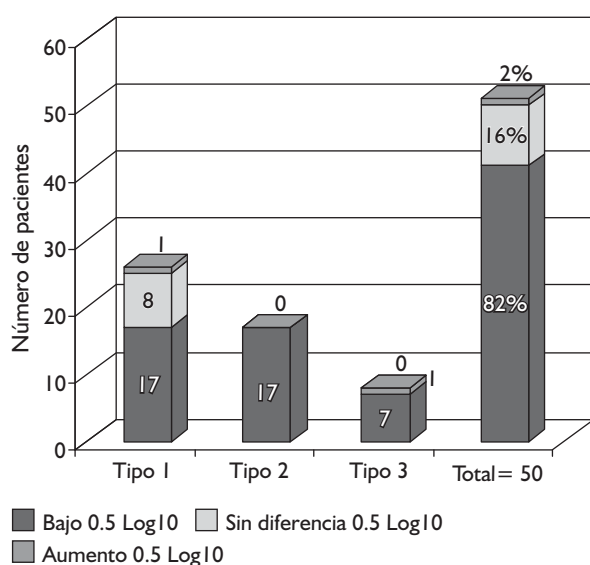


Figura 5. Tendencia de la carga viral de uno a seis meses después de solicitar el genotipo del virus de la hepatitis C (VHC).

nos;¹²⁻¹⁶ en contraste, el sexo femenino predominó en este estudio y en otros más efectuados en México.¹⁷ Además, la edad promedio de los casos fue mayor a aquéllas descritas previamente.^{12,13,17} No encontramos ninguna relación entre género y algún genotipo en particular.

En nuestro estudio, la frecuencia de los tipos del VHC fue similar a lo descrito en otros estudios realizados en México, aunque encontramos mayor frecuencia del tipo 2 en nuestra serie.^{17,18} Observamos que el genotipo 2 es más frecuente en nuestro estudio en contraste con lo descrito en otras poblaciones latinoamericanas, Estados Unidos y España, en donde el tipo 1 fue el más común. El tipo 3 mostró una frecuencia similar con poblaciones latinoamericanas y de Estados Unidos. Sin embargo, el genotipo 4 es más frecuente en México que en Estados Unidos y no es mencionado en los estudios descritos previamente en Latinoamérica.^{13,19-21} Los tipos mixtos son más frecuentes en Estados Unidos y no se han reportado en Latinoamérica ni países europeos como Italia.²²

En lo que respecta a los subtipos de nuestra serie, fueron similares en comparación con los

reportados en otros estudios de México.²³ Sólo el genotipo 1a/1b fue más frecuente en nuestro estudio. Además, nuestro país tiene una distribución de subtipos diferente en comparación con otras poblaciones; en contraste con Latinoamérica, el genotipo 2a tuvo la misma frecuencia, los genotipos 1b, 2b, fueron más frecuentes en México y el 1b y el 3a fueron mayores en Latinoamérica.^{13,24} En comparación con Estados Unidos, los genotipos 2b, 2a y 4 fueron similares; los genotipos 1b y 3a fueron más frecuentes en nuestra población y el 1a es más común en Estados Unidos.^{20,25-27} En contraste con la población de Europa como Francia e Italia, la frecuencia fue muy diferente en todos los subtipos. Los genotipos 2, 1a, 2b y 3a son más comunes en México y los genotipos 3, 1b, 2c y 4 son más frecuentes en Europa. No se reportaron genotipos mixtos.^{22,28,29} El genotipo 2a/2c fue más frecuente en nuestro estudio en contraste con todas las poblaciones mencionadas.

El genotipo más frecuente en nuestro país fue el genotipo 1b y éste está relacionado con hepatocarcinoma y hepatitis crónica, además de una edad de infección en personas mayores; el genotipo 3a se encuentra en quinto lugar de frecuencia en esta población y está relacionado con el abuso de drogas intravenosas y edad de infección en personas jóvenes.²⁹ No encontramos relación entre edad y estos genotipos en particular.

En nuestra población, la carga viral media fue de 314,795 UI/mL; dentro del subtipo no se encontró una relación entre cargas virales, debido a que las diferencias entre ellos no fueron significativas. En cambio, 30% de la población mostró una tendencia en cargas virales por arriba del rango lineal, siendo el principal el genotipo 2 y especialmente el subtipo b. En comparación con poblaciones latinoamericanas y españolas, la carga viral fue similar al promedio en nuestro estudio,^{13,21,30} aunque ellos no encontraron una relación entre genotipo y carga viral; en la población de Estados Unidos la carga viral promedio fue sig-

nificativamente más elevada, así como la tendencia del tipo I a cargas virales altas.^{20,31}

Conclusiones

El género femenino fue más frecuente en nuestro estudio. La edad que predominó fue la edad adulta entre 40 y 69 años de edad. El genotipo del VHC más frecuente en nuestro país fue el genotipo 1b. Respecto a la ubicación geográfica, el genotipo 1b fue más frecuente en la zona Norte y el genotipo 1a/1b en la zona Centro y Sur en comparación con las demás zonas. En particular, el genotipo 1b en Jalisco fue el más frecuente, en contraste con el resto del país. El genotipo 2 tuvo una mayor tendencia a una CV > 700,000 UI/mL, principalmente el subtipo b. A pesar de estas cargas virales altas, este genotipo mostró que, después de haberle identificado el genotipo, logra mantener cargas virales bajas durante tiempo prolongado. Consideramos que la identificación del genotipo del VHC fue de gran impacto en las cargas virales posteriores al estudio, debido a que la mayoría de los pacientes disminuyeron su carga viral en más de 0.5 log₁₀.

Este estudio mostró una frecuencia de genotipos del VHC diferente a la de otras poblaciones. El genotipo 2a/2c fue más frecuente en nuestro estudio, en contraste con todas las poblaciones mencionadas. Es por eso la gran trascendencia de estimar las frecuencias y distribución de los genotipos del VHC en nuestro país, para así tener un mejor perfil epidemiológico para cada genotipo en población mexicana.

Referencias

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
2. Chang KM, Rehermann B, Chesori Francis V. Immunopathology of hepatitis C. *Springer Semin. Immunopathology* 1997; 19: 57-68.
3. World Health Organization. *Weekly Epidemiol Rec* 1999; 74 (49): 425-427
4. Gómez-Cordero I, Álvarez-García M. Biología y métodos diagnósticos del virus de hepatitis C. *Rev Biomed* 2003; 14: 253-268.
5. Virus de las hepatitis. En: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. (eds). *Microbiología médica*. 4a ed. Madrid, España: Elsevier, 2002: 592-593.
6. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19 (5): 1321-1324.
7. Halfon P, Roubicek C, Gerolami V, Quentin Y, Khiri H et al. Use of phylogenetic analysis of hepatitis C virus (HCV) hypervariable region I sequences to trace an outbreak of HCV in an autodialysis unit. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (4): 1541-1545.
8. Zein N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Rev Clin Microbiol* 2000; 13 (2): 223-235.
9. COBAS AMPLICOR HCV Monitor Test version 2.0. Roche Diagnostics. Branchburg, NJ, USA. Revision 5.0 2003.
10. Versant HCV Genotype Assay (LiPA). Bayer HealthCare. Tarrytown, NY, USA. Ref 128445, Rev. 1 2004-08.
11. Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1955; 20: 309-311.
12. Vicentellia R, Ovalles R et al. Seroprevalence of anti-VHC in patients attend at Clinic Immunology Regional Unit of Maracay, Venezuela, 2003-2004. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25 (2): 105-108.
13. Colina R, Mogdasy MC, Cristina J, Uriarte MR. Caracterización molecular del virus de la hepatitis C en Montevideo-Uruguay. *Rev Med Uruguay* 2002; 18: 76-82.
14. Valdés J, Rodríguez O, Cardellá R. Hepatitis C I. Frecuencia de seropositivos al VHC en los diferentes servicios del Hospital «Calixto García» en el trienio 1996-1998. *Rev Cubana Invest Biomed* 2004; 23 (4): 201-208.
15. Vilar-Gomez E, Grá-Oramas B, Llanio-Navarro R et al. Influencia de factores epidemiológicos en la progresión de la fibrosis en la hepatitis crónica C. *Rev Cub Med* 2003; 42 (5): ISSN 0034-7523.
16. Arora DR, Sehgal R, Gupta N, Yadav A, Mishra N, Siwach SB. Prevalence of parenterally transmitted hepatitis viruses in clinically diagnosed cases of hepatitis. *Ind J Med Microbiol* 2005; 23 (1): 44-47.
17. Vera LL y cols. Panorama epidemiológico y situacional de la hepatitis C en México. *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70 (1): 25-32.
18. Méndez-Sánchez N et al. Hepatitis C virus genotypes in Mexico City. *Journal of Hepatology* 2002; 36 (1): 241.
19. Sanchez JL, Sjogren MH, Callahan JD, Watts DM, Lucas C et al. Hepatitis C in Peru: risk factors for infection, potential iatrogenic transmission, and genotype distribution. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63 (5): 242-248.
20. Mutchnick B, Klion T et al. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6,807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J Viral Hepatitis* 2000; 7 (3): 196-202.
21. Fernández-Salazar LI, Álvarez-Gago T et al. Iron overload and genotype 3 are associated with liver steatosis in chronic hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96 (12): 818-828.
22. Guadagnino V, Stroffolini T, Rapicetta M et al. Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: A community-based survey in southern Italy. *American Association for the Study of Liver Diseases*. 1997; 26 (4): 1006-1011.
23. Alvarez-Muñoz MT, Vences-Aviles MA, Vazquez-Rosales G et al. Hepatitis C virus RNA (HCV-RNA) in blood donors and family members seropositive for anti-VHC antibodies. *Arch Med Res* 2001; 32 (5): 442-445.

24. Soza A, López-Lastra M. Hepatitis C en Chile: Magnitud del problema. *Rev Med Chile* 2006; 134: 777-788.
25. Sy T, Jamal M. Epidemiology of Hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3 (2): 41-46.
26. Zein N, Rakela J et al. Hepatitis C virus genotypes in the United States: Epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. *Ann Inter Med* 1996; 125 (8): 634-639.
27. Zein N, Persing D. Hepatitis C genotypes: Current trends and future implications. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 458-462.
28. Martinot-Peignoux M, Roudot-Thoraval F, Mendel I, Coste J et al. Hepatitis C virus genotypes in France: Relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. *J Viral Hepatitis* 1999; 6 (6): 435-443.
29. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C et al. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1995; 171 (6): 1607-1610.
30. Córdoba J, Olaso V, Molina JM, López B et al. Análisis comparativo de la carga viral mediante bDNA HCV RNA-2.0 y Amplicor HCV Monitor, en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C. *Enf Infec Microbiol Clin* 2000; 18 (1): 6-11.
31. Nainan O, Alter MJ, Moran-Kruszon D et al. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology* 2006; 131 (2): 478-484.