

Artículo original

Infección por el virus de la hepatitis C (HCV) en pacientes hemodializados seronegativos para anticuerpos anti-HCV

María Zulay Sulbarán^{a,*}, Yurviris del Valle Farías^b, Yoneira Sulbarán^c, Carmen Rosa Flores^d, Jose Zerpa^e, Antonio Maldonado^a, Genny Guillén^b, Héctor Rangel^c, Flor Helene Pujol^e

^aLaboratorio de Virología, Postgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, ^bDepartamento de Bioanálisis, UDO-Sucre, ^cLaboratorio de Virología Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, ^dLaboratorio de Referencia de Salud Pública, Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá", ^ePostgrado de Puericultura y Pediatría, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui.

Recibido 28 de febrero de 2015; aceptado 22 de mayo de 2015

Resumen: La infección por el virus de la hepatitis C (HCV) es común en pacientes hemodializados. Se evaluaron 43 sueros de pacientes de la Unidad de Diálisis "Dr. José Maza Carvajal" del Servicio Autónomo del Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá" (SAHUAPA), en Cumaná, estado Sucre. Se determinaron anticuerpos IgG séricos contra el HCV (anti-HCV) utilizando tres técnicas inmunoenzimáticas. Para amplificar la región 5' no codificante (5'NC) se usó la técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), en muestras positivas y negativas para anti-HCV. La presencia de anticuerpos y RNA del HCV fue de 9,3% y la presencia de RNA del HCV en pacientes con anti-HCV negativos fue de 42%, lo cual representó una frecuencia de infección activa de 51%. Análisis filogenéticos de la región 5'NC evidenciaron que el genotipo 2 fue el más prevalente, en particular el subtipo 2b, seguido por el genotipo 1, mientras que en siete muestras no se logró identificar el subtipo. La presencia de un alto número de pacientes seronegativos e infectados con el HCV puede deberse al estado de inmunocompromiso de estos pacientes; de allí la importancia de la determinación de la viremia.

Palabras clave: HCV, ELISA, RT-PCR, RNA, genotipo, hemodiálisis.

Hepatitis C virus (HCV) infection in hemodialysed patients seronegative for anti-HCV antibodies

Abstract: Hepatitis C virus infection is common in hemodialysed patients. Sera from 43 patients from the Dialysis Unit "Dr. José Maza Carvajal" of the University Hospital "Antonio Patricio de Alcalá", in Cumaná, Sucre state, were evaluated. Antibodies against HCV (anti-HCV) were determined using three immunosorbent assays. The 5' non-coding (5'NC) HCV region was amplified by RT-PCR in all samples. The presence of antibodies and HCV RNA was 9.3% and of HCV RNA in seronegative sera 42%, which represents a frequency of infection of 51%. Phylogenetic analysis of the 5'NC region showed that genotype 2 was the most frequently found, particularly due to subtype 2b, followed by genotype 1, while seven subtypes could not be determined. The presence of a high number of seronegative HCV-infected hemodialysed patients might be due to the immunocompromised condition of these patients; hence the importance of determining the viremia.

Keywords: HCV, ELISA, RT-PCR, RNA, genotype, hemodialysis.

* Correspondencia:
E-mail: mzulay@yahoo.com

Introducción

El virus de la hepatitis C (HCV por sus siglas en inglés) es un virus hepatotrópico del género *Hepacivirus* perteneciente a la familia *Flaviviridae*, envuelto, con un genoma de ácido ribonucleico (RNA) de simple cadena, de sentido positivo, de aproximadamente 9.600 nucleótidos de longitud. Se han

descrito 7 principales genotipos del HCV (numerados del 1 al 7) y un gran número de subtipos [1].

A pesar de la detección de anticuerpos anti-HCV y la implementación de medidas de prevención, la hepatitis C es común en pacientes con enfermedad renal terminal en tratamiento sustitutivo (diálisis y/o trasplante). La infección por el HCV es con frecuencia asintomática y tiene un efecto

perjudicial, tanto en la supervivencia de los pacientes en diálisis, como después del trasplante renal [2]. La tasa de infección por HCV en pacientes hemodializados es superior a la indicada en la población general; la prevalencia de anti-HCV promedia entre 1 a 54% en Europa, de 17 a 51% en Asia, 2 a 10% en Nueva Zelanda y Australia, 8 a 36% en América del Norte, y 39% en América de Sur [3].

Al problema de la infección manifiesta por el HCV se le suma la infección oculta (OCI, del inglés “*occult hepatitis C virus infection*”), la cual se describe como la detección de ácido ribonucleico (RNA) del HCV en las células del hígado o células mononucleares de sangre periférica (PBMK del inglés “*peripheral blood mononuclear cells*”) en ausencia de RNA-HCV sérico y anticuerpos anti-HCV. La detección de RNA-HCV en el hígado es el método más preciso para el diagnóstico de la infección oculta. Sin embargo, cuando una biopsia de hígado no es posible, la detección de RNA-HCV en PBMK es un procedimiento alternativo [4]. También se ha definido la infección oculta como infección seronegativa o serosilente, donde hay ausencia de anti-HCV y presencia de RNA-HCV en suero. La infección por HCV en pacientes seronegativos para anticuerpos anti-HCV actualmente es de gran interés para científicos y médicos [5].

Los pacientes en hemodiálisis son pacientes con alto riesgo de adquirir la infección por HCV, debido a los numerosos procedimientos de accesos vasculares y transfusiones de sangre periódicas, además de presentar características especiales que impiden el diagnóstico de la infección, como leves incrementos de los niveles de alanino-aminotransferasa (ALT), viremia intermitente y serología anti-HCV negativa por largos periodos de tiempos después de la infección, aumentando el riesgo de transmisión nosocomial entre los pacientes, por lo que es importante considerar la detección del RNA-HCV como factor preventivo de la expansión del HCV [6,7]. Hasta ahora no ha sido estudiada la distribución de genotipos y la presencia de infección oculta por HCV en pacientes que asisten a la Unidad de Hemodiálisis “Dr. José Maza Carvajal” del Servicio Autónomo del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), en Cumaná, estado Sucre. En este trabajo se consideró oportuno estudiar la prevalencia de infección por HCV, la existencia de infección oculta y determinar los genotipos virales, en una población de alto riesgo como son los pacientes hemodializados, con el propósito de aportar una valiosa información epidemiológica y molecular de la infección crónica por HCV para el país.

Materiales y métodos

Sueros: Se procesó un total de 43 sueros provenientes de pacientes de ambos sexos y con edades comprendidas entre 21 a 76 años, atendidos en la Unidad de Hemodiálisis “Dr. José Maza Carvajal” del SAHUAPA de Cumaná, estado Sucre, entre mayo y julio de 2010, los cuales representaron la totalidad de la población. Cada suero se dividió en dos muestras, una para los ensayos serológicos y otra para los moleculares, los cuales fueron realizados en los laboratorios

de Virología del Postgrado en Biología Aplicada de la Universidad de Oriente (UDO) y Virología Molecular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) respectivamente. Este trabajo recibió la aprobación del Comité de Bioética de la UDO bajo el marco del proyecto PEI No 2012000805. Se obtuvo el consentimiento de participación de cada paciente, una vez informado sobre los alcances del estudio. Los datos epidemiológicos fueron obtenidos de la historia de cada paciente.

Detección de anticuerpos IgG anti-HCV: La presencia de IgG anti-HCV se detectó a través de tres ensayos inmunoenzimáticos: UMELISA HCV (Tecnosuma), Innostest HCVab IV (INNOGENETICS N.V.) y Bioelisa HCV 4.0 (BIOKIT).

Extracción del RNA del HCV y amplificación de la región 5' no codificante (5'NC): Se extrajo el RNA de 140 µL de suero de cada paciente, mediante el uso del estuche *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. La amplificación de la región 5' NC por RT-PCR se realizó usando los iniciadores externos (939P y 209N) para la primera ronda y los iniciadores internos (940P y 211N) para la segunda ronda; la amplificación fue llevada a cabo según el protocolo de Chan *et al.* [8]. Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, visualizados usando bromuro de etidio bajo luz ultravioleta y purificados usando el kit *QIAquick PCR*, según las instrucciones del fabricante. El DNA purificado se secuenció en el Centro de Servicios Macrogen (Seúl, Corea).

Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas: Las secuencias de nucleótidos obtenidas de la región 5'NC del HCV 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*), estimado por el método de los dos parámetros de Kimura, usando el programa DNAMAN versión 5.2.2. Como medida de la robustez de cada nodo se utilizaron valores de confianza (*bootstrap*) basados en 1.000 réplicas.

Análisis estadístico: Los resultados se registraron en tablas de frecuencias que muestran los valores absolutos y/o porcentuales de pacientes infectados por HCV. Se aplicó la prueba exacta de Fisher a un nivel de confianza de 95%, para analizar la asociación entre la presencia de anticuerpos anti-HCV y la edad y sexo del paciente, así como también la presencia de RNA viral y el número de diálisis [9].

Resultados

De los 43 sueros de pacientes atendidos en la Unidad de Hemodiálisis “Dr. José Maza Carvajal” durante el periodo de mayo a julio del 2010, cuatro pacientes (9,3%) resultaron positivos para anticuerpos anti-HCV usando las tres técnicas inmunoenzimáticas (UMELISA HCV, Innostest HCV Ab IV y Bioelisa HCV 4.0). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la presencia de anticuerpos anti-HCV y la edad o sexo de los pacientes hemodializados.

La amplificación de la región 5' NC del genoma del HCV, en las muestras que presentaron anticuerpos anti-HCV, demostró actividad replicativa viral y por ende, infección activa (presencia de RNA-HCV) en el 100% (4/4) de las muestras. En 39 pacientes negativos para anticuerpos anti-HCV, 18 (46%) resultaron positivos por RT-PCR (infección serosilente), elevando la frecuencia de infección activa de 9,3% (4/43) a 51% (22/43).

El análisis filogenético de la región 5' NC permitió identificar los genotipos 1 (6/22) y 2 (9/22), específicamente los subtipos 1a (5/6), 1b (1/6), 2a (1/9) y 2b (8/9); en 7/22 pacientes no se logró determinar el genotipo, debido a que amplificaciones y secuenciaciones repetidas proporcionaron el mismo patrón de secuencia alterada (Figura 1, Tabla 1). Adicionalmente se observó la presencia de polimorfismo en algunas de las muestras, sugestivo de coinfección (datos no mostrados).

Tabla 1. Distribución de genotipos de 22 muestras secuenciadas por la región 5' NC, en pacientes que acudieron a la unidad de hemodiálisis “Dr. José Maza Carvajal” del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre. Mayo a julio de 2010.

Subtipo (región 5' NC)	Distribución por subtipo (N=22)		Distribución por genotipo (N=22)	
	n	%	n	%
1a	5	23	6	27
1b	1	4,6		
2a	1	4,6	9	41
2b	8	36		
No determinados	7	32	7	32
Total	22	100	22	100

N: total de pacientes con secuencias de la región 5' NC; n: número de pacientes según subtipo o genotipo.

Se encontró que solo 12% (5/43) de los pacientes recibió transfusiones y en cuatro de ellos (4/5) se encontró RNA viral sin anticuerpos anti-HCV.

No se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre la presencia de infección y el número de sesiones de diálisis, aunque se observó la tendencia de que el grupo de pacientes que recibió múltiples sesiones de diálisis (>3 sesiones) tuvo una mayor frecuencia de infección activa por HCV (55%, 21/38) con respecto al grupo de pacientes que recibió menos de 3 sesiones (20%, 1/5) (Tabla 2).

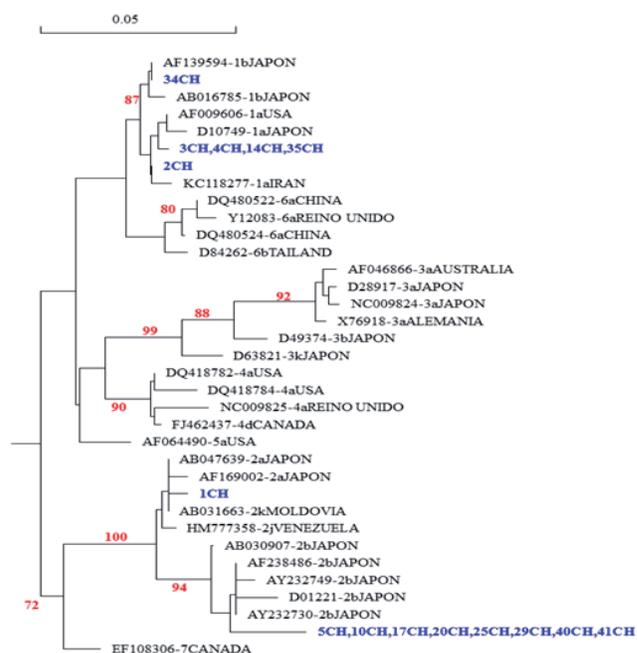


Figura 1. Árbol filogenético de 15 aislados del virus de la hepatitis C de los subtipos 1a, 1b, 2a y 2b, de pacientes que acudieron a la Unidad de Hemodiálisis “Dr. José Maza Carvajal” del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, correspondiente a un fragmento de 192 pb de la región 5' NC (nucleótidos 96 al 287 según la cepa H77-AF009069, subtipo 1a). Los aislados de referencia son designados por el número de acceso en el banco de genes. Estos aislados de referencia para asignar genotipos fueron los siguientes: genotipo 1a (KC118277, AF009606, D10749), 1b (AB016785, AF139594), 2a (AF169002, AB047639), 2b (AB030907, AF238486, AY232730, D01221, AY232749), 2j (777358), 2k (AB031663), 3a (AF046866, D28917, NC009824, X76918), 3b (D49374), 3k (D63821), 4a (DQ418782, DQ418784, NC009825), 4d (FJ462437) 5a (AF064490), 6a (DQ480524, DQ480522, Y12083), 6b (D84262), 7 (EF108306). Al lado del nombre se indica el genotipo y lugar de aislamiento de la cepa. En azul: aislados de pacientes hemodializados. Para comprobar el nivel de confianza del agrupamiento se utilizó el programa *bootstrap* del paquete (DNAMAN 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 nucleótido por sitio.

Tabla 2. Distribución de pacientes hemodializados con y sin infección activa por el virus de la hepatitis C, según las sesiones de diálisis en la unidad de hemodiálisis “Dr. José Maza Carvajal” del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, estado Sucre. Mayo a julio de 2010.

Pacientes dializados (N=43)	Infección activa (RNA)		Sin infección		Fisher p
	n	%	n	%	
≤ 3 diálisis (n=5)	1	20	4	80	
> 3 diálisis (n=38)	21	55	17	46	0,1579 ns

N: total de pacientes estudiados; n: número de pacientes según una condición; ns: no significativo ($p > 0,05$).

Discusión

De los 43 sueros evaluados cuatro pacientes resultaron positivos para anticuerpos anti-HCV, lo cual representó una frecuencia de infección de 9,3%. En general, los estudios diagnósticos para la determinación de anti-HCV

presentaron una alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, algunos estudios sugieren que la sensibilidad y especificidad varía según la población estudiada y estuche comercial usado [10,11]. En este estudio las tres pruebas utilizadas (UMELISA HCV, Innostest HCVAb IV y Bioelisa HCV 4.0) evidenciaron la presencia de anticuerpos, con altos valores de lectura, en las mismas cuatro muestras.

Los primeros estudios realizados en Venezuela, en cuatro unidades de hemodiálisis de Caracas, mostraron una prevalencia de 73% (162/227) de anti-HCV en este grupo de riesgo [12]. Un estudio posterior reveló una prevalencia de 7% (6/90), en pacientes con insuficiencia renal crónica atendidos en la Unidad de Diálisis "Barquisimeto" [13], resultados equiparables a los encontrados en esta investigación. Sin embargo en 50 pacientes hemodializados en el Hospital de Maracaibo, no se encontraron anticuerpos anti-HCV [14]. A nivel mundial, los primeros estudios realizados de prevalencia de anti-HCV en unidades de hemodiálisis, a principios de los años 90, oscilaban entre 20% y 70% [15]; sin embargo, al transcurrir de los años estas tasas han disminuido progresivamente debido a las mejoras de las medidas de control, prevención y diagnóstico.

La variedad de estudios en pacientes hemodializados, sugieren que existen diferencias de prevalencia de infección por HCV entre países e incluso entre unidades de diálisis dentro de un mismo país [7,16], y esto parece estar influenciado por procedimientos relacionados con la atención de la salud, factores socioeconómicos, la reutilización de líneas de hemodiálisis, higiene y esterilización de los equipos, la rotación de las máquinas en los pacientes y el seguimiento de las rigurosas normas universales de bioseguridad en cada unidad [17].

En esta investigación la presencia de anti-HCV no estuvo asociada al sexo de los pacientes, sin embargo, en un estudio realizado en Venezuela y otro que involucró países de tres continentes (Francia, Alemania, Italia, Japón, España, Reino Unido y Estados Unidos) la frecuencia de infección fue mayor en el sexo masculino [13,18]. En este estudio tampoco se encontró asociación entre la presencia de anti-HCV y la edad del paciente, pero se ha descrito que las patologías renales tienen una mayor ocurrencia en hombres adultos mayores y que la edad afectada de los pacientes hemodializados con anti-HCV generalmente es mayor a 36 años [13,19].

En los cuatro pacientes que presentaron anticuerpos anti-HCV se encontró infección activa (presencia RNA-HCV), mientras que en 18/39 (46%) de los pacientes negativos para anti-HCV también se logró amplificar el genoma viral. No es la primera vez que se obtienen resultados similares en pacientes hemodializados en Venezuela, Pujol *et al.* encontraron infección por HCV en pacientes negativos para anticuerpos anti-HCV en un 24% de los casos (5/21) [12]. Sin embargo, en un trabajo más reciente no se encontró RNA-HCV en pacientes hemodializados negativos a anti-HCV [14], probablemente como resultado del estricto seguimiento de las normas de prevención de infección en las unidades de diálisis.

Algunos pacientes inmunosuprimidos tardan más tiempo en seroconvertir, con retrasos de hasta 18 meses en pacientes en diálisis [20]; adicionalmente, durante la hemodiálisis, pueden perder anticuerpos lo que favorece la negatividad [21].

Bajas prevalencias de infección no justifican la inclusión de la tecnología molecular como prueba de rutina en pacientes hemodializados, pero es evidente que en centros con altas tasas de infección por HCV, se resalta la importancia de implementar el estudio molecular de rutina en el diagnóstico de la infección, el cual no se realiza en la unidad de diálisis donde se realizó esta investigación.

Los análisis filogenéticos de la región 5'NC permitieron observar un predominio del genotipo 2 (con una alta frecuencia del subtipo 2b), seguido del genotipo 1 (particularmente el subtipo 1a) (Figura 1, tabla 1). En la población general de América Latina, el genotipo más frecuente es el 1 (>80%), y se ha descrito la presencia de los genotipos 2, 3 y 4 en bajos porcentajes [23]. En Venezuela, en 14 pacientes hemodializados, provenientes de diferentes unidades de hemodiálisis de Caracas, se encontró una mayor prevalencia del genotipo 1 que del genotipo 2, entre los años 1994 y 1995 [24]. En este trabajo se encontró que el genotipo 2b fue el más prevalente en la Unidad de Diálisis del SAHUAPA, un genotipo históricamente de baja ocurrencia en Venezuela en comparación al genotipo 1 [14,24]. Investigaciones recientes indican una tendencia al aumento del genotipo 2 en nuestra población para los próximos años [22,25].

En diferentes regiones del mundo, se ha evaluado la posibilidad de cambios en la distribución de los genotipos del HCV [26] y existe evidencia de que los distintos genotipos encontrados en la infección oculta, son fruto de los diferentes patrones epidemiológicos de los países en los que se ha estudiado [27]. Por ello, la alta frecuencia del subtipo 2b en los pacientes hemodializados, pudiera ser un reflejo de los genotipos que están circulando en la población estudiada, o en su defecto, el producto de una diseminación intra-unidad.

En cuanto al genotipo 1, se encontró que el subtipo 1a fue el segundo más frecuente en los pacientes hemodializados (23%, 5/22), datos que contrastan con trabajos previos, donde el subtipo 1b fue el más prevalente en la población general, por más de una década [22,25,28]. Sin embargo, este resultado debe ser analizado con cautela debido al bajo poder discriminatorio de la región 5'NC en la asignación de subtipos [22].

En los pacientes hemodializados se han descrito infecciones mixtas e inclusive recambio de diferentes genotipos a lo largo de la infección [24]. En un importante número de muestras en esta investigación no se logró caracterizar genotípicamente el HCV (no tipificable), debido a que el genoma viral repetidamente amplificado y secuenciado presentó un patrón de secuencia alterado (Tabla 1). Adicionalmente en algunas muestras se observó la presencia de polimorfismo, lo que sugiere infección mixta.

Aunque no se encontró diferencia significativa entre

el número de diálisis y la presencia o no de infección, se observó mayor tendencia de infección por el HCV en el grupo de pacientes que habían recibido múltiples (>3) sesiones de diálisis (Tabla 2). Se ha reportado un mayor porcentaje de infección por el HCV (18%, 16/87) en los pacientes que recibieron múltiples sesiones de diálisis, en relación a los pacientes que no habían sido dializados múltiples veces (3%, 2/76) [29]. Adicionalmente, en cuatro de los únicos cinco pacientes que habían sido transfundidos, se encontró infección seronegativa, sin embargo, son necesarios estudios adicionales.

La alta prevalencia de genotipos, subtipos y muestras no tipificadas en la Unidad de Diálisis “Dr. José Maza Carvajal” del SAHUAPA, inusualmente frecuentes en la población general, sugiere la probable presencia de infecciones mixtas. El hecho de que cuatro pacientes con HCV del subtipo 1a y ocho con el subtipo 2b presentaran la misma secuencia nucleotídica (Figura 1), y que la infección fuera más frecuente en pacientes que han recibido múltiples sesiones de diálisis, sustentan la idea de transmisión intraunidad en este centro de diálisis; sin embargo, se requieren estudios posteriores para tratar de relacionar la infección con una ruta de transmisión.

La presencia del genotipo 2b en los aislados del oriente del país, evaluados en este estudio, es alentador, pues es conocido que pacientes infectados con el genotipo 2 tienen un mayor éxito terapéutico que aquellos infectados con el genotipo 1 [30]. Sin embargo, la significancia clínica de la infección por HCV en pacientes negativos para anticuerpos anti-HCV requiere de estudios adicionales.

Conclusión

El presente estudio, a pesar de tener un escaso número de pacientes, es el primero en demostrar la presencia de infección por el virus de la hepatitis C en la Unidad de diálisis “Dr. José Maza Carvajal”, no solo en pacientes hemodializados seropositivos sino también en aquellos seronegativos para anticuerpos anti-HCV. También resalta la importancia de tomar medidas adecuadas de bioseguridad y reforzar las ya existentes, de tal manera de evitar una posible diseminación del virus entre pacientes y personal de salud debido a la alta prevalencia de infección silente. Estos hallazgos demuestran que la infección por el HCV es un problema significativo en esta unidad de diálisis y merece ser abordado desde los distintos puntos de vista: epidemiológico, clínico y terapéutico, de tal manera que permita evaluar el impacto de la infección por HCV en pacientes hemodializados negativos para anticuerpos anti-HCV.

Agradecimientos

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

Referencias

- Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology*. 2007; 46:623A.
- Fabrizi F, Messa P, Basile C, Martin P. Hepatic disorders in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010; 6:395-403.
- Polenakovic M, Dzekova P, Sikole A. Hepatitis C in dialysis patients. *Contributions. Sec Biol Med Sci*. 2007; 1:239-65
- Barril G, Castillo I, Arenas M, Espinosa M, Garcia J, Garcia N *et al*. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 2288-92.
- Kaźmierczak J, Pawełczyk A, Caraballo K, Radkowski, M. Seronegative hepatitis C virus infection. *Arch Immunol Ther Exp*. 2014; 62:145-51.
- Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, Martin P. Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: novel perspectives. *J Nephrol*. 2003; 16:467-75.
- Rahnavardi M, Hosseini S, Alavian S. Hepatitis C in hemodialysis patients: current global magnitude, natural history, diagnostic difficulties, and preventive measures. *Am J Nephrol*. 2008; 28:628-40.
- 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; 73:1131-41.
- Sokal R, Rohlf J. *Biometría, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. San Francisco: Editorial W. Freeman y Co; 1980.
- Rivero R, Merlin J, Blanco M, Navea L, Lam R, Castillo D y col. Eficacia diagnóstica de sistemas de inmunoensayos para el virus de la hepatitis C en muestras de pacientes multitransfundidos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2009; 25:56-65.
- Cardona N, González K, Garzaro D, Loureiro C, Duarte M, García D y col. 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 Ven Microbiol*. 2010; 30:72-7.
- Pujol F, Ponce J, Lema M, Devesa M, Sirit F, Salazar M *et al*. High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in units with high prevalence. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1633-6.
- Agobian G, Agobian S, Lyon N, Leal J. Seroprevalencia de anti-HCV, 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; 19:134-7.
- Monsalve F, Gómez L, Albillos A, Álvarez M, Costa L, Araujo M. Hepatitis C virus in populations at risk for infection. Venezuela. *Rev Esp Enf Digest*. 2007; 99:315-9.

15. Center for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infections and HCV related chronic disease. MMWR 1998; 47 (NºRR19):22-5.
16. Alavian S. Hepatitis C in hemodialysis patients needs more attention for control and review the risk factors. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2010; 21:357-8
17. Barril G, Traver J. Decrease in the hepatitis C virus (HCV) prevalence in hemodialysis patients in Spain: effect of time, initiating HCV prevalence studies and adoption of isolation measures. Antiviral Res. 2003; 60:129-34.
18. Fissell R, Bragg J, Woods J, Jadoul M, Gillespie B, Hedderwick S *et al.* Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. Kidney Inter. 2004; 65:2335-42.
19. Méndez A, Méndez J, Tapia T, Muñoz A, Aguilar L. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. Dial Traspl. 2010; 31:1886-2845.
20. Schroeter M, Zoellner B, Polywka S, Laufs R, Feucht H. Prolonged time until seroconversion among hemodialysis patients: The need for HCV PCR. Intervirology. 2005; 48:213-5.
21. Tu A, Buxton J, Whitlock M, Djurdjev O, Chong M, Krajden M *et al.* Prevalence and incidence of hepatitis C virus in hemodialysis patients in British Columbia: follow-up after a possible breach in hemodialysis machines. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2009; 20(2): 19-23.
22. Sulbarán M, Di Lello F, Sulbarán Y, Cosson C, Loureiro C, Rangel H, *et al.* 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.
23. Dávalos, M. Epidemiología de la infección por el virus de la hepatitis C en el Perú y Latinoamérica. Rev Gastroenterol Perú. 2009; 29:347-54.
24. Pujol F, Devesa M, Loureiro C, Capriles F, Liprandi, F. Turnover of hepatitis C virus genotypes in hemodialysis patients. Arch Virol. 1998; 143:823-7.
25. Pujol F, Loureiro C. Replacement of hepatitis C virus genotype 1b by genotype 2 over a 10-year period in Venezuela. J Clin Gastroenterol. 2007; 41:518-20.
26. Esteban J, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. J Hepatol. 2008; 48:148-62.
27. Carreño V, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga J. New perspectives in occult hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol. 2012; 18:2887-94.
28. 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; 24:256-8.
29. Freitas S, da Cunha R, Martins R, Teles S, Ibanhes M, Motta A. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103:405-8.
30. Arias Y, Echeverry S, Castro M, Ríos M, Martínez, O. Frecuencia de genotipos y subtipos de virus de la hepatitis C en pacientes colombianos con infección crónica. Rev Med Sanit. 2010; 13(3):10-9.