



Infección por el Virus de la Hepatitis C en pacientes con historia transfusional antes de 1996 en tres ciudades de Colombia

Hepatitis C Virus Infection in patients with history of blood transfusion before 1996 in three cities of Colombia

María Camila López Osorio

Tesis de maestría para optar al título de maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología, Universidad de Antioquia

Directora:

María Cristina Navas Navas, PhD en Virología

Co – director:

José Aldemar Usme Ciro, PhD en Biología

Comité Asesor

Fabián Cortés Mancera, candidato PhD en Biología Médica

Mauricio Beltrán Durán, Magister en Salud Pública

Nelson Alvis Guzmán, PhD en Economía y Gestión de la Salud

Universidad de Antioquia

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Medellín, Antioquia, Colombia

2021

Cita	Lopez Osorio (1)
Referencia	Lopez Osorio MC. Infección por el Virus de la Hepatitis C en pacientes con historia transfusional antes de 1996 en tres ciudades de Colombia. Tesis de Maestría. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. 2021
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología. Cohorte 2018-I

Grupo de Investigación Gastrohepatología

Instituto de Investigaciones Medicas (IIM), Sede de Investigación Universitaria



Biblioteca Médica

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Eliana Restrepo Pineda

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Agradecimientos especiales

A la Corporación Académica de Ciencias Básicas Biomédicas por el apoyo en mi proceso de formación como magister en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Virología.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación por la financiación del proyecto de investigación y la disposición de dinero para la beca de convenio – pasantía que me permitió realizar mi proceso sin ningún problema.

A los doctores Maria Cristina Navas Navas y José Aldemar Usme Ciro por su disposición incondicional en la dirección del proceso de formación, siempre fomentando la excelencia académica como un pilar fundamental lo que ratificó estar en modo aprendiz y dispuesta a dar lo mejor para alcanzar los objetivos.

Al comité tutorial conformado por los doctores Mauricio Beltrán Durán, Nelson Alvis Guzmán y Fabián Cortés Mancera por su guía y apoyo durante todo el proceso de formación para la resolución de problemas.

A los evaluadores, los doctores Katherine Laiton Donato y Alfredo Ríos Ocampo por su disponibilidad en la evaluación de este trabajo de investigación, por sus recomendaciones al manuscrito y durante la sustentación para la culminación de este proceso de formación y la publicación de los resultados.

A los integrantes del Grupo de Gastrohepatología, especialmente, a Diana Di Filippo y Melissa Montoya por su acompañamiento y apoyo en la resolución de problemas experimentales y en la preparación de todas las etapas del proceso académico.

Al Grupo de Investigación de Genética Molecular, especialmente a Sebastián Pino por la donación del ADN del gen olfativo OR4 de *Aedes Aegypti* para la realización del control interno, así mismo por su apoyo incondicional durante todo el proceso.

A mis compañeros de trabajo y estudio y al programa COVECOM junto con los líderes sociales por acompañarme en este camino académico, permitiendo una formación integral no solo en la parte académica sino como persona.

Por último y muy importante, a Dios, mi familia y pareja (Santiago Velásquez Echavarría) por ayudarme en todo momento, por recordarme la calidad de persona y profesional en la que me estoy convirtiendo y por estar ahí para indicarme que siempre el trabajo duro, con disciplina y dedicación conlleva a la obtención de excelentes resultados y al cumplimiento de los objetivos trazados.

Tabla de Contenido

Siglas, acrónimos y abreviaturas	8
RESUMEN	9
Abstract	11
Aim:	11
Conclusions:	12
Introducción	13
Marco teórico	16
Generalidades del VHC	17
Proteínas estructurales del VHC	19
Core	19
E1 y E2	20
Proteínas no estructurales del VHC	20
P7	20
NS2	21
NS3/NS4A	21
NS4B	21
NS5A	21
NS5B	22
Replicación del VHC	23
Perfil clínico y diagnóstico de la infección por VHC	25
Tratamiento del VHC	27
Mutaciones asociadas a resistencia a los AAD	29
Patogénesis del VHC	32
Diversidad genética del VHC	35
Evolución del VHC	37
Epidemiología del VHC	38
Epidemiología de la infección por VHC en Colombia	40
Planteamiento del problema	52
Objetivo general	54
Objetivos específicos	54
Pregunta de investigación	54

Metodología	55
Tipo de estudio	55
Población de estudio	55
Muestras	56
Extracción del ARN viral	56
Detección y amplificación del genoma del VHC por RT-PCR	57
Detección y amplificación del genoma del VHC por RT - PCR en tiempo real (RT - qPCR)	60
Construcción de un control interno basado en la región 5'UTR de VHC	61
Análisis de secuencias y análisis filogenéticos del VHC	62
Análisis de recombinación	64
Análisis estadístico	64
Resultados	65
Discusión	82
Conclusiones	93
Perspectivas	95
Referencias	96
Material Suplementario	111

Lista de Tablas

Tabla 1. Función de las proteínas del VHC.....	17
Tabla 2. Tratamiento combinado de AAD para la infección por VHC.....	29
Tabla 3. Mutaciones asociadas a resistencia a los AAD.....	30
Tabla 4. Mecanismos de persistencia viral.....	33
Tabla 5. Caracterización de genotipos y subgenotipos del VHC.....	37
Tabla 6. Estudios de prevalencia de la infección por VHC en Colombia.....	48
Tabla 7. Oligonucleótidos para la detección de VHC por PCR	59
Tabla 8. Características demográficas y principales factores de riesgo en pacientes con historia transfusional antes de 1996	65
Tabla 9. Características demográficas y marcadores de infección por VHC en individuos transfundidos antes de 1996	66
Tabla 10. Valores de CT de la detección del genoma de VHC por qPCR	69
Tabla 11. Características demográficas y marcadores de infección por VHC del grupo control positivo.....	70
Tabla 12. Características demográficas y marcadores de infección por VHC en pacientes con diagnóstico de hepatopatías terminales.....	70
Tabla 13. Características de grupos de riesgo a la infección por VHC	85

Lista de Figuras

Figura 1. Organización genómica del VHC.....	18
Figura 2. Ciclo de replicación del VHC	25
Figura 3. Algoritmo de diagnóstico para la infección por VHC.....	27
Figura 4. Casos reportados de VHC por departamento entre 2016 - 2020	41
Figura 5. Esquema representativo de la construcción del control interno de VHC	62
Figura 6. Detección del genoma de VHC por RT-PCR en muestras de suero de personas con historia transfusional antes de 1996	68
Figura 7. Detección del genoma de VHC por qPCR.....	68
Figura 8. Construcción del control interno para amplificación de la región 5'UTR del genoma viral.....	71
Figura 9. Liberación de un fragmento de DENV usando las enzimas de restricción SacI y KpnI	72
Figura 10. Verificación del constructo pBluescript-VHC mediante PCR	73
Figura 11. Árbol filogenético usando la región 5'UTR del VHC	75
Figura 12. Árbol filogenético usando la región NS5B del VHC	77
Figura 13. Árbol filogenético usando la región NS5B del VHC para subgenotipos del genotipo 4.....	78
Figura 14. Análisis de secuencias de aminoácidos para la identificación de RAS en el genoma de VHC	81

Siglas, acrónimos y abreviaturas

VHC – Virus de la Hepatitis C

OMS – Organización Mundial de la Salud

INS – Instituto Nacional de Salud

GLOBOCAN – Observatorio Global de Cáncer

ORF – Open Reading Frame

ARFP – Alternative Reading Frame Protein

UTR – Untranslated Region

IRES – Sitio de entrada interno al ribosoma

SL – Stem Loop

ISDR – Interferon Sensitivity Determining Region

RdRp – Polimerasa de ARN dependiente de ARN

LDL – Low-Density Lipoproteins

VLDL – Very-Low-Density Lipoproteins

AAD – Antivirales de Acción Directa

ICTV – Comité Internacional de Taxonomía Viral

CDC – Centro de Análisis de Enfermedades

RFLP – Patrón de Enzimas de Restricción

ViPR – Virus Pathogen Database and Analysis Resource

PID – Personas que se inyectan

RAS – Resistance Associated Substitutions

RESUMEN

Objetivo:

Caracterizar molecularmente la infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC) en personas con historia de transfusión antes de 1996 en tres ciudades de Colombia.

Métodos:

Se realizó una búsqueda activa de personas que hubieran recibido al menos un evento transfusional antes de 1996 en tres ciudades principales de Colombia: Medellín, Pereira y Santa Marta. Se calculó un tamaño de muestra de 393 personas de acuerdo al total de pacientes transfundidos y la población DANE para 2016: 293 personas para Medellín, 43 personas para Pereira y 57 personas para Santa Marta. Esta búsqueda activa se realizó mediante charlas de promoción y prevención de las hepatitis virales, con énfasis en VHC, además de la divulgación de material en redes sociales, prensa, radio y televisión. A cada persona que decidió participar voluntariamente en el estudio se le diligenció una encuesta y se le tomó una muestra de sangre para la detección de anticuerpos anti-VHC y posterior detección del genoma, en caso de ser positivos para anticuerpos. Las muestras positivas para el genoma viral se enviaron a secuenciar para la caracterización de genotipos y subgenotipos y mutaciones asociadas a resistencia a los antivirales disponibles. Se incluyó un grupo control positivo (personas con diagnóstico previo de VHC) y muestras de explante hepático del banco de tejidos del Grupo de Gastrohepatología de la Universidad de Antioquia para la inferencia filogenética.

Resultados:

En total se reclutaron 260 personas con historia de transfusión de sangre antes de 1996: 159 personas en Medellín, 43 en Pereira y 57 en Santa Marta. El 2,6% (7/260) de las muestras obtenidas de la población de estudio presentaron positividad para la detección de anticuerpos anti-VHC y se logró la amplificación del genoma viral en 4 de las 7 muestras positivas para anticuerpos. Con respecto al grupo control positivo, se incluyeron tres muestras de pacientes con infección por VHC, y 16 muestras de explante hepático, de las cuales se logró la amplificación del genoma viral.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

A partir de las muestras de la población de estudio se caracterizó el genotipo 1, subgenotipo 1b, en 3 de las muestras y también se identificó el genotipo 4, en una de las muestras, y por primera vez en el país el subgenotipo 4d. En las muestras del grupo control positivo se identificó el genotipo 1, subgenotipo 1b, en una de las muestras y el subgenotipo 1a en las dos muestras de PID. El predominio del genotipo 1, subgenotipo 1b, fue ratificado en las muestras de explante hepático, con 61,5% (8 muestras), el subgenotipo 1a en 23% (3 muestras). Adicionalmente se caracterizó el genotipo, subgenotipo 2a, y el genotipo 4 en dos muestras de explante hepático. En esta última muestra se identificó por primera vez el subgenotipo 4a en el país.

Por último, se describe la presencia de RAS en dos muestras de personas con antecedente transfusional, pero sin tratamiento antiviral previo y en 6 muestras de explante hepático proveniente de pacientes con diagnóstico de hepatopatías terminales. Este resultado es el primer reporte de RAS en Colombia.

Conclusiones:

Se confirma que el genotipo 1 de VHC, subgenotipo 1b, sigue siendo el prevalente en el país, independiente del factor de riesgo. Se reporta por primera vez la identificación de los subgenotipos 4a y 4d y la presencia de mutaciones asociadas a resistencia para las regiones virales NS5A y NS5B en muestras de pacientes en Colombia.

A pesar de la baja frecuencia de anticuerpos anti-VHC detectada en la población de estudio, se demuestra la importancia de la búsqueda activa de personas con factores de riesgo para el diagnóstico y tratamiento para evitar el desarrollo de hepatopatías terminales. Así mismo, para contribuir al estudio de la epidemiología molecular de la infección por VHC para la toma de decisiones que permitan contribuir al control y eliminación de la infección por VHC.

Palabras clave: Virus de la hepatitis C, Epidemiología, prevalencia, factor de riesgo, Colombia

Abstract

Aim:

Characterize the infection by the Hepatitis C Virus (HCV) in people with a transfusion history before 1996 in three cities of Colombia

Methods:

An active search was carried out for people who had received at least one transfusion event before 1996 in three main cities of Colombia: Medellín, Pereira, and Santa Marta. A sample size of 393 people was calculated according to the total number of transfused patients and the DANE population for 2016: 293 people for Medellín, 43 people for Pereira, and 57 people for Santa Marta. This active search was carried out through talks on the promotion and prevention of viral hepatitis, with an emphasis on HCV, in addition to the dissemination of graphic material on social networks, the press, radio, and television. A survey was completed from each person who voluntarily decided to participate in the study. A blood sample was taken to detect anti-HCV antibodies and subsequent detection of the genome, if positive for antibodies. The samples positive for the viral genome were sent for sequencing for the characterization of genotypes and subgenotypes and mutations associated with resistance to available antivirals. A positive control group (people with a previous diagnosis of HCV) and liver explant samples from the tissue bank of the Gastrohepatology Group of the University of Antioquia were included for phylogenetic inference.

Results:

260 people with a history of blood transfusion before 1996 were recruited: 159 people in Medellín, 43 in Pereira, and 57 in Santa Marta. 2.6% (7/260) of the samples obtained from the study population were positive for the detection of anti-HCV antibodies and amplification of the viral genome was obtained in 4 of the 7 antibody-positive samples. Regarding the positive control group, three samples from patients with HCV infection were included, and 16 samples from liver explants, of which the viral genome was amplified.

From the samples of the study population, genotype 1, subgenotype 1b, was characterized in 3 of the samples, and genotype 4 was also identified in one of the samples, and for the first time in the country, subgenotype 4d. In the positive control group samples, genotype 1, subgenotype 1b, was identified in one of the samples and subgenotype 1a in the two PID samples. The predominance of genotype 1, subgenotype 1b, was ratified in liver explant samples, with 61.5% (8 samples), subgenotype 1a in 23% (3 samples). Additionally, the genotype, subgenotype 2a, and genotype 4 were characterized in two liver explant samples. In this last sample, subgenotype 4a was identified for the first time in the country.

Finally, the presence of RAS is described in two samples from people with a transfusion history, but without prior antiviral treatment, and in 6 liver explant samples from patients with a diagnosis of end-stage liver disease. This result is the first RAS report in Colombia.

Conclusions:

It is confirmed that HCV genotype 1, subgenotype 1b, continues to be prevalent in the country, regardless of the risk factor. The identification of subgenotypes 4a and 4d and the presence of resistance-associated mutations for the viral regions NS5A and NS5B in samples from patients in Colombia is reported for the first time.

Despite the low frequency of anti-HCV antibodies detected in the study population, the importance of actively searching for people with risk factors for diagnosis and treatment to avoid the development of end-stage liver disease is demonstrated. Additionally, to contribute to the study of the molecular epidemiology of HCV infection for decision-making that will contribute to the control and elimination of HCV infection.

Key words: Hepatitis C Virus, Epidemiology, Prevalence, Risk Factor, Colombia

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2010 incluyó las hepatitis virales como una prioridad en los planes de salud pública, teniendo en cuenta el peso de la enfermedad en términos de mortalidad y morbilidad (1). La Asamblea Mundial de la Salud en 2010, estableció que todos los países debían implementar o mejorar los planes de vigilancia epidemiológica y la capacidad diagnóstica de la infección por los virus de las hepatitis (resolución 63.18) (2,3). En 2014, se reiteró el llamado a todos los países buscando reforzar las estrategias de inmunización para la prevención (resolución 67.6) (3,4). Finalmente, en 2016, se presentó la estrategia global del sector salud encaminada a la meta de reducción del 65% de la mortalidad asociada a los virus de las hepatitis para el año 2030 y la reducción del 90% en la incidencia. Esta estrategia se fundamenta en el tamizaje de las unidades de sangre, la notificación obligatoria de los casos y registro de casos de cirrosis y carcinoma hepatocelular, el fortalecimiento de los sistemas de diagnóstico, tratamiento y la disponibilidad de tratamiento antiviral (5). La OMS, en su último reporte, estima que existen alrededor de 185 millones de personas con infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC), 71 millones con Hepatitis C crónica y alrededor de 400.000 muertes a causa de esta enfermedad (1).

El VHC es agente causal de infección aguda e infección crónica. La infección transitoria corresponde a los casos con aclaramiento viral espontáneo que se presenta en 15 al 45% de los individuos infectados. Mientras que la infección crónica se desarrolla entre el 60 a 85% de los casos, la cual está asociada al desarrollo de hepatopatías terminales dos a tres décadas después de haber adquirido la infección, por lo que se considera la infección por VHC como uno de los factores de riesgo del cáncer primario de hígado (1,6). El cáncer primario de hígado es el séptimo cáncer más frecuente a nivel mundial y es considerado como la segunda causa de muerte por neoplasia. El carcinoma hepatocelular es el tipo de cáncer primario de hígado dominante, al cual se le atribuyen el 75% de los casos a nivel mundial (6,7). La incidencia global del cáncer primario de hígado es de 9,3 por 100.000 habitantes con una mortalidad reportada para 2018 de 782.000 muertes (6,8,9). En el año 2012 el Observatorio Global de Cáncer (por su siglas en inglés GLOBOCAN) determinó que es la segunda causa más común de muerte por cáncer en el mundo con

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

alrededor de 746.000 muertes (9,1 % del total de muertes; tasa de mortalidad: 9,5/100.000 habitantes) (10). Específicamente para Colombia, el GLOBOCAN reporta que el cáncer primario de hígado se encuentra en la posición 15 en términos de incidencia. Para el año 2020, se reportaron 2289 casos nuevos, sin embargo en términos de mortalidad el cáncer primario de hígado en la población colombiana ocupa el noveno lugar con 2220 muertes reportadas para el mismo año (11).

Como se anotó anteriormente la infección crónica por VHC es uno de los factores de riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular (CHC). El 90% de los casos de CHC es precedido por el desarrollo de cirrosis hepática, demostrando que el VHC tiene la capacidad de inducir daño repetitivo e inflamación persistente hasta ocasionar fibrosis, cirrosis, y finalmente carcinoma hepatocelular, en la mayoría de los casos sin ocasionar ningún tipo de síntoma, excepto en etapas muy avanzadas de la enfermedad (6,12,13).

Con el desarrollo de antivirales de acción directa (AAD) se suplió la necesidad de tratamientos efectivos para la infección por VHC, permitiendo la curación de la infección en más del 95% de los casos (14). Los tratamientos disponibles con AAD pueden prevenir el desarrollo de enfermedad hepática si se administran en fases tempranas de la infección crónica. Si la enfermedad se encuentra en una fase avanzada, es decir cirrosis hepática clasificada en segunda escala del sistema Child-Pugh, el tratamiento no previene el desarrollo de carcinoma (6). Como parte de la estrategia de eliminación de las hepatitis virales, se busca que todas las personas con infección por VHC puedan acceder a este tratamiento en fases tempranas de la enfermedad; no obstante, la ausencia de síntomas en las personas infectadas complica este objetivo por lo que es necesario realizar una búsqueda activa de personas con factores de riesgo.

Es de anotar que las transfusiones de sangre antes de 1993 son consideradas como uno de los principales factores de riesgo para adquirir la infección por VHC, debido a la falta de reglamentación en esa época para el tamizaje de las unidades de sangre. En el decreto 1571 de 1993, se reglamentan las actividades relacionadas con obtención, donación, procesamiento, almacenamiento, transfusiones y suministro de sangre humana y hemoderivados; además se apoya la creación de bancos de sangre y del Consejo Nacional de Banco de Sangre (15). Aunque la reglamentación data de 1993,

Infeción por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

solo hasta 1996 se logró una cobertura del 100% de las pruebas de tamizaje para VHC en los bancos de sangre del país (16).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó una búsqueda activa de personas con transfusión de sangre antes de 1996 en tres ciudades de Colombia. Los resultados permitieron demostrar la presencia de los genotipos 1a, 1b y 4d en personas con este factor de riesgo. Se identificó la misma distribución de genotipos propuesta por otros autores en estudios anteriores, pero por primera vez en Colombia, se identificó el subgenotipo del genotipo 4. Este estudio es el primer análisis que reporta secuencias colombianas de la región NS5A en las bases de datos.

Marco teórico

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado en 1989 como un nuevo agente de hepatitis viral no A no B de transmisión parenteral mediante estudios realizados en modelo animal. Desde 1975 se reportaba un agente viral asociado a casos de hepatitis en personas con historia transfusional, el cual no se podía asociar ni con el Virus de la Hepatitis A ni B; no obstante, solo hasta 1989 se logró establecer una infección en modelo animal mediante la clonación y transcripción *in vitro* del genoma proveniente de sueros de pacientes infectados, ya que la inoculación directa del suero de los pacientes en los animales no reproducía la enfermedad (17).

Este descubrimiento representó un reto para la biología molecular de la época y permitió el fortalecimiento de esta área de la ciencia y el posterior desarrollo de los estuches comerciales disponibles para la detección de antígenos y anticuerpos virales. Uno de los impedimentos en la identificación de este virus fueron las limitaciones técnicas de métodos inmunológicos convencionales para la detección de anticuerpos. En este orden de ideas, Choo y colaboradores buscaron la creación de librerías de cADN a partir de sueros de pacientes infectados obteniendo resultados no concluyentes por bajas cargas virales en esos sueros; por lo que decidieron usar plasma de Chimpancés infectados con una mayor carga viral. Después de emplear técnicas de ultra centrifugación, Southern blot, tratamientos con DNAsas y RNAsas, síntesis de cADN, electroforesis, Western Blot y radioinmunoensayos se identificó un nuevo agente viral causal de hepatitis con un genoma ARN de cadena sencilla y sentido positivo de aproximadamente 10.000 nucleótidos y un único marco abierto de lectura (por sus siglas en inglés *Open Reading Frame, ORF*) (17). Otros estudios, identificaron la partícula viral, con envoltura lipídica, de aproximadamente 80 nm (18) asociándola con virus de familias como *Togaviridae*; sin embargo Choo y colaboradores hicieron la propuesta, de acuerdo a la organización del genoma, que coincide con la familia *Flaviridae* (17).

Generalidades del VHC

El VHC, renombrado recientemente como *Hepacivirus C*, fue clasificado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* (19). Este género fue creado inicialmente para la clasificación de este virus, en el que posteriormente se clasificaron otros virus que presentan similitudes con el VHC, como el virus GB tipo B más conocido como Pegivirus Humano y otros virus recientemente identificados de importancia veterinaria como Hepacivirus canino (CHV), Hepacivirus de roedores (RHV) y Hepacivirus de caballos domésticos (20–22). Actualmente este género no incluye los Pegivirus, únicamente los 14 *Hepacivirus*, clasificados desde la A – N (23).

El VHC es un virus envuelto, de simetría icosaédrica, de 40-65 nm. Contiene un genoma de ARN lineal, de cadena sencilla y polaridad positiva de 9,6 Kb, el cual posee un único ORF que codifica una poliproteína de 3000 aminoácidos aproximadamente. Esta poliproteína sufre modificaciones co y post – traduccionales por proteasas celulares y virales para dar lugar a las tres proteínas estructurales: Core, E1 y E2 y siete proteínas no estructurales: P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (24–33) (**Tabla 1 – Figura 1**).

Tabla 1. Función de las proteínas del VHC

Proteína	Función
Core	Subunidad estructural de la cápside viral
E1	Glicoproteína de la envoltura
E2	Glicoproteína implicada en la unión al receptor
P7	Formación de canales iónicos – viroporina
NS2	Autoproteasa, ensamblaje
NS3	Proteasa y helicasa
NS4A	Cofactor NS3
NS4B	Formación de “ <i>membranous web</i> ”
NS5A	Complejo de replicación, ensamblaje
NS5B	Polimerasa dependiente de ARN

ARFP	Función desconocida
-------------	---------------------

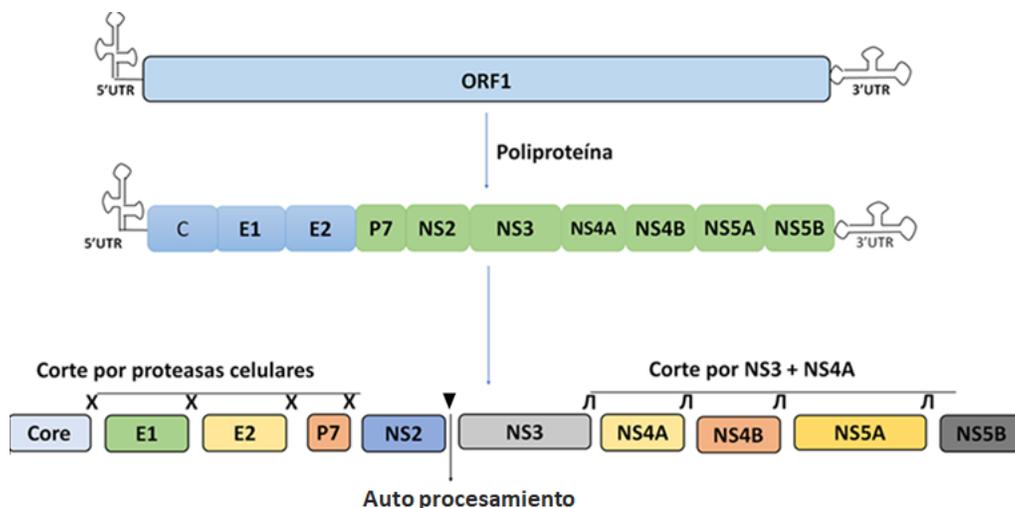


Figura 1. Organización genómica del VHC

El VHC contiene un único ORF que se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes: 5' y 3'UTR, estas regiones forman estructuras secundarias necesarias para la replicación viral. Así mismo este ORF codifica para 3 proteínas estructurales (C, E1 y E2) las cuales son procesadas por proteasas celulares, y 7 proteínas no estructurales (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), la proteína P7 al igual que las proteínas estructurales es procesada por proteasas celulares, NS2 tiene la función de autoproteasa que corta también a NS3 para permitir el corte de las demás proteínas no estructurales (NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).

Se ha propuesto una proteína adicional ARFP (por sus siglas en inglés *alternative reading frame protein*) la cual es sintetizada por un ORF alternativo que sobrelapa la secuencia codificante de Core. Tres mecanismos diferentes han sido propuestos para el origen de la proteína ARFP; el primero de ellos es debido a un cambio en el marco de lectura del ribosoma en la región rica en adeninas ubicada dentro de los codones centrales de Core, específicamente en el codón 10; sin embargo, otros autores han descrito una forma corta de esta proteína, sintetizada a partir de los codones 85 u 87 de Core. Estudios recientes indican que el codón 26 de Core es un candidato para la síntesis de esta proteína. Es importante mencionar que ninguno de estos codones corresponden al codón de inicio y que el tamaño de esta proteína varía: 17 KDa, 14,4 KDa y 8 KDa respectivamente, lo que sugiere diferentes conformaciones y mecanismos de acción (34–37).

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

En muestras de suero de pacientes se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-ARFP, lo que evidencia su síntesis durante la infección natural, aunque su función no es conocida; estos anticuerpos se han encontrado en mayor cantidad en pacientes con infección crónica (>50%), especialmente en pacientes con un estado avanzado de cirrosis, lo que sugiere una asociación entre la proteína ARFP y mecanismos patogénicos que llevan al desarrollo de carcinoma hepatocelular (37–39).

El genoma del VHC se encuentra delimitado por dos secuencias no codificantes altamente conservadas: 5' y 3' UTR (por sus siglas en inglés *Untranslated Region*). La región 5'UTR posee una estructura secundaria que contiene el sitio de entrada interna al ribosoma (por sus siglas en inglés *IRES*) esencial para la traducción del ARN viral. La región IRES, está compuesta por tres dominios tallo - bucle (SL por sus siglas en inglés *stem-loop*): SLII, SLIII, SLIV, los cuales permiten la interacción con la subunidad 40S del ribosoma y el factor de iniciación 3 (eIF3), lo que conlleva al ensamblaje del ribosoma con la subunidad 18S para dar inicio a la traducción de la poliproteína (27,40–43). La región 3'UTR posee una estructura secundaria con tres regiones SL: SL1, SL2, SL3, las cuales son reconocidas por la polimerasa viral para dar inicio a la replicación. En la región SL1 se encuentra la secuencia específica poli U/UC, que reconoce la polimerasa para su ubicación (24,41) (**Figura 1**).

Proteínas estructurales del VHC

Core

Es la primera proteína codificada por el ORF de VHC. Es la subunidad estructural de la cápside viral y está compuesta por tres dominios. El dominio I (aa1 - aa120) interactúa con el ARN viral para la formación de nuevos viriones. Este dominio se une al ARN por complementariedad de cargas; una vez el genoma viral se encuentra unido a Core, inicia el proceso de empaquetamiento del genoma. El dominio II (aa120 – aa177) posee una estructura hidrofóbica que permite la interacción con lípidos de la membrana del retículo endoplasmático (RE) y el autoensamblaje, este dominio también interactúa con gotas de lípidos para la formación de lipovirionpartículas. Una vez unida la proteína Core en la membrana del RE, esta sufre un proceso de clivaje por la proteasa celular SPP para dar origen a una proteína de membrana de 21 kDa. El dominio III (aa177 – aa191)

interacciona con la glicoproteína E1. Existe una secuencia señal entre Core y E1 permitiendo que la proteína Core sea traslocada a la membrana del RE, eso será una guía para que la proteína E1 se ubique en el lumen del RE (25–27) (**Tabla 1 y Figura 1**).

Core, además de ser la subunidad estructural de la cápside, interactúa con proteínas celulares del hospedero participando en varios mecanismos de la patogénesis viral, así como modular el sistema inmunológico del hospedero para establecer una infección persistente (**Tabla 2**).

E1 y E2

E1 (160 aa) y E2 (360 aa) son glicoproteínas transmembrana con un ectodominio en el extremo N-terminal que se ubica en el lumen del RE. En el extremo C-terminal poseen un dominio corto transmembrana. Estas proteínas forman heterodímeros como componente básico de la envoltura viral. Para su maduración deben pasar por procesos de glicosilación en el aparato de Golgi. La proteína E2 está implicada en la unión del virus a los receptores celulares y en la fusión de la envoltura viral. Además, E2 es blanco de anticuerpos neutralizantes con tres regiones hipervariables y un grado de diversidad entre 80-100% como respuesta a la presión de selección ejercida por los anticuerpos. Aún no es claro si E1 puede unirse a receptores celulares, sin embargo, se ha demostrado que favorece y potencia la unión de E2 a los receptores (27,44) (**Tabla 1 y Figura 1**).

Proteínas no estructurales del VHC

P7

La proteína P7 (63 aa) es una viroporina, compuesta por dos dominios transmembrana que permiten la formación de un canal iónico (27,28). Este canal está compuesto por dos hélices Alfa transmembrana que permite equilibrar el gradiente de pH y proteger las partículas virales de una prematura exposición a pH bajos que no permitan su maduración, además reconoce el paso de partículas virales ensambladas, proteínas y demás componentes necesarios para el ensamblaje. Esto ha permitido asociar a la proteína P7 con el ensamblaje y maduración de las partículas virales (27,45,46) (**Tabla 1 y Figura 1**).

NS2

NS2 (217 aa) es una autoproteasa con actividad catalítica en su extremo C-terminal, responsable del procesamiento de NS2/NS3; además participa en el ensamblaje de la partícula viral interactuando con E1-E2, NS3-NS4A (27,29) (**Tabla 1 y Figura 1**).

NS3/NS4A

NS3 es una proteasa de serina con función helicasa lo que la hace una proteína multifuncional, su dominio N-terminal (aa 1 - 180) posee actividad proteasa que procesa la poliproteína para dar origen a las proteínas no estructurales NS4A, NS4B, NS5A y NS5B; mientras que el dominio C-terminal (aa 181 - 631) tiene actividad helicasa que permite el desenrollamiento de las estructuras secundarias del ARN viral, así mismo permite estabilizar el ARN para la síntesis de las copias del genoma viral a partir del antígenoma; NS3 requiere la interacción de NS4A que es el cofactor (24,27) (**Tabla 1 y Figura 1**).

NS3/NS4A interviene en la respuesta inmune innata del hospedero, inhibiendo las vías de señalización del Gen-I inducible por ácido retinoico (RIG-I) y del receptor tipo Toll – 3 (TLR3) favoreciendo la patogénesis viral (**Tabla 2**). En consecuencia, a estas funciones, la proteína NS3 es blanco del tratamiento de AAD.

NS4B

NS4B (261 aa) es una proteína integral de membrana que induce la formación de un sistema de membranas (en inglés, *membranous web*) para dar origen al complejo de replicación dada la reorganización de la membrana del RE en vesículas. No se cuenta con mucha información acerca de la caracterización de esta proteína; a pesar de su importancia en la replicación, no obstante algunos autores proponen su participación en el ensamblaje de la partícula viral modulando las interacciones proteína – proteína mediante reorganizaciones en el complejo membranoso (27,30,47) (**Tabla 1**).

NS5A

NS5A es una fosfoproteína asociada a membrana (447 aa) que hace parte del complejo de replicación y participa en el ensamblaje de la partícula viral. Esta proteína se encuentra presente hipofosforilada (56 KDa) o hiperfosforilada (58 KDa) con función reguladora de la replicación. Se han descrito tres dominios para esta proteína, el dominio I es el dominio

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

más conservado con un sitio de fosforilación, un sitio de unión a gotas de lípidos para la formación de lipoviropartículas y un sitio de unión a la proteína lípido quinasa fosfoinositol-4 (PI4K) en la isoforma presente en el RE PI4KIII α para favorecer la producción de lípidos y la formación del complejo membranoso (32).

El dominio II contiene la región que determina la sensibilidad a interferón, ISDR (por sus siglas en inglés *interferon sensitivity determining region*); esta región se ha asociado con resistencia al tratamiento con interferón, especialmente en pacientes con infección por genotipo 1b del VHC. El mecanismo de resistencia estaría asociado a la capacidad de interacción de NS5A con la proteína quinasa R (PKR). Como mecanismo de acción antiviral, PKR se encarga de fosforilar el factor de iniciación de la traducción 2A (eIF2A) para inhibir el reclutamiento de la subunidad 80S del ribosoma, así NS5A al unirse a PKR impide su mecanismo de acción. NS5A se une a la Ciclofilina A inhibiendo la activación del factor de transcripción NFAT que está implicado en la respuesta de células inmunes al interferón (31,32,48). Este proceso no deja de ser controversial ya que otros autores describieron una correlación de sustituciones presentes en la región ISDR que favorecen una respuesta favorable a la terapia con interferón (49) (**Tabla 4**).

El dominio III contiene una región hipervariable, siendo una región del genoma en la que se ha reportado una alta variabilidad permitiendo eventos evolutivos como duplicación, recombinación y regiones variables asociadas a resistencia a los tratamientos disponibles (antivirales de acción directa) que podrían otorgarle una ventaja adaptativa en la patogénesis (32) (**Tabla 4 y Figura 1**).

La capacidad que tiene NS5A de interactuar con múltiples proteínas celulares favorece el establecimiento de una infección persistente y la hace una proteína blanco para el tratamiento mediante AAD (27,31,32).

NS5B

NS5B (591 aa) es una polimerasa de ARN dependiente de ARN (por sus siglas en inglés *RdRp – RNA-dependent RNA polymerase*), encargada de la síntesis del ARN de polaridad positiva y de la cadena complementaria de polaridad negativa. NS5B no posee capacidad correctora de errores, generando una tasa de error de 10^{-4} sustituciones por

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

nucleótido, por tal razón es la responsable de la alta variabilidad genética que presenta este virus (27,33) (**Tabla 1 y Figura 1**).

Replicación del VHC

El VHC se asocia con lipoproteínas de baja y muy baja densidad: LDL y VLDL, respectivamente (por sus siglas en inglés *low-density lipoproteins* y *very-low-density lipoproteins*) como una forma de evadir el reconocimiento del sistema inmunológico en el hospedero y facilitar la interacción con algunos receptores. Adicionalmente se ha demostrado que el virus puede circular como virión libre (50). Una vez el VHC encuentra su célula blanco debe ser reconocido por los receptores y correceptores para ingresar a la célula.

Luego de la adhesión, la partícula viral entra a la célula por endocitosis mediada por receptor. Como receptores se han identificado receptores de lipoproteínas LDL (LDLR), receptor Scavenger clase B tipo I (SCARBI o SR-BI) y la proteína CD81, también conocida como Tetraspanina, los cuales se unen a las proteínas E1-E2 (51–53). Estudios más recientes proponen a los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) como receptores de anclaje del VHC a la superficie celular de la célula blanco, permitiendo que el VHC sea reconocido por los receptores CD81, LDLR y SR-BI. Estos proteoglicanos (HPSG) presentan como proteína principal sindecanos (SDC) y están distribuidos desde SDC-1 hasta SDC-4. Se han propuesto como receptores de anclaje específicamente los SDC-1 y SDC-2 los cuales tienen la capacidad de unirse a las lipoproteínas (54). Como correceptores se han identificado las proteínas claudinas y ocludinas que permiten la entrada de la partícula viral al citosol. Estas proteínas son un componente de unión estrecha célula – célula que se encuentran expresadas en gran cantidad en los hepatocitos, esto permite que el VHC pueda pasar del citosol de un hepatocito a otro y establecer la infección rápidamente en el hígado (54,55).

Los hepatocitos son la principal célula blanco del VHC, sin embargo, se ha demostrado que el VHC puede infectar otras células como linfocitos B, células dendríticas y monocitos/macrófagos (56–59). De acuerdo a esto, se ha identificado que el VHC puede

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

unirse a receptores específicos de células dendríticas (DC-SIGN) y lectinas dependientes de calcio presentes en hígado y nódulos linfáticos (L-SIGN) (60).

Luego de la descapcidación, la traducción del genoma viral ocurre cuando la región IRES se une con eIF3 y la subunidad 40S del ribosoma como se describió previamente. El proceso de replicación se lleva a cabo en un complejo membranoso derivado de membranas del RE denominado *membranous web*, en donde la proteína NS4B induce cambios conformacionales en la membrana del RE formando vesículas de doble membrana que permiten la organización de las proteínas del complejo de replicación NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

La proteína NS5B reconoce diferentes estructuras secundarias denominadas regiones SL que se encuentran distribuidas a lo largo de la cadena complementaria del ARN viral. En el extremo 3'UTR se ubican las regiones SL1, SL2 y SL3 que son reconocidas por NS5B para iniciar la replicación del genoma viral. En la secuencia que codifica la proteína Core se encuentra la estructura secundaria SL87 la cual cumple función de promotor pero también permite la ubicación de la polimerasa para este proceso (40).

Los pasos finales del ciclo de replicación son el autoensamblaje de la cápside, empaquetamiento del genoma viral y la salida de las partículas virales. Estudios realizados en líneas celulares hepáticas demuestran que el VHC tiene la capacidad de regular el metabolismo lipídico, permitiendo la formación de vesículas lipídicas de doble membrana (DMVs) también conocidas como gotas lipídicas o *lipid droplets* (40,50,60). Estas gotas lipídicas se acumulan en el RE, así la proteína Core – dominio II y NS5A se asocian con gotas de lípidos para la formación de las lipovirionpartículas. Los dominios I y III de Core se asocian con el ARN naciente, siendo el dominio I más importante por la complementariedad de cargas. Posteriormente Core se une con las proteínas E1-E2 y mediante las gotas de lípidos y la membrana del RE forman la lipovirionpartícula para ser liberada al ambiente celular del hospedero (61). Esta liberación se da mediante la formación de endosomas que con ayuda del complejo proteico ESCRT (complejos de clasificación endosomal necesarios para el transporte) permite el tráfico por el citoplasma hacia el ambiente extracelular (46) (**Figura 2**).

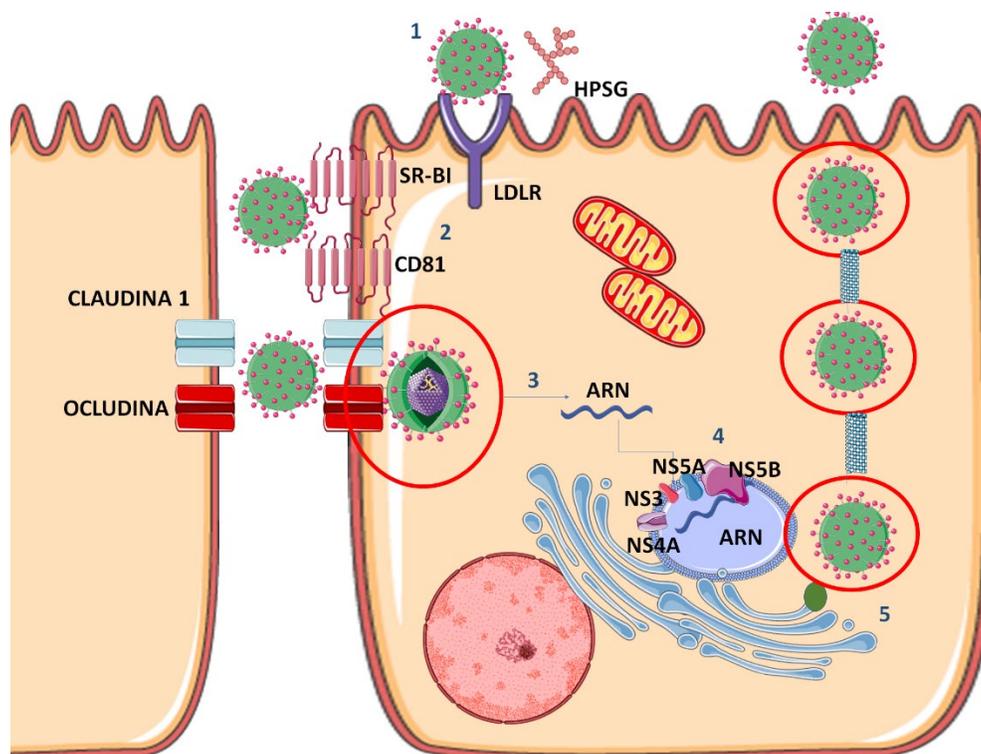


Figura 2. Ciclo de replicación del VHC.

1. Unión del virus a los receptores de anclaje de HPSG. 2. Reconocimiento del virus por parte de los receptores (LDLR, SRBI, CD81) y correceptores (Claudina y ocludina) para su ingreso a la célula por endocitosis. 3. Descapcidación y liberación del ARN viral. 4. Traducción de la poliproteína y replicación del genoma. 5. Autoensamblaje y liberación por endosomas. Diseño adaptado y modificado de Manns, et al. 2017 y Chigbu, et al. 2019.

Perfil clínico y diagnóstico de la infección por VHC

El VHC puede producir tanto infección aguda como infección crónica (**Figura 3**). En la mayoría de los casos la infección transcurre sin síntomas; pero los pacientes sintomáticos pueden presentar ictericia, fatiga, dolor abdominal y artralgia. El virus persiste en más del 80% de los pacientes lo que conduce a una infección crónica que puede evolucionar a cirrosis y/o carcinoma hepatocelular (24,62). La infección crónica constituye un proceso clínicamente silencioso. Se caracteriza por ser un proceso inflamatorio crónico que evoluciona a fibrosis hepática (12) y cirrosis (63). En esta progresión de la enfermedad también interfieren factores como la edad del paciente, el género, el consumo de alcohol

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

y coinfección con otros virus como el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (24).

Una infección aguda difícilmente se puede identificar debido a que generalmente es asintomática, por esta razón, se recomienda como método de preferencia, la detección del ARN viral en suero, puesto que es detectable a partir de la primera o segunda semana de infección luego del periodo de incubación, mientras que los anticuerpos anti-VHC son detectables cuatro a seis semanas después (64,65). La infección crónica se define como la persistencia del genoma viral después de seis meses del diagnóstico inicial; adicionalmente los anticuerpos totales anti-VHC permanecen detectables en los pacientes que hayan desarrollado este tipo de infección (24).

La detección de anticuerpos contra péptidos del VHC y la medición del ARN viral, son las principales herramientas para el diagnóstico de VHC. Existen métodos cualitativos y cuantitativos que permiten la detección del ARN del VHC en plasma o suero tales como: RT-PCR y RT-PCR en tiempo real (66). Así también, la detección del antígeno Core confirma la presencia del virus y su replicación (67).

Varias generaciones de inmunoensayos han sido desarrolladas. Actualmente los ensayos de tercera generación están dirigidos a las proteínas Core, NS3, NS4 y NS5 y tienen una sensibilidad del 97%, lo que permite la detección de anticuerpos del VHC en un periodo de ventana entre 6 a 8 semanas luego de la exposición al virus. Es importante aclarar que estos anticuerpos demuestran la exposición previa más no inmunidad o infección persistente. Para ello es necesario realizar la detección y cuantificación del ARN viral por los métodos mencionados anteriormente (68–70).

Adicionalmente, las pruebas rápidas en sangre capilar extraída con lanceta permiten la detección de anticuerpos y el resultado puede ser conocido inmediatamente. Estas pruebas tienen una sensibilidad y especificidad superior del 98% (71).

Como complemento al diagnóstico de infección por VHC, la determinación del genotipo viral solía ser de importancia para la definición del esquema de tratamiento basado en interferón, ya que, dependiendo del genotipo, se podía predecir la respuesta al tratamiento (72–74). Sin embargo, con el desarrollo y uso de los nuevos antivirales de

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

acción directa (AAD), este paso puede omitirse pues se cuenta con medicamentos pangénóticos (75,76). No obstante, la genotipificación sigue siendo de utilidad en otros contextos como por ejemplo estudios filogenéticos (77), para determinar el genotipo y el subgenotipo, el método de referencia usado es la secuenciación de las regiones del genoma viral que codifican para la proteína NS5B y 5'UTR (78,79).

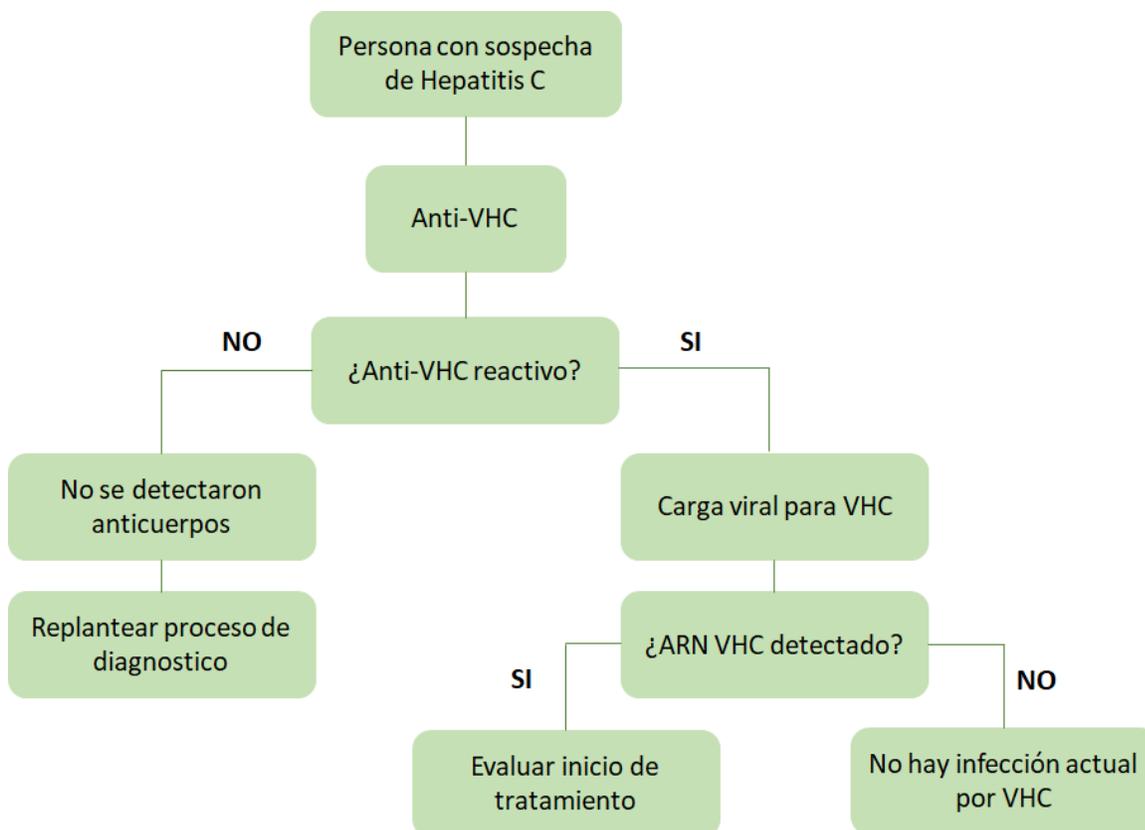


Figura 3. Algoritmo de diagnóstico para la infección por VHC

Construido siguiendo las recomendaciones de la guía de práctica clínica para la tamización, diagnóstico y tratamiento de personas con infección por el VHC – Ministerio de Salud y Protección Social, Colombia. 2018

Tratamiento del VHC

El principal objetivo del tratamiento contra el VHC es alcanzar la respuesta virológica sostenida (RVS), definida como la ausencia de ARN viral en sangre luego de 12 semanas de terminado el tratamiento (RVS12) lo que podría ser un marcador de terapia exitosa; así como también evitar complicaciones asociadas a la infección crónica.

El tratamiento contra el VHC ha cambiado considerablemente en las últimas décadas. Al inicio de los noventa los pacientes eran tratados con interferón (IFN) con una respuesta viral sostenida entre el 15% al 20% y una gran carga de efectos secundarios como fatiga, depresión, impacto cognitivo y específicamente con el IFN alfa supresión de médula ósea con manifestaciones como anemia y trombocitopenia (80). En 1998 la inclusión de ribavirina logró elevar la respuesta a un 40%; sin embargo, efectos adversos tales como síntomas psiquiátricos y anemia persistían. Lo anterior, no permitía que pacientes en grupos de riesgo con enfermedades psiquiátrica, cardiovascular e infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pudieran acceder al tratamiento (81). A principios del año 2000, la terapia combinada de IFN pegilado (pegIFN) con ribavirina incrementó el éxito del tratamiento al 50% (82). En 2011 se empezaron a implementar los primeros AAD. En este año al esquema de terapia combinada se le agregó el uso de un inhibidor de proteasa (NS3) que elevó la tasa de respuesta favorable a un 70% (83). Para el año 2014, las terapias libres de interferón con AAD evitaban la replicación del virus y permitieron alcanzar tasas de curación superiores al 90% y un perfil de efectos adversos mucho más bajo (84,85).

Existe un amplio número de AAD para el tratamiento de la infección por VHC. Entre los AAD, se encuentran los inhibidores de proteasa con el sufijo “previr” que tienen como objetivo suprimir la actividad de la NS3/NS4A serin-proteasa; los inhibidores nucleós(t)idos y no nucleósidos de la polimerasa NS5B con el sufijo “buvir”, que actúan al incorporarse en la fase de elongación interrumpiendo la misma y hasta ahora el único inhibidor no nucleósido aprobado para el tratamiento es dasabuvir; por último, los inhibidores de la proteína NS5A con el sufijo “asvir”, que suprimen la replicación y ensamblaje de la partícula viral.

Actualmente todos los esquemas de tratamiento para la infección por VHC consisten en dosis fijas de AAD sin el uso de IFN según las recomendaciones de la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD) y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) (86,87). Sin embargo, algunos regímenes incluyen ribavirina en poblaciones difíciles de tratar. Los principales regímenes de tratamiento se exponen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Tratamiento combinado de AAD para la infección por VHC

Régimen	Tratamiento AAD
1	Daclatasvir + Asunaprevir
2	Daclatasvir + Sofosbuvir + Ribavirina
3	Ledipasvir + Sofosbuvir
4	Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir + Dasabuvir + Ribavirina
5	Simeprevir + Sofosbuvir
6	Sofosbuvir + Ribavirina
7	Elbasvir + Grazoprevir
8	Glecaprevir + Pibrentasvir
9	Sofosbuvir + Velpatasvir

Mutaciones asociadas a resistencia a los AAD

El desarrollo de mutaciones o sustituciones asociadas a resistencia a los AAD (RAS por sus siglas en inglés) depende de la tasa de mutación del virus ($\sim 2,5 \times 10^{-5}$) y la alta tasa de replicación ($\sim 10^{12}$ viriones producidos diariamente por una persona infectada), la cual junto a la carencia de actividad correctora de la polimerasa viral permite la generación de poblaciones virales heterogéneas con variantes genéticas que son sometidas a presiones de selección en el hospedero. Es importante monitorear la emergencia de variantes de resistencia a los AAD, cuáles y cuántas mutaciones son necesarias para la adquisición del fenotipo de resistencia y cuál es la estabilidad de estas en el hospedero. Por último es necesario establecer si el desarrollo de estas mutaciones depende de la exposición a concentraciones subóptimas de los agentes antivirales que favorezca una selección positiva de estas variantes (14,88).

Diferentes RAS se han reportado en NS3, NS5A y NS5B que podrían contribuir a una falla en el tratamiento con AAD.

Las mutaciones más frecuentes para cada región del genoma viral se presentan en la **Tabla 3.**

Tabla 3. Mutaciones asociadas a resistencia a los AAD

Región del Genoma Viral	RAS	Mecanismo de acción
	R155K	Induce un cambio conformacional que no permite la interacción del fármaco con la proteína
NS3	D168A, D168N, Q80K, V36A/M, T54A/S, R155K/T, A156S/T, S122R	Desconocido
	M/L28T/V, Q/L30E/H/R/S, L31M/V H58D Y93C/H/N	Cambios puntuales que disminuyen la afinidad del fármaco a la secuencia genómica
NS5A	K24G/R/N, F28S, M28A/G/T/V, A30K, L30H/R, P32L/S, S38F, T58A/N/S, A92K/T, C92R	Desconocido
	S282T, M289L	Disminuye la eficiencia de la replicación
NS5B	M414T/L, S556G, A421V, P495L/S, L314H, C316H/Y/N, L320F, S368T, N411S, E446K/Q, Y448C/H, A553T/V, G554S, S556G/R, G558R, D559G, Y551H, M423I, C445F, I482L, V494A y V499A	Impedimento alostérico

Las mutaciones asociadas a resistencia a los tratamientos dirigidos contra NS5A se han asociado con cambios en el dominio I de la proteína, sin embargo, su mecanismo de acción exacto aún no es claro. Las mutaciones reportadas M/L28T/V se han encontrado de manera frecuente en pacientes en tratamiento con infección por genotipo 1a previo al tratamiento con AAD, por otro lado, Y93C/H/N se encuentra con mayor frecuencia en

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

pacientes infectados con genotipo 1b (~10%) y genotipo 3 (8-10%) y muy poco frecuente en genotipo 1a (<1%) (88–90)

Se ha demostrado la presencia en baja proporción (0,1 – 3,1%) de estas mutaciones de manera basal antes de iniciar el tratamiento antiviral dirigido a NS3 y NS5A. Una vez los pacientes inician el tratamiento, estas mutaciones son seleccionadas de manera positiva para interferir con el mecanismo de acción y aumentan su proporción (95%) (91,92).

Un estudio realizado en 322 pacientes en Osaka pretendía examinar la doble sustitución L31M/V – Y93H para determinar el origen por medio de metodologías como secuenciación de nueva generación y análisis filogenéticos. Es de aclarar que esta sustitución ha sido de las primeras RAS reportadas en la literatura con acción inhibitoria para AAD dirigidos a NS5A. Se demostró que la proporción de esta doble sustitución varía de 0.1% - 38,9% en estos pacientes antes de iniciar el tratamiento con Ledipasvir y Asunaprevir; sin embargo, esta proporción aumentó en algunos pacientes que no respondieron al tratamiento hasta un 99,4%. Los análisis filogenéticos demuestran que la doble sustitución es preexistente y puede llevar a la falla al tratamiento. Para comprobar esta hipótesis, los autores simularon la infección por VHC, infectando un ratón quimérico con hepatocitos humanos, demostrando una baja proporción (4%) de estas mutaciones al inicio del tratamiento antiviral, pasadas 26 semanas post tratamiento esta frecuencia aumentó hasta un 98,6%, demostrando que estas sustituciones surgen en respuesta a la presión del tratamiento (92).

Con respecto a algunas mutaciones presentes en NS5B, se ha demostrado que no interfieren con la respuesta al tratamiento antiviral. Un estudio realizado en 1645 pacientes en Estados Unidos demostró que la presencia de la mutación S282T no es un impedimento para la respuesta al tratamiento, se observa una disminución en la eficiencia de la polimerasa y por ende de la replicación (88). Así mismo otro estudio realizado en 1145 pacientes del centro de África demuestra que la presencia de las mutaciones M414L, M423I, C316N, A421V, C445 F, I482L, V494A y V499A únicamente disminuye la potencia del fármaco uniéndose a la polimerasa (93).

Patogénesis del VHC

El VHC tiene la capacidad de establecer una infección crónica en 60 – 85% de los individuos infectados. Al establecer una infección crónica se genera una respuesta inflamatoria crónica, la cual puede progresar a cirrosis y/o carcinoma hepatocelular ya que el virus tiene la capacidad de interactuar con diferentes proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y en generar estrés oxidativo en la célula (24). Además de la infección de los hepatocitos, principal célula blanco, se ha demostrado la infección en linfocitos B, monocitos/macrófagos y células dendríticas las cuales se asocian con patologías extrahepáticas como el Linfoma No Hodgkin y crioglobulinemia (58,59).

El VHC posee diferentes estrategias para evadir la respuesta inmune y establecer la infección crónica, entre ellas se encuentran: la formación de lipovirionpartículas mediante la interacción con lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL). NS5A posee la capacidad de inhibir la proteína quinasa dependiente de ARN implicada en el control de la síntesis de proteínas como se describió previamente y NS3 tiene la capacidad de inhibir la producción de interferón beta mediante la degradación de la proteína TRIF implicada en la vía del Factor Regulatorio de Interferón 3 (IRF-3) y la degradación de la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) implicada en la vía de señalización de RIG-I. La proteína core tiene la capacidad de bloquear la vía de señalización STAT para la producción de interferón. Adicional a los mecanismos mencionados, la infección persistente produce un agotamiento de linfocitos T efectoras que impide la destrucción de los hepatocitos infectados (94–96) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Mecanismos de persistencia viral

Tabla 4. Mecanismos de persistencia viral

Estrategia o proteína viral asociada	Proceso	Mecanismo efector	Referencia
Lipoviropartículas	Evasión del reconocimiento por parte del sistema inmune	Interacción con lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (vLDL)	Manns et al. 2017
Proteína Core	Inhibición de la transcripción de genes estimulados por interferón (ISGs)	Interacción con la proteína STAT1 inhibiendo la interacción con el factor estimulador de interferón 3 (ISGF3)	Bode et al. 2007 - Bode et al. 2003
	Tolerancia inmunológica. Deficiencia en la proliferación de células T e inhibición de diferenciación a respuesta Th1	Interacción con el dominio globular del receptor C1q en células dendríticas para suprimir la producción de IL-2 e IL-12	Waggoner et al. 2007 - Kittlesen et al. 2000
	Supresión respuesta citotóxica de células NK	Incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en las células infectadas impidiendo el reconocimiento por las células NK	Herzer et al. 2007
Proteínas Core y E1	Inhibición en la activación de Linfocitos T	Inhibición de la maduración de células dendríticas	Lasarte et al. 2002
Proteínas Core y E2	Regulación de apoptosis	Inhibición de la proteína cFLIP implicada en la vía apoptótica dependiente de TNF alfa. Inhibición de la liberación de citocromo C desde la mitocondria	Lee et al. 2005
Proteína E2	Respuesta disminuida de células NK	Unión de E2 al receptor CD81 de las células NK, se asocia con disminución de la actividad citotóxica	Tseng et al. 2002

Estrategia o proteína viral asociada	Proceso involucrado	Mecanismo efector	Referencia
Proteínas NS3 y NS4A	Interferencia en la producción de Interferón tipo I	Degradación de la proteína TRIF y MAVS ocasionando un bloqueo en la vía de señalización de TLR-3 y RIG-I respectivamente.	Li et al. 2005 - Meylan et al.2005
Proteína NS5A	Inhibición del papel de la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR) Interacción con ciclofilina A para suprimir la respuesta inmunológica	Inhibición en la formación de dímeros de PKR necesarios para bloquear la traducción de la poliproteína viral Inhibición de la unión de ciclofilina A a calcio impidiendo la activación del factor de transcripción NFAT-1	Karamichali et al. 2014 Harris et al. 2015
Proteína NS5B	Alta variabilidad genética. Evasión del reconocimiento por parte del sistema inmune	Presencia de cuasiespecies debido a la incapacidad correctora de la polimerasa viral	Manns et al. 2017
Proteína E2	Región hipervariable 1. Evasión del reconocimiento por parte del sistema inmune	Fragmentos de 27 aminoácidos en la proteína E2 con alta variabilidad que impide el reconocimiento y la neutralización de los anticuerpos	Hairoishi et al. 2008 - Kato et al. 1994

Diversidad genética del VHC

La variabilidad genética del VHC se ha caracterizado en ocho genotipos (1-8) y 96 subgenotipos con divergencias nucleotídicas menores al 30% y entre el 15% - 25%, respectivamente (19).

La clasificación y el sistema de nomenclatura de virus del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV por sus siglas en inglés) para genotipos y subgenotipos del VHC se basa en tres características: i. la secuencia aislada debe contener una o más regiones codificantes completas, ii. al menos tres casos que no coincidan con los genotipos y/o subgenotipos reportados hasta el momento y iii. para el caso de los subgenotipos, un grupo filogenético al que pertenezca, teniendo en cuenta que para VHC no supere el 25% de diferenciación nucleotídica (79). Gracias a técnicas de secuenciación de nueva generación se demuestra que el genotipo 6 es el genotipo con mayor número de subgenotipos caracterizados (79), tal lo demuestra, un estudio realizado en Vietnam, en el que se aislaron 282 secuencias con variantes diferentes para el genotipo 6 del VHC, variantes que no pudieron ser caracterizadas por el método de sanger pero si por métodos de nueva secuenciación (97).

Diferentes técnicas moleculares han sido desarrolladas históricamente para la detección de genotipos y subgenotipos del VHC; como lo son el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (98), amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) mediante la hibridación con sondas específicas para cada genotipo y algunos subgenotipos (99), y metodologías de secuenciación que se analizan mediante estrategias filogenéticas. Es de anotar que las regiones del genoma viral que se han reportado para la identificación de genotipos y subgenotipos son 5'UTR, Core-E1, NS3 y NS5B, así como la amplificación del genoma completo del VHC (100–102).

Estudios de genotipificación del VHC por comparación de secuencias de las diferentes regiones mencionadas, demuestra que solo algunas regiones permiten la identificación confiable de genotipos y subgenotipos, debido al grado de variabilidad de la secuencia, es por esto, que las regiones Core-E1 y NS3 han sido descartadas debido a que son

Infeción por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

regiones del genoma que presentan alta variabilidad como un mecanismo de respuesta a la presión de selección ejercida por el hospedero (44,102).

La región 5'UTR ha sido de las más ampliamente utilizadas para la determinación de genotipos del VHC. Una de las ventajas es la existencia de variantes predominantes entre los genotipos que permiten su diferenciación, esto fue de gran ayuda para el diseño de las combinaciones de enzimas de restricción para la técnica de RFLP. Adicionalmente, esta región también es la región de elección para la detección y cuantificación del genoma del VHC debido a que es muy conservada entre todos los genotipos; este grado de conservación de la secuencia ha ocasionado problemas en la resolución de los análisis, especialmente en la diferenciación de los genotipos 1 y 6 ya que se ha observado la identificación de muestras con genotipo 6 por RFLP pero que por análisis filogenéticos agrupan en genotipo 1 (103). Es de anotar que esta región para la construcción de análisis filogenéticos también presenta limitaciones en la resolución. Es por esto que se han analizado otras regiones del genoma viral, demostrando que la región NS5B permite la resolución filogenética de todos los genotipos e incluso subgenotipos; al ser la polimerasa viral debe ser conservada entre todos los genotipos pero la secuencia de NS5B hacia el extremo 5' y que se encuentra adyacente a NS5A presenta un grado de variabilidad adecuado para la identificación de hasta subgenotipos (44,78,79,101,104).

Diferencias en la distribución geográfica y en la diversidad de genotipos pueden proporcionar suficiente información filogenética sobre su origen. El genotipo 1 presenta una distribución mundial con una alta prevalencia en América, Europa, Australia, Nueva Zelanda y Asia Central. El genotipo 2 prevalece en África, aunque se han caracterizado casos esporádicos en México. El genotipo 3 es el más común en India y Pakistán mientras que el genotipo 4 en Egipto; el genotipo 5 en el sur de África y el 6 en el suroeste de Asia. Por último, los genotipos 7 y 8 se caracterizaron recientemente en la República Democrática del Congo y en India respectivamente (24,105–107).

Tabla 5. Caracterización de genotipos y subgenotipos del VHC

Genotipo	Subgenotipos
1	1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1m, 1n, 1 ^o
2	2a, 2b, 2c, 2e, 2f, 2i, 2j, 2k, 2m, 2q, 2r, 2t, 2u
3	3a, 3b, 3d, 3e, 3g, 3h, 3i, 3k
4	4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4k, 4l, 4m, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r, 4s, 4t, 4v, 4w
5	5 ^a
6	6a– 6w, 6xa, 6xb, 6xc, 6xd, 6xe, 6xf, 6xg, 6xh
7	7a, 7b
8	8a

Evolución del VHC

El VHC se considera un modelo de estudio de evolución viral debido a que presenta tres características fundamentales. La primera de ellas es su alta tasa de mutación asociada a la actividad de la ARN polimerasa como consecuencia de la incapacidad de esta enzima para corregir errores durante la replicación. Se reporta una tasa de $2,5 \times 10^{-5}$ sustituciones nucleotídicas por ciclo de replicación, siendo esta tasa una de las más altas para virus ARN. Esta característica le otorga al virus la capacidad de generar múltiples variantes que en su conjunto conforman una estructura de cuasiespecies, que difieren entre el 1 y 2% por lo que se consideran estrechamente relacionadas, ya que presentan una identidad en la secuencia de nucleótidos del 98% (44). Las otras dos características importantes se basan en el tiempo de replicación, ya que este virus presenta un tiempo de replicación muy corto lo que se traduce en una tasa de producción de 10^{12} viriones diarios a partir de un individuo infectado, generando así un gran tamaño poblacional. Diferentes procesos evolutivos se han reportado para el VHC, como lo son, los cuellos de botella, recombinación intra e inter genotipo, duplicación y regiones variables asociadas a resistencia a los tratamientos disponibles (interferón y antivirales de acción directa) que podrían otorgarle al virus una ventaja adaptativa en la patogénesis (32,44,89,108,109).

La alta tasa de mutación generará una población viral heterogénea que será una de las estrategias más importantes para el establecimiento de la infección crónica; esta plasticidad biológica le permite adaptarse a las presiones de selección del hospedero, como la respuesta inmunológica a los tratamientos antivirales (44). Colonizar un nuevo hospedero, podría implicar la selección por medio de cuellos de botella de variantes minoritarias que se convertirían en variantes dominantes, lo que puede otorgarle una ventaja en la patogénesis, como evadir la respuesta inmunológica y establecer infección persistente (44).

Las proteínas E1 y E2 son las proteínas que mayor variabilidad presentan debido a que son las encargadas de responder ante la presión ejercida por la respuesta inmune del hospedero. Se ha reportado que la proteína NS5A también presenta variabilidad ya que se ha identificado una región muy variable denominada ISDR en el dominio II implicada en la respuesta asociada a la resistencia al tratamiento por interferón (44). En el dominio III de NS5A se caracterizó una región variable denominada región variable tres (V3), en la cual se ha demostrado eventos de duplicación (108), adicionalmente esta región en conjunto con la región NS5B son importantes para determinar procesos de selección que estén relacionados con la respuesta al tratamiento de antivirales de acción directa (14).

Epidemiología del VHC

La OMS estima 71 millones de personas con hepatitis C crónica alrededor del mundo, de los cuales el 75% de los casos se encuentran distribuidos en países de ingreso mediano bajo, según la clasificación analítica económica. Para el año 2015 se estimó 1,75 millones de casos nuevos de infección crónica por VHC y se reporta alrededor de 400.000 muertes cada año por complicaciones hepáticas que llevan al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (1). El 40% del total de casos de infección por VHC reportados a nivel mundial, se encuentran en China, Egipto, India y Pakistán (1).

Diferentes factores de riesgo asociados a la infección por VHC han sido reportados. La reutilización de agujas y jeringas por personas que se inyectan drogas (PID) es considerado actualmente como uno de los principales factores de riesgo de la infección

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

por VHC junto con las prácticas clínicas no seguras. La OMS estima que el 50% de PID a nivel global presentan una infección por VHC (1).

Las transfusiones de sangre fueron consideradas como el principal factor de riesgo para adquirir la infección por VHC debido a que no se había descubierto el virus y a la falta de reglamentación del tamizaje a todas las unidades de sangre, pero solo por algunos años luego del descubrimiento. Una vez la reglamentación estuvo disponible en todos los países, este factor de riesgo empezó a disminuir considerablemente, hasta tal punto de ser sustituido por la reutilización de agujas y jeringas en PID, pero aún, un porcentaje importante de casos de infección por VHC son personas transfundidas, tal es el caso de países africanos (62,110).

Adicional a lo mencionado, otros factores de riesgo reportados son tratamientos médicos como hemodiálisis, trasplante de órganos y conducta sexual de riesgo. La transmisión vertical es poco frecuente y en la mayoría de los casos se encuentra asociada a coinfecciones con VIH (24,62,111–113). Actividades como tatuajes y piercings se consideran actividades de alto riesgo asociadas a la infección por este virus pues se relacionan con la reutilización de agujas en centros no especializados y carentes de buenas prácticas de higiene; además se ha reportado que la reutilización de la tinta usada para el tatuaje podría considerarse como una forma de transmisión ya que contiene residuos de sangre remanentes de la aguja (112).

Las infecciones iatrogénicas, son consideradas como un factor de riesgo importante por la reutilización de agujas y/o jeringas en centros hospitalarios o malas prácticas clínicas en procesos como cirugía y hemodiálisis. Un porcentaje importante de casos de hepatitis C por infecciones iatrogénicas se describen en países como Rusia, Nigeria, China, Egipto e India (111,114–116).

En Estados Unidos, Rusia, Portugal, Reino Unido y Australia el uso de drogas por vía intravenosa es un importante factor de riesgo (105,111).

En Norteamérica se ha reportado una prevalencia general de 1,2%. La infección por el VHC se presenta en personas que nacieron entre 1945 y 1965, más conocidos como “*baby boomers*”, en particular en Estados Unidos (111,117). Según el Centro de Control

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

de Enfermedades (por sus siglas en inglés CDC), tres de cada cuatro casos positivos reportados nacieron en este periodo y estiman que se infectaron entre las décadas de 1960 y 1980 cuando el nivel de transmisión del virus era muy alto. Dentro de los factores de riesgo asociados a este tipo de población se encuentran: contacto con sangre infectada, infecciones iatrogénicas y transfusiones de sangre, antes de que se adoptaran las precauciones y procedimientos universales como la prueba de detección a todas las unidades de sangre. Adicionalmente, siguiendo el contexto histórico en las décadas de los 70-80 el uso de drogas psicoactivas intravenosas creció exponencialmente, facilitando la reutilización de agujas y jeringas (118,119).

En Latinoamérica, la prevalencia de anticuerpos anti-VHC en diferentes tipos de poblaciones varía entre países, siendo Puerto Rico el que presenta un porcentaje mayor (2,3%), seguido por Brasil (1,6%). Argentina y Venezuela de 1,5%. México de 1,4% y Perú con el 1,2%. (111,120).

Es importante aclarar que del 30 al 40% de los casos de infección por VHC alrededor del mundo no presentan ningún factor de riesgo asociado, lo que podría indicar que aún existen factores de riesgo desconocidos. Este es el caso de la transmisión intrafamiliar, ya que ha generado controversia, pero ha sido reportada en ausencia de otras rutas de transmisión. Se ha demostrado mediante análisis de secuencias y estudios filogenéticos la presencia de cepas del VHC muy similares o casi idénticas genéticamente entre individuos de la misma familia (121,122)

Epidemiología de la infección por VHC en Colombia

En Colombia se desconoce la prevalencia de la infección por VHC en población general y por tanto la carga de la enfermedad en el país. Según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) y el Instituto Nacional de Salud (INS) en el Boletín Epidemiológico se reporta un aumento considerable de 271 casos en 2016, 569 casos en 2017, 881 casos en 2018, 897 casos en 2019 y para el año 2020, 270 casos. Este aumento de casos entre el 2017 y el 2019 corresponde al requerimiento de la notificación de casos ante el Ministerio de Salud y Protección Social para acceder a los AAD, tratamiento que está disponible en Colombia desde 2017.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

Los departamentos con casos de VHC durante este periodo se presentan en la **Figura 4**. Cundinamarca, Antioquia, Atlántico y Valle del Cauca reportan el mayor número de casos. Bolívar, Norte de Santander, Quindío, Boyacá y Caldas demuestran el aumento durante el transcurrir de los años (123).

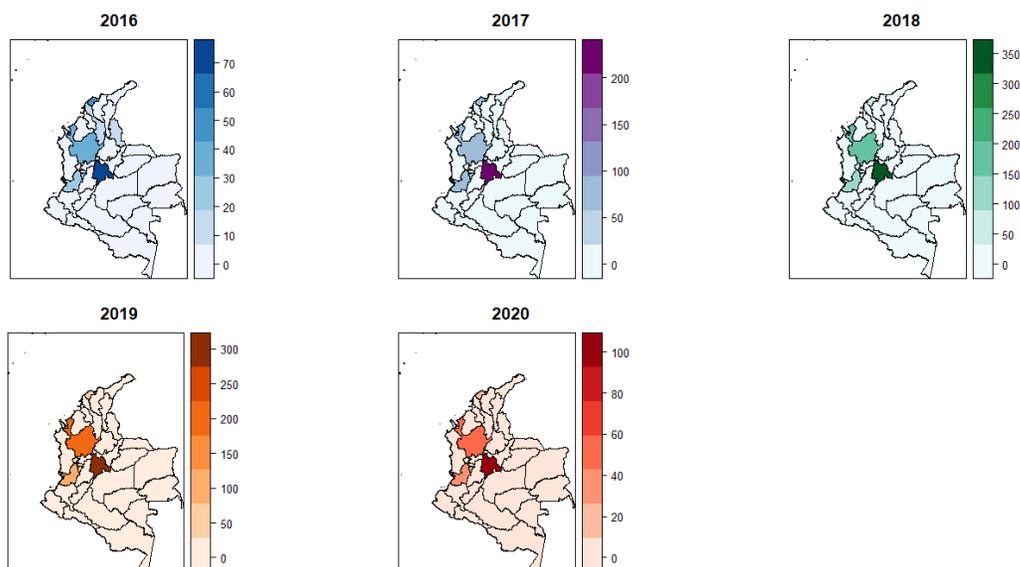


Figura 4. Casos reportados de VHC por departamento entre 2016 - 2020

Se observa una distribución homogénea de los casos de infección por VHC reportados por departamento entre 2016-2020, los cuales se concentran en el interior del país. Tener en cuenta el aumento de casos desde 2017, pasando de alrededor de 70 casos a más de 200 en 2017 y a un número mayor de 350 en 2018 debido a la notificación obligatoria de los casos para poder acceder al tratamiento antiviral. Desde 2019 se observa un descenso en el número de casos (123).

Con el fin de apoyar los planes de control y eliminación de las hepatitis virales para el año 2030, el Centro de Análisis de Enfermedades (por sus siglas en inglés *CDA*) creó el Observatorio Polaris. El equipo de epidemiólogos del Observatorio Polaris, trabajan en conjunto con las entidades reguladoras de salud en cada país para evaluar la carga actual y futura de la enfermedad causada por las hepatitis virales, el impacto económico del modelo y desarrollar estrategias que puedan lograr el cumplimiento de los objetivos trazados.

El análisis del Observatorio Polaris del CDA estima 325.600 personas con infección por VHC en Colombia según la predicción realizada con base en la prevalencia de

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

anticuerpos anti-VHC en donantes de sangre (1,2% Coordinación de Bancos de Sangre del Instituto Nacional de Salud (INS)) y asumiendo una tasa de viremia del 70% lo que corresponde a una prevalencia de anti-VHC de 0,66% en la población. Esta predicción fue fundamental para el Caso de Inversión de Hepatitis C en Colombia liderado por el Ministerio de Salud y Protección Social para evaluar y proyectar la compra centralizada de AAD como parte del compromiso del plan de control y eliminación de las hepatitis virales para el 2030.

Según el informe de seguimientos de casos de hepatitis C crónica, denominado la cuenta de alto costo se han reportado un total de 1916 casos de infección crónica por el VHC que se encuentran recibiendo tratamiento de AAD. Para la cohorte 2017-2018 se reportaron 1142 casos, en 2019, 634 casos y en 2020, hasta la fecha de corte (31 de marzo de 2020) 137 casos. El 67,9% de los casos son hombres con un promedio de edad de 50 años. Los departamentos que reportan un mayor número de casos son: Cundinamarca, Valle del Cauca, Antioquia, Atlántico y Risaralda. Como mecanismos de transmisión reportados por los pacientes, el principal es desconocido, seguido por las transfusiones de sangre y la transmisión sexual. El genotipo que prevalece en esta cohorte de pacientes es el genotipo 1b (48,5%), seguido por el genotipo 4 (19,2%), genotipo 1a (11,9%), genotipo 2 (4%) y genotipo 3 (1,6%); también se ha reportado la circulación de genotipo 5 (0,1%). Para la última fecha de corte se reportó un porcentaje de efectividad del tratamiento del 96% (124) (Actualización conferencia Doctor Orrego, Día Mundial de las Hepatitis Virales, 2020).

En Colombia se han realizado 32 estudios en población con y sin factores de riesgo que permiten describir la situación global de la infección por VHC en el país (**Tabla 6**) (125).

Según los estudios y reportes entre 1989 y 2018 la seroprevalencia de infección por VHC en donantes de sangre presenta un rango entre 1,5% y 0,32% de anti-VHC. El primer reporte corresponde al análisis de 1033 muestras de donantes de sangre obtenidas en 5 bancos de sangre de Medellín en 1989; la prevalencia de anti-VHC fue de 0,97% (10/1033) (126). Otros estudios realizados entre 1995 y 1997 reportan una prevalencia de anticuerpos anti-VHC entre 0,9 y 2,3% en donantes de sangre de diferentes ciudades del país (16,126–129).

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

En estudios realizados después de 1998 se observa una reducción importante en el porcentaje de unidades positivas para anti-VHC. Esta reducción se describe en los informes de la Red Nacional de Bancos de Sangre en los que se reporta un rango de prevalencia de anti-VHC entre 0,61 – 0,32% de las unidades recolectadas entre 2008 y 2018 (130). Así como en estudios realizados en Bancos de Sangre en Cali, Tunja, Cúcuta, Medellín y Bogotá en los que se registra una prevalencia de anti-VHC entre 0,56 – 0,32% en el periodo de 2004 y 2018 (16,126,127,131–137).

Algunos estudios de seroprevalencia se han realizado en poblaciones sin factores de riesgo conocidos. La seroprevalencia de anticuerpos anti-VHC fue de 2,5% (46/1 840) en 1840 mujeres que participaron en el marco de un estudio de infección por el Virus del Papiloma Humano (138). En un estudio reciente en población general en 5 ciudades, Bogotá, Medellín, Pereira, Quibdó y Cali exploró la frecuencia de infección por VHC mediante pruebas rápidas. La frecuencia de anti-VHC fue de 0,27% (7/ 2.624); es de anotar que el 7,7% declaró haber recibido transfusiones o trasplantes, aunque no se precisa el año del evento (139).

También se han realizado estudios en comunidades indígenas del departamento del Amazonas en los que se han descrito prevalencia de anticuerpos anti-VHC, 5,68% (10/184) (140) y 0% (0/176). Es de anotar que este último análisis se realizó en el marco de un proyecto del impacto de la vacunación para hepatitis B, por lo que las muestras fueron obtenidas de indígenas mayores de 18 años y marcador positivo para anticuerpos contra la proteína Core del Virus de la Hepatitis B (anti-HBc) (comunicación personal, Dr. Fernando de la Hoz Restrepo, Universidad Nacional de Colombia).

Por otra parte, los estudios en población con factores de riesgo muestran una alta prevalencia de infección por VHC, aunque con variaciones a lo largo del tiempo. El primer reporte que data de 1989 describe una frecuencia de anti-VHC de 42,2% (19/45) en pacientes sometidos a hemodiálisis, 21,5% (43/200) en pacientes trasplantados y 6,52% (3/46) en pacientes con diagnóstico de hemofilia atendidos en Medellín (126). Mientras que en pacientes sometidos a hemodiálisis en centros médicos en Cali en el periodo 2007-2008 se describe una prevalencia de anti-VHC de 2,9% (29/299) (141).

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

Un estudio multicéntrico de la Organización Panamericana de la Salud realizado en 2003 en hospitales en Bogotá y Medellín permitió el análisis de 500 muestras obtenidas de pacientes multitransfundidos (≥ 10 unidades o componentes sanguíneos). La seroprevalencia de anti-VHC fue de 9% (45/500) en la población de estudio y según la categoría diagnóstica, fue de 32,2% (29/90) en diagnóstico de hemofilia, 7,1% (1/14) anemia, 6,1% (5/82) requerimiento de hemodiálisis, 3,4% (8/236) enfermedades oncohematológicas y 2,56% (2/78) sangrado agudo. Los factores de riesgo con significancia estadística fueron diagnóstico de hemofilia (OR= 18,03 95% IC 3,96-114,17), transfusión de ≥ 48 unidades de sangre o componentes sanguíneos (OR= 6,08 95% IC 3,06-12,1) y eventos transfusionales antes de 1993 (OR= 13,68 95% IC 6,20-30,86)(142). En un estudio realizado en Medellín se describe un resultado similar en personas con historia transfusional antes de 1994, con una prevalencia de anticuerpos anti-VHC de 6,6% (11/166) (143).

Entre el 2010 - 2013 se llevó a cabo un estudio en dos clínicas en Bogotá donde se determinó de manera retrospectiva por medio de historial clínico que de 163 casos positivos para VHC, el 62% (101/163) reportaban como factor de riesgo una transfusión de sangre (144). En 2016 en un estudio de casos y controles realizado en la costa caribe colombiana que tenía como objetivo determinar los factores de riesgo asociados a la infección por VHC, se determinó que el 81,8% (44/55) de los casos positivos para VHC reportaban historia transfusional (145). Por último, en 2018 fue publicado un estudio realizado en la Fundación Valle de Lili, en Cali, en el cual se hizo un análisis retrospectivo de las historias clínicas de los pacientes que tuvieran un diagnóstico de VHC confirmado por anticuerpos anti-VHC y/o fueran positivos para la detección del genoma viral entre 2011 -2016. Este estudio reporta una prevalencia de 36,9% (79/214) en personas con factor de riesgo, transfusión de sangre (146).

En personas que se inyectan (PID) se han realizado varios estudios en diferentes regiones del país con un rango de seroprevalencia de la infección por VHC entre 7,6% y 47,4% (139,147–150). En una publicación reciente se analizan los datos obtenidos en un estudio realizado en 1123 PID en 5 ciudades: Bogotá, Medellín, Cúcuta, Pereira y Armenia. La edad promedio de los participantes del estudio fue $26,3 \pm 6,5$ años y la

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

frecuencia de infección por VHC tuvo rango entre 7,6 % (Bogotá) y 47,4% (Pereira) y una frecuencia promedio de 28,8%. El riesgo de infección por VHC estuvo asociado al uso por ≥ 5 años de drogas inyectables (OR= 3,1 95% IC 1,3 -7.2) (148,149). La coinfección VHC/Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) en esta población fue de 3,2%, con un rango de 1% en Bogotá a 5,6% en Pereira (149). La coinfección VIH/VHC estuvo asociada en este estudio con variables como lavado de jeringas y agujas con agua (OR= 3,2 95% IC 1,6-6,3), paso de mezcla de drogas entre jeringas (OR= 2,7 95% IC 1,3-5,3) y ≥ 4 inyecciones por día (OR= 3,5 95% IC 1,7-7,2), entre otras (149).

Una frecuencia de coinfección VIH/VHC de 5,1% (11/214) se encontró en pacientes atendidos entre 2011 y 2016 en la unidad de gastrohepatología de la Fundación Valle de Lili (146); sin embargo, en pacientes con infección por VIH atendidos en centros hospitalarios de la ciudad en Medellín, la coinfección VIH/VHC fue de 0,8% (2/251) (151).

Factores de riesgo como historia de hospitalización, cirugías o suturas fueron identificados en un estudio de casos y controles en pacientes atendidos en la consulta de gastroenterología y hepatología en ciudades de la Costa Caribe (Barranquilla y Cartagena). El 80% (44/55) de los pacientes con infección por VHC tenían historia de transfusión sanguínea antes de 1994 (OR= 216 95% IC 57,7-808) y del 70 al 80% habían sido hospitalizados (OR= 8,9 95% IC 4,5–17,7) y/o sometidos a cirugías (OR= 5,29 95% IC 2,55–10,9) o suturas antes de 1994 (OR= 2,8 95% IC 1,4–5,5) (145).

La infección por VHC también ha sido descrita en poblaciones con factores de riesgo en Bogotá, Medellín, Pereira, Quibdó y Cali. La mayor prevalencia de infección por VHC fue identificada en habitantes de calle (2,17%) y en hombres que tienen sexo con hombres (2,09%); mientras que en los trabajadores sexuales (0/380) y en jóvenes vulnerables (0/260) no fue identificado ningún caso positivo por prueba rápida para VHC (139).

Con respecto a los genotipos de VHC circulantes en el país fueron caracterizados por primera vez en 2010 en muestras de donantes de bancos de sangre en Bogotá. El genotipo 1 fue el más prevalente en la población de estudio (88,6%, 31/35); también se identificaron los genotipos 2 (8,6%, 3/35) y 3 (2,9%, 1/35). El subgenotipo 1b se identificó en el 82,8% (29/35) de las muestras y además los subgenotipos 1a (5,8%, 2/35), 2a

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

(5,8%, 2/35), 2b (2,8%, 1/35) y 3a (2,8%, 1/35) fueron caracterizados. Según el análisis de evolución se sugiere que el VHC, subgenotipo 1b, circula en Bogotá desde 1950, con un crecimiento exponencial desde la década de los 70 y un decrecimiento a principios de los 90, lo que coincide con el inicio del tamizaje obligatorio de las unidades de sangre en el país (152).

Esta distribución de genotipos y subgenotipos es similar a la observada en el estudio de pacientes multitransfundidos, en el cual se identificó el genotipo 1 en 83,3% de los casos; (subgenotipo 1b, 66,6% y subgenotipo 1a, 16,6%); además dos muestras fueron identificadas con el patrón de enzimas de restricción (por sus siglas en inglés *RFLP*) de genotipo 2, subgenotipo 2b (8,3%), y genotipo 3, subgenotipo 3a (8,3%) (153).

El predominio del genotipo 1 del VHC ha sido corroborado en otros estudios en población colombiana con antecedente transfusional (143), con diagnóstico de hepatopatías terminales (154), y diagnóstico de infección crónica por VHC (146). Así como en un estudio de muestras remitidas a dos laboratorios de referencia, en el cual se caracterizó el genotipo 1 en el 88,6% de las muestras (1361/1538), de las cuales 70% (1073/1361) corresponden a subgenotipo 1b y el 13,5% (209/1361) al subgenotipo 1a. El genotipo 2 se identificó en 5,4% (83/1538) y el genotipo 3 en 2% (30/1538) de las muestras analizadas. Este estudio permitió identificar el genotipo 4 en 62 (4%) de las muestras y corresponde al primer reporte de la circulación de este genotipo de VHC en Colombia (155).

Se ha demostrado que la variabilidad del VHC presenta implicaciones en la patogénesis, en cuanto a la gravedad de la infección, manifestaciones extra hepáticas, riesgo de carcinoma hepatocelular y respuesta a tratamientos, principalmente basados en interferón. Un estudio de casos y controles sugieren que la infección crónica por el VHC genotipo 1b está asociada con un marcado deterioro hepático (156).

Una de las razones más importante dentro del estudio de la diversidad genética del VHC, es la respuesta ante los diferentes tratamientos antivirales. Diferentes estudios han descrito una mayor resistencia al tratamiento antiviral en aquellos pacientes que presentan infección con los genotipos 1 y 4, que aquellos infectados con otros genotipos

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

(72,157). Un estudio realizado en pacientes tratados con IFN por un período de seis meses, se encontró una resistencia en el 60 al 70% de los pacientes infectados con el genotipo 1 (158). Pacientes con infección por los genotipos 2 y 3 poseen una respuesta terapéutica casi tres veces mayor en un tiempo de tratamiento corto de solo 24 semanas (87).

El papel del genotipo viral en la respuesta del VHC al tratamiento, incluso en la era de los AAD ha sido utilizado como un buen indicador del tiempo de administración de la terapia y del manejo y pronóstico del paciente. A pesar de que contamos con antivirales pangénotípicos como una respuesta a este inconveniente, es importante identificar cuasiespecies con RAS antes de iniciar el tratamiento mediante secuenciación del genoma viral (NS3, NS5A y NS5B) en algunos grupos de pacientes. Pacientes con infección por genotipo 1a que presenten historia de falla del tratamiento y pacientes con infección por VHC, genotipo 3 se debe estudiar la presencia de la mutación Y93 y suministrar ribavirina para asegurar la respuesta viral sostenida (89,159)

Tabla 6. Estudios de prevalencia de la infección por VHC en Colombia

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

Tabla 6. Estudios de prevalencia de la infección por VHC en Colombia

Estudios de prevalencia de la infección por VHC en población colombiana				
Población	Periodo de estudio	Frecuencia de anticuerpos anti - VHC	Detección del genoma viral en muestras anti-VHC positivas	Referencia
Donantes de sangre	1989	0,97% (10/1 033)	NA	Echavarría et al, 1992
	ND	2,3% (10/430)	NA	Robinson et al, 1996
	1995	0,9% (3 328/369 812)	NA	Beltrán et al, 1997
	1997	1,5% (15/1 000)	NA	Cortés et al, 1999
	1998-1999	0,54% (96/17 895)	NA	Zambrano et al, 2001
	2004 – 2005	0,6% (36/6 009)	13,3% (4/30)	Farfán et al, 2007
	2007-2010	0,6% (344/54 499)	NA	Bedoya et al, 2012
	2012 – 2013	0,5% (104/19 645)	NA	Mejía et al, 2014
	2010-2013	0,44%(68/15 461)	NA	Giraldo et al, 2015
	2014-2016	0,33% (132/39 825)	13,63% (18/132)	Ruiz et al, 2018
	2005 – 2018	0,567% (833/166 603)	NA	Cardona et al, 2019
	2008-2018	0,61% - 0,32%	NA	Instituto Nacional de Salud. Coordinación de Bancos de Sangre
Pacientes multitransfundidos	Total	9% (45/500)	26,6% (12/45)	
	Pacientes sometidos a hemodiálisis	1% (5/500)	40% (2/5)	
	Pacientes con enfermedades hemato – oncológicas	1,6% (8/500)	25% (2/8)	Beltrán et al, 2005 - Di Filippo et al, 2012
	Pacientes con sangrado agudo	0,4% (2/500)	50% (1/2)	
	Pacientes con anemia	0,2% (1/500)	NA	

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

	Pacientes con diagnóstico de hemofilia	5,8% (29/500)	24,1% (7/29)	
Pacientes sometidos a hemodiálisis	1989	42,2% (19/45)	NA	Echavarría et al, 1992
	2007 – 2008	2,9% (29/299)	89% (26/29)	Ramírez et al, 2010
Pacientes con trasplante de órganos	1989	21,5% (43/200)	NA	Echavarría et al, 1992
	2011-2016	6,5% (14/214)	NA	Rojas et al, 2018
Pacientes con diagnóstico de hemofilia	1989	6,52 (3/46)	NA	Echavarría et al, 1992
	2010 – 2013	3,7% (6/163)	NA	Prieto et al, 2014
	2011-2016	6,5% (14/214)	NA	Rojas et al, 2018
Pacientes con coinfección VHC/VIH	2002 – 2004	0,8% (2/251)	NA	Hoyos et al, 2006
	2014	3,15% (29/918)	NA	Toro et al, 2018
	2014	3,9% (8/205)	NA	Toro et al, 2020
	2011-2016	5,1% (11/214)	NA	Rojas et al, 2018
Comunidades indígenas	ND	0% (0/176)	NA	Comunicación personal el Dr. de la Hoz
	ND	5,68% (10/176)	NA	Alvarado et al, 2011
Trabajadores sexuales, personal de salud y población desplazada	ND	2,68% (12/447) Prevalencia no discriminada por grupo	NA	Alvarado et al, 2011
Pacientes con diagnóstico de cirrosis y/o carcinoma hepatocelular	2005 – 2007	6,9% (9/131)	44% (4/9)	Cortés- Mancera et al, 2011
	ND	0,25% (1/391)	100% (1/1)	Martínez et al, 2016

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

	2009 – 2012	10% (10/100)	NA	Giraldo et al, 2014
	2010 – 2013	25,3% (19/75)	NA	Prieto et al, 2014
	2011-2016	32,6% (70/214)	NA	Rojas et al, 2018
	ND	54,5% (30/55)	100% (30/30)	Yepes et al, 2016
Personas con antecedente de transfusión de sangre	2010 – 2013	62% (101/163)		Prieto et al, 2014
	ND	0,25% (1/391)	100% (1/1)	Martínez et al, 2016
	2003	6,6% (11/166)	63,6% (7/11)	Arroyave et al, 2014
	2011-2016	36,9% (79/214)	NA	Rojas et al, 2018
	ND	81,8% (45/55)	100% (45/45)	Yepes et al, 2016
Personas que se inyectan	2014	27,3% (251/918)	NA	Toro et al, 2018
	2010 – 2013	1,8% (3/163)	NA	Prieto et al, 2014
	ND	31% (82/265)	22,3% (59/265)	Berbesi et al, 2015
	2012 – 2013	22,5 % (16/71)	NA	Sepulveda et al, 2014
	ND	17,5% (46/265)	NA	Berbesi et al, 2017
	2019	45,54% (92/202)	NA	Cardona-Arias et al, 2020
Personas con tatuajes	2011-2016	6% (12/214)	NA	Rojas et al, 2018
	ND	9,1% (5/55)	100% (5/5)	Yepes et al, 2016
Pacientes sometidos a cirugía	ND	0,5% (2/391)	100% (2/2)	Martínez et al, 2016
	ND	80% (44/55)	100% (44/44)	Yepes et al, 2016
Mujeres sin factores de riesgo identificado	1994 -2005	2,5% (46/1840)	NA	Quesada et al, 2015
Pacientes atendidos en centros dermatológicos	1998	0,01% (2/150)	100% (2/2)	Sancllemente et al, 2006
Población general	2019	0,27% (7/2624)	NA	Cardona-Arias et al, 2020

ND: No Disponible **NA:** No Aplica

La respuesta de salud pública mundial al VHC se ha visto acelerada debido a la estrategia de la OMS para controlar y eliminar el VHC de la población. La introducción de medicamentos de AAD, con altas tasas de curación, duraciones de tratamiento más cortas, menos efectos secundarios y administración simplificada en comparación con medicamentos anteriores brindaron una oportunidad importante para lograr el objetivo trazado. Un número creciente de países han desarrollado planes nacionales para el acceso a estos tratamientos de la población con infección por VHC, pero a pesar de la introducción de los AAD en 2014 aún nos encontramos frente a un panorama de retos importantes. Hay que rescatar que desde el año 2015 al 2018 ha aumentado de 122.000 casos a 2,6 millones de casos tratados respectivamente a nivel mundial. No obstante, la OMS estima que la mayoría de las personas con infección por VHC aún siguen sin ser diagnosticadas por lo que es necesario emplear nuevas estrategias para una búsqueda activa de estos casos de infección. Es necesario llegar a poblaciones de alto riesgo y asegurar el acceso al tratamiento con todas las políticas de salud locales (160).

Planteamiento del problema

El control y eliminación de las hepatitis virales es una prioridad de la OMS teniendo en cuenta el peso epidemiológico en mortalidad y años de vida perdidos por enfermedades como cirrosis y carcinoma hepatocelular, producidas por estos virus. Del total de muertes por hepatitis virales, al VHC se le atribuye un porcentaje mayor al 40% de los casos a nivel mundial, sumado a esto la infección no es prevenible por vacunación y en la mayoría de los casos (60 - 80%) se establece una infección crónica, con riesgo de desarrollar alguna enfermedad hepática terminal (6,161).

El estudio de la epidemiología de la infección por VHC es el principal recurso para establecer la carga de la enfermedad y para el planteamiento de medidas de control y prevención en una población. En Colombia no se conoce la prevalencia de la infección en población general, lo que podría representar un inconveniente para la toma de decisiones para el control y eliminación de la infección por VHC. Sin embargo, los estudios en donantes de sangre y en población con y sin factores de riesgo, el análisis de modelación y el estudio del CDA han contribuido en la estrategia en el país (decreto 1.692 de 2017) (162).

La predicción realizada por el Observatorio Polaris fue fundamental para el Caso de Inversión de Hepatitis C en Colombia liderado por el Ministerio de Salud y Protección Social para evaluar y proyectar la compra centralizada de AAD como parte del compromiso del plan de control y eliminación de las hepatitis virales para el 2030.

Teniendo en cuenta que en Colombia el principal factor de riesgo de la infección por VHC son las transfusiones sanguíneas antes de 1996 (por ausencia de legislación), se planteó el estudio epidemiológico en tres ciudades (Medellín, Pereira y Santa Marta) como una estrategia de búsqueda activa de personas con el factor de riesgo, con el fin de identificar los casos de hepatitis C, confirmar el diagnóstico y remitir para el acceso al tratamiento de AAD. De esta manera disminuir el riesgo de desarrollo de hepatopatías terminales y riesgo de muerte, además de reducir los costos en el sistema de salud por tratamientos de alto costo como el trasplante de hígado y por los años de vida perdidos.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

Con respecto al componente de virología, describir la prevalencia, variabilidad genética y sustituciones asociadas a resistencia en el genoma viral contribuyen a la epidemiología molecular del virus lo que podría ayudar al planteamiento de estrategias y toma de decisiones para el control de esta infección.

Objetivo general

Caracterizar molecularmente la infección por el Virus de la Hepatitis C en individuos con historia transfusional antes de 1996.

Objetivos específicos

1. Describir características sociodemográficas y epidemiológicas de la población con historia transfusional antes de 1996.
2. Caracterizar los genotipos y subgenotipos del VHC en la población de estudio.
3. Identificar sustituciones en el VHC asociadas a resistencia a Antivirales de Acción Directa.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los genotipos y subgenotipos del VHC y las sustituciones asociadas a resistencia a los AAD en muestras de individuos con historia transfusional antes de 1996?

Metodología

Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal

Población de estudio

Personas con historia transfusional (al menos un episodio) antes de 1996 en tres ciudades de Colombia: Medellín, Pereira y Santa Marta.

La búsqueda activa de personas con antecedente transfusional se realizó mediante charlas de prevención de la infección por virus de las hepatitis con énfasis en el VHC en Medellín, Pereira y Santa Marta; además se presentó material gráfico (videos, afiches y volantes) en redes sociales, prensa, radio y televisión. Las actividades de promoción y prevención en la ciudad de Medellín se realizaron gracias al apoyo del programa de la Secretaria de Salud: Comité de Vigilancia Epidemiológico (COVECOM); este programa es un espacio donde se convoca a la población de las comunas y corregimientos del municipio de Medellín para el abordaje de temas de salud pública.

En la ciudad de Medellín se realizaron más de 20 charlas durante el 2018 - 2019 de promoción y prevención de las hepatitis virales con énfasis en hepatitis C en todas las comunas y corregimientos del municipio, con el fin de que la población conociera de la infección y pudieran ser replicadores del riesgo de tener una transfusión de sangre antes de 1996 (**Tabla suplementaria 1**). Adicionalmente, la búsqueda de personas con este factor de riesgo se hizo mediante entrevistas en programas de televisión y radio, así como artículos para periódicos.

Teniendo en cuenta el número reducido de casos de infección por VHC identificados en la población de estudio, se decidió incluir un grupo control correspondiente a tres individuos con diagnóstico confirmado de Hepatitis C sin tratamiento previo con AAD: dos personas que se inyectan drogas fueron diagnosticadas por pruebas rápidas en otra investigación y una persona con diagnóstico de infección por VHC e historia de tratamiento con IFN. Igualmente se incluyeron 16 tejidos hepáticos del Banco de Tejidos del Grupo de Gastrohepatología con el fin de mejorar el muestreo de secuencias y la inferencia filogenética.

Muestras

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para el cálculo del tamaño de muestra fueron el total de pacientes transfundidos y la población de Medellín, Pereira y Santa Marta según datos DANE del año 2016. Se calculó un tamaño de muestra de 393 participantes: 293 en Medellín, 43 en Pereira, 57 en Santa Marta.

Previo firma del consentimiento informado, diligenciamiento de una encuesta de factores de riesgo realizada por encuestadores entrenados se tomó una muestra de sangre a cada participante en dos tubos, uno con EDTA (4mL) y otro tubo seco (5mL) por personal calificado cumpliendo con las normas de buenas prácticas clínicas.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 2.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente para la separación de las fases suero y plasma. A partir de ambos tubos se separaron dos alícuotas de aproximadamente 1000 μ L de suero o plasma en dos viales. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta ser enviadas al laboratorio de Gastrohepatología. Una alícuota de suero de 1000 μ L de cada paciente fue remitida al laboratorio de Virología del INS para la realización de pruebas serológicas por duplicado que permiten la detección de anticuerpos anti-VHC usando un estuche comercial (*Murex anti-HCV versión 4.0, DiaSorin*). Este estuche comercial de ELISA reporta una especificidad de 99,88% y una sensibilidad de 100% y la prueba utiliza antígenos sintéticos de NS3, NS4 y NS5. Los envíos se realizaron con una empresa certificada para asegurar las condiciones de cadena de frío y el manejo de muestras biológicas categoría B.

Adicionalmente se seleccionó el 10% de las muestras negativas para anti-VHC, de manera aleatoria usando el comando “*sample*” del software estadístico R con el fin de identificar casos de infección oculta.

Extracción del ARN viral

Las muestras de suero que fueron positivas para anticuerpos anti-VHC y el 10% de las muestras negativas para anti-VHC seleccionadas de forma aleatoria, se sometieron a

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

extracción del ARN viral utilizando un estuche comercial (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAgen) según las instrucciones del fabricante. Se tomaron 140 μ L de suero en un vial de 1,5 mL a los cuales se les adicionó 560 μ L de Buffer AVL y 5,6 μ L de ARN Carrier. Luego de homogenizar la muestra (vortex por 15 segundos), se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se hizo un pulso. Se adicionaron 560 μ L de etanol absoluto. Posteriormente la muestra se depositó en una columna para el lavado usando los Buffer AW1 y AW2 proporcionados por el estuche comercial, seguidos de ciclos de centrifugación por 1 minuto a 8.000 y 13.000 rpm. Posteriormente se agregaron 60 μ L de Buffer de Elución, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se realizó una última centrifugación a 8.000 rpm para recuperar el ARN viral extraído.

Para las muestras de tejido hepático, se hizo la extracción del ARN total utilizando el método de TRIzol (Invitrogen). Se tomaron entre 50 – 70 mg de tejido hepático en 1 mL de TRIzol. Luego de homogenizar muy bien la muestra se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 100 μ L de cloroformo, se resuspendió durante 15 segundos con vortex, y se incubó en hielo por 10 minutos para luego centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de recuperar la fase acuosa en un vial nuevo, estéril y debidamente marcado, se precipitó el ARN adicionando 20 μ L de solución de glicógeno (1mg/ml) y 600 μ L de isopropanol frío, se mezcló con vortex durante 10 segundos y se incubó durante toda la noche a -20°C, pasada la incubación se centrifugó a 12.000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente se hizo el descarte del sobrenadante, se lavó el pellet con 1mL de etanol frío al 75% y se agitó con vortex durante 10 segundos; se centrifugó a 12.000 rpm durante 45 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego el pellet obtenido fue secado en cámara de flujo por 10 minutos e incubado a 55°C en baño maría durante 10 minutos. Finalmente, el pellet se disolvió en 30 μ L de agua libre de nucleasas (Invitrogen) y se almacenó a -70°C hasta el momento de su amplificación.

Detección y amplificación del genoma del VHC por RT-PCR

Con el fin de determinar la presencia del genoma de VHC en las muestras positivas para anti-VHC, luego de la extracción de ARN viral se amplificó un fragmento de la región 5'UTR (nt 23 – nt 327) a partir de RT-PCR anidada estandarizada previamente en el

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

grupo (163), usando oligonucleótidos específicos, que corresponde a una región altamente conservada. La reacción de transcripción reversa se realizó utilizando el oligonucleótido HCV 209, a una temperatura inicial de 37°C por 1 hora, seguida de la desnaturalización de la enzima a 94°C durante 15 minutos y la estabilidad de la molécula a una temperatura de 4°C.

Para la amplificación de cADN durante la primera y segunda ronda de PCR, se tomaron 10 y 5 µL respectivamente del producto de la transcripción reversa para un volumen final de reacción de 50µL. La primera PCR se realizó con los oligonucleótidos HCV 209 y HCV 939 (163) y para la segunda PCR se utilizaron los oligonucleótidos HCV 211 y HCV 940 (163) para obtener un fragmento de 251 pares de bases (**Tabla 7**). Ambas PCR se llevaron a cabo a una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación que incluye desnaturalización por 30 segundos a 94°C, annealing a 56°C por 30 segundos y extensión durante 1 minuto a 72°C; la síntesis de la cadena se completa a 72°C por 10 min y se estabiliza la molécula a una temperatura de 4°C.

La reacción de transcripción reversa para NS5A se realizó utilizando primers aleatorios (random primers) y siguiendo las mismas condiciones de temperatura y ciclaje mencionada para 5'UTR. Esta nested PCR amplifica una parte de la región de NS5A para los genotipos 1a y 1b. La primera PCR se realizó con los oligonucleótidos: HCV1a_Fw1 (nt 6276 - 6297), HCV1a_Rev1 (nt 7600 - 7621), HCV1b_Fw1 (nt 6177 - 6198) y HCV1b_Rev1 (nt 7485 - 7506) (**Tabla 7**) (89) a una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación que incluye desnaturalización por 1 minuto a 95°C, annealing a 58°C (HCV1a_NS5A) y 54°C (HCV1b_NS5A) por 1 minuto y extensión durante 3 minutos a 72°C; la síntesis de la cadena se completa a 72°C por 10 min y se estabiliza la molécula a una temperatura de 4°C.

Para la segunda PCR se utilizaron los oligonucleótidos HCV1a_Fw2 (nt 6290 - 6310), HCV1a_Rev2 (nt 7584 - 7603), HCV1b_Fw2 (nt 6231 - 6249) y HCV1b_Rev2 (nt 7438 - 7455) (89) para obtener un fragmento final de alrededor de 1.300 pares de bases (**Tabla**

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

7) a una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación que incluye desnaturalización por 1 minuto a 95°C, annealing a 60°C (HCV1a_NS5A) y 54°C (HCV1b_NS5A) por 1 minuto y extensión durante 3 minutos a 72°C; la síntesis de la cadena se completa a 72°C por 10 min y se estabiliza la molécula a una temperatura de 4°C.

La reacción de transcripción reversa para NS5B se realizó utilizando el oligonucleótido 8645n (nt 8616 - 8645) (164) siguiendo las mismas condiciones de ciclaje para 5'UTR. La primera PCR se realizó con los oligonucleótidos 8245p (nt 8245 - 8275) y 8645n (nt 8616 - 8645) (164) a una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación que incluye desnaturalización por 30 segundos a 93°C, annealing a 60°C por 45 segundos y extensión durante 1 minuto a 72°C; la síntesis de la cadena se completa a 72°C por 7 minutos y se estabiliza la molécula a una temperatura de 4°C. Para la segunda PCR se utilizarán los oligonucleótidos 8276p (nt 8276 - 8299) y 8645n (nt 8616 - 8645) (164) para obtener un fragmento de alrededor de 400 pares de bases (**Tabla 7**) a una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación que incluye desnaturalización por 30 segundos a 93°C, annealing a 55°C por 45 segundos y extensión durante 1 minuto a 72°C; la síntesis de la cadena se completa a 72°C por 7 minutos y se estabiliza la molécula a una temperatura de 4°C.

De los productos amplificados se tomaron 8 µL y se mezclaron con 2 µL de Buffer de carga 6X (Fermentas). Para su visualización se colocan en geles de agarosa al 2% con solución Bromuro de Etidio (Br Et) (5 mg/ml), utilizando buffer de corrida TAE 1X y 3 µL de marcador de peso molecular con un incremento de 100 pb (pares de bases - Fermentas). El corrido del gel se hizo a 100 voltios durante 1 hora. Los geles se visualizaron con el equipo de foto documentación (2UV transilluminator Digital Imaging System).

Tabla 7. Oligonucleótidos para la detección de VHC por PCR

Oligonucleótido	Posición	Secuencia (5' – 3')
HCV 209	nt 299 – 327	TCGAGGTGCACGGTCTACGAGACCT

HCV 939	nt 23 – 42	CTGTGAGGAACTACTGTCTT
HCV 211	nt 266 - 292	ACTCTCGAGCACCCCTATCAGGCAGT
HCV 940	nt 41 – 60	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG
HCV1a_NS5A	nt 7600 – 7621	GCTCRATGTCYTAYWCCTGGAC
HCV1b_NS5A	nt 7485 – 7506	GACCARGAMCCGTCRCTGAGRT
HCV1a_Fw1	nt 6276 - 6297	GACRTYTGGGACTGGATATGCG
HCV1a_Rev1	nt 7600 - 7621	GCTCRATGTCYTAYWCCTGGAC
HCV1b_Fw1	nt 6177 - 6198	GGATYAAYGARGACTGYTCYAC
HCV1b_Rev1	nt 7485 - 7506	GACCARGAMCCGTCRCTGAGRT
HCV1a_Fw2	nt 6290 - 6310	GATATGCGAGGTGYTGAGCG
HCV1a_Rev2	nt 7584 - 7603	GAGCARCACACGACRTCYTC
HCV1b_Fw2	nt 6231 - 6249	GGGAYTGGATATGYACGGT
HCV1b_Rev2	nt 7438 – 7455	GGCATGGAGGARWAYGAC
8645n	nt 8616– 8645	GGCGGAATTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA
8245p	nt 8245 - 8275	TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGYTTYGA
8276p	nt 8276 – 8299	CTCCACAGTCACTGAGAGCGACAT

[M=A o C; Y= T o C; D=G, A o T R=A/G]:

Detección y amplificación del genoma del VHC por RT - PCR en tiempo real (RT - qPCR)

Con el fin de usar una técnica más sensible para la detección del genoma de VHC en las muestras positivas para anticuerpos anti-VHC y en el grupo del 10% de las muestras negativas para anticuerpos que se seleccionaron al azar para verificar los resultados, se llevaron a cabo análisis por RT- qPCR en dos pasos usando el estuche comercial *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Mastermix (2X)* siguiendo las condiciones del fabricante y la estrategia de primers de segunda ronda de la región 5'UTR (HCV 211 – HCV 940) mencionada anteriormente en un volumen final de 25 µL. Se usaron 5 µL de cADN. Para esta PCR se usó una temperatura inicial de desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación que incluye desnaturalización por 15 segundos a 95°C, annealing a 56°C por 30 segundos y extensión durante 30 segundos a

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

72°C; la síntesis de la cadena se completa a 72°C por 1 min seguido por la construcción de la curva de Melting.

Construcción de un control interno basado en la región 5'UTR de VHC

Con el fin de tener disponible un control interno de la RT-PCR se diseñó un constructo basado en la segunda ronda de la PCR con los primers de segunda ronda HCV 209 – HCV 940 (nt 299 – nt 327). Las secuencias de los primers flaquean una secuencia espaciadora que corresponde al gen olfativo OR4 de *Aedes Aegypti* (nt 190 - 510) (**Figura 5**) donado por el grupo de Genética Molecular de la Universidad de Antioquia para dar origen a un fragmento de 370 pb aproximadamente. Cabe mencionar que la secuencia espaciadora debía ser una región muy distante filogenéticamente de VHC, que ya estuviera secuenciada y que no correspondiera con la región blanco de otras pruebas utilizadas en el laboratorio de forma rutinaria y que comprendiera un fragmento de tamaño específico para la observación luego de la electroforesis con un peso diferente al esperado de una muestra positiva para VHC (251 pb).

Usando el programa *SeqBuilder* se analizó la secuencia conocida del gen olfativo OR4 para el diseño de primers específicos usando la herramienta *Primer Select*. Se seleccionaron dos estrategias para asegurar el éxito del diseño y se le adicionaron las secuencias de los primers HCV 209 – HCV 940 respectivamente. Estos primers modificados se enviaron a sintetizar (Macrogen), una vez obtenidos se realizó un proceso de amplificación usando un ADN donado del gen olfativo y se purificó el producto de PCR para ser clonado dentro del vector *pBluescript KS+*.

Este vector fue escogido ya que presenta un sitio de clonación múltiple, produce un alto número de copias y contiene el promotor T7 que permite transcribir *in vitro* el ADN en ARN. Para la clonación del fragmento obtenido se usaron las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI* y con la ayuda del software *Biomath calculator* se calculó una relación de ligación vector-ADN 1:1. Se usaron dos relaciones más 3:1 y 5:1 para asegurar el éxito del ensayo usando la enzima T4 ligasa. Se transformaron bacterias DH5 α competentes y se verificó la inserción de las secuencias de VHC – gen olfativo OR4 por PCR y se procedió a linearizar con la enzima *Sap* y a realizar una transcripción *in vitro* para la generación de

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

ARN a partir de ADN usando el estuche comercial *T7 Ribomax Express Large Scale RNA production system* y siguiendo las condiciones del fabricante; se hizo una reacción con 1ug de ADN plasmídico purificado y linearizado, se incubó por 37°C durante 30 minutos; pasado el tiempo de incubación se agregó 2 µL de DNasa (2 unidades/UI Invitrogen) y se incubó nuevamente por 30 min. El ARN transcrito *in vitro* se purificó utilizando una columna del estuche comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)* siguiendo las condiciones previamente descritas.

Por último, se hicieron diluciones seriadas del ARN transcrito *in vitro* y del ADN plasmídico con el fin de determinar hasta cual dilución se observa una banda de amplificación.

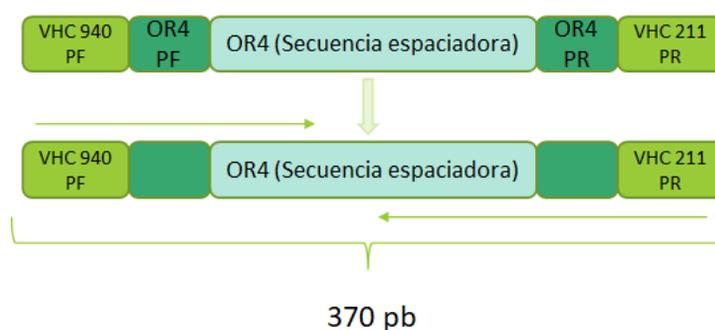


Figura 5. Esquema representativo de la construcción del control interno de VHC

Se presenta gráficamente la construcción del control interno de VHC usando como secuencia espaciadora el gen OR4, el cual está flaqueado por los primers OR4 sentido y anti-sentido y a su vez por los primers de VHC: HCV 211 – HCV 940

Análisis de secuencias y análisis filogenéticos del VHC

Los productos de PCR obtenidos de las 3 regiones del genoma viral fueron secuenciados mediante la técnica de Sanger (Macrogen). Las secuencias obtenidas se editaron y ensamblaron utilizando el programa *SeqMan* versión II de *DNAstar*. Luego de obtener las secuencias consenso, se realizó el alineamiento utilizando el programa *BioEdit* versión 7.2 y *MEGA 7* y su algoritmo Muscle; para este análisis se utilizaron secuencias de referencia disponibles en las bases de datos de GenBank, Los Álamos, ViPR (por sus siglas en inglés *Virus Pathogen Database and Analysis Resource*) e ICTV para cada uno de los genotipos y subgenotipos del VHC.

Infeción por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

La construcción del *DataSet* fue un proceso crítico por la necesidad de incluir secuencias representativas para cada región del genoma a analizar. Primero se revisó cada una de las bases de datos disponibles con el fin de abarcar el mayor número de secuencias que aporten información filogenética. Para el caso de GenBank se encontraron 140 secuencias disponibles para la región 5'UTR, 28.627 secuencias para NS5A y 46.386 secuencias de NS5B. En la base de datos *ViPR* no se encontró de manera explícita secuencias para 5'UTR, únicamente genomas completos (128.580), para NS5A se encontraron disponibles 11.740 secuencias y para NS5B 26.068 secuencias. Los Álamos es una base de datos exclusiva para secuencias de VHC, en esta base de datos se encontraron 1.630 secuencias para 5'UTR, 12.761 secuencias para NS5A y 3.073 secuencias para NS5B. Teniendo en cuenta la cantidad de secuencias disponibles, se decidió dirigir la construcción del *DataSet* con secuencias referencia para cada uno de los genotipos y subgenotipos, las cuales se encontraron en el ICTV (165) e incluir todas las secuencias de América y las más representativas de los otros continentes. Con la ayuda de herramientas digitales como CD-HIT se seleccionaron solo las secuencias representativas que no fueran redundantes.

La caracterización de genotipos y subgenotipos se realizó por medio de análisis filogénicos mediante probabilidad bayesiana y de máxima verosimilitud y usando los software Mr Bayes, BEAST versión 1.8.4, MEGA 7 y IQTREE, previa determinación del modelo de sustitución nucleotídica que se acomoda a los datos. Para la verificación de los análisis bayesianos en MrBayes y BEAST se usó el programa Tracer versión 1.6 para la evaluación del número de generaciones mediante la visualización del tamaño de muestra esperado (ESS); para alcanzar un valor de 200 ESS, se programó 2 millones de generaciones en MrBayes y 50 millones de generaciones en BEAST. Para la visualización de los árboles se usó el programa FigTree versión 1.4.3.

Para la identificación de las mutaciones asociadas a resistencia en las secuencias NS5A y NS5B se realizaron alineamientos con base en la secuencia referencia con número de acceso GenBank NC_004102.

Análisis de recombinación

El análisis de recombinación se realizó comparando cada una de las secuencias obtenidas en este trabajo de investigación con las secuencias referencia para genotipo y subgenotipo reportadas en el ICTV y en la base de datos GenBank. Este análisis se realizó con el software SimPlot v.3.5.1 y se confirmó con el software en línea Datamonkey.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se describieron con números absolutos y porcentajes. Para comparar variables cualitativas se empleó la prueba de *Chi* cuadrado. Se asumió un valor de $p < 0,05$ con significancia estadística. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico *R Commander* v.4.0.3.

Resultados

Se incluyeron en el estudio 260 personas con historia de transfusión antes de 1996 que aceptaron participar voluntariamente entre 2018 y 2020 en la ciudad de Medellín (n=159), Pereira (n=43) y Santa Marta (n=58). El promedio de edad de la población de estudio es 56 años y un rango entre 24 a 99 años y el 69,6% (181/260) corresponde a mujeres. Accidente con arma cortopunzante (6,10%), accidente con arma de fuego (7,25%), accidente de tránsito (8,77%) y cirugía (22,5%) fueron los principales motivos de transfusión en hombres; mientras que en mujeres se encuentran hemorragia post parto (23,6%), cirugía, incluyendo cesárea (22,5%), anemia (9,54%) y exanguinotransfusión (7,25%). Se determinó también la presencia de otros factores de riesgo como piercings (36,5%), tratamientos con objetos punzantes y/o cortopunzantes (35,4%), acupuntura (27,7%), tatuajes (16,9%), trasplante de órganos (2,3%) y hemodiálisis (1,5%). Teniendo en cuenta todos los factores demográficos y/o de riesgo analizados presentados en la **Tabla 8**, en comparación con el género, se encontró significancia estadística del factor de riesgo de procedimientos odontológicos invasivos ($p = 0,0005$ ($X^2 = 14.2$, GL:2)).

Las características demográficas y factores de riesgo de la población de estudio se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Características demográficas y principales factores de riesgo en pacientes con historia transfusional antes de 1996

	VHC +		VHC-		Total	
	N	%	N	%	N	%
	7	2,6	253	97,4	260	100
Edad	59,7 (48 - 56)		56,8 (26 - 101)		58,5 (26 - 101)	
Sexo	5	71,4	181	69,9	Femenino	

Factores de riesgo	Total	
	N	%
Hospitalización antes de 1996	225	86,5
Cirugías antes de 1996	210	80,7
Inyecciones en droguerías o farmacias	168	64,6
Endoscopia	129	49,6

Según los resultados de la prueba de ELISA para anti-VHC (ensayo realizado por duplicado en el INS), 7/260 (2,6%) muestras presentaron positividad para anticuerpos anti - VHC.

La detección del genoma viral, usando la región 5'UTR (nt 23 – nt 327) se logró en 4 de las 7 muestras positivas para anticuerpos anti-VHC (**Figura 6a**). Además, se logró la amplificación de la región NS5A (nt 6276 - 7506) en 3 de las 4 muestras positivas para 5'UTR y de la región NS5B (nt 8245 - 8645) en las 4 muestras positivas para 5'UTR (**Figuras 6b, 6c**). Para optimización de la PCR anidada de NS5A y NS5B se hicieron diluciones 1:10 del producto de primera ronda. Las 7 muestras se analizaron y confirmaron por la técnica de qPCR (**Figura 7**).

En la **Tabla 9** se presentan los factores de riesgo y los marcadores serológicos y moleculares de la infección por VHC de los 7 casos.

Tabla 9. Características demográficas y marcadores de infección por VHC en individuos transfundidos antes de 1996

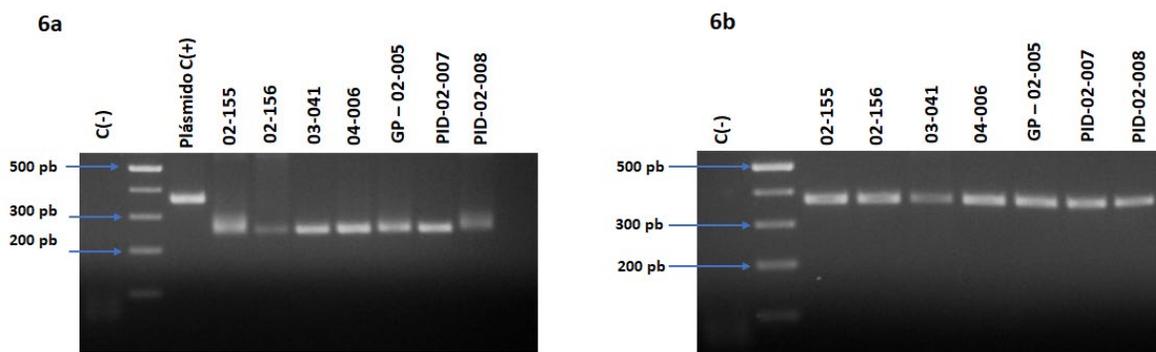
Código	Ciudad	Edad	Género	Motivo transfusión	Año de transfusión	anti-VHC	Genoma VHC	Genotipo/ Subgenotipo
02-155	Medellín	66	F	Embarazo ectópico	1986	+	+	1b

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

02-156	Medellín	63	M	No recuerda	1968	+	+	1b
02-157	Medellín	48	F	Fístula arterio venosa	1986	+	-	NA
03-007	Pereira	53	F	Cirugía	1990	+	-	NA
03-012	Pereira	62	F	Hemorragia post parto	1986	+	-	NA
03-041	Pereira	67	M	Accidente de tránsito	1970	+	+	4d
04-006	Santa Marta	59	F	Hemorragia post parto	1986	+	+	1b

NA: No Aplica

El ensayo de amplificación por RT – PCR de las 26 muestras negativas para la detección por anti – VHC que fueron seleccionadas al azar (10% del total de muestras), presenta un resultado de amplificación débil en 8 de las 26 muestras (02-067, 02-069, 02-119, 02-130, 02-147, 03-024, 04-012 y 04-013), que parece corresponder con el peso del amplificado esperado (251 pb) (**Figura 6d**). Se procedió a purificar el ADN a partir de las bandas obtenidas en el gel de agarosa y se enviaron a secuenciar (Macrogen). Sin embargo, no se logró obtener ninguna secuencia, posiblemente por la calidad y baja concentración de la muestra. Teniendo en cuenta este resultado, se realizó un ensayo de qPCR con las 8 muestras en mención y se logró amplificar en tres muestras, 02-069, 02-119 y 04-012, con un CT mayor a 34. Los resultados se presentan en la **Tabla 10** y en la **Figura 7**.



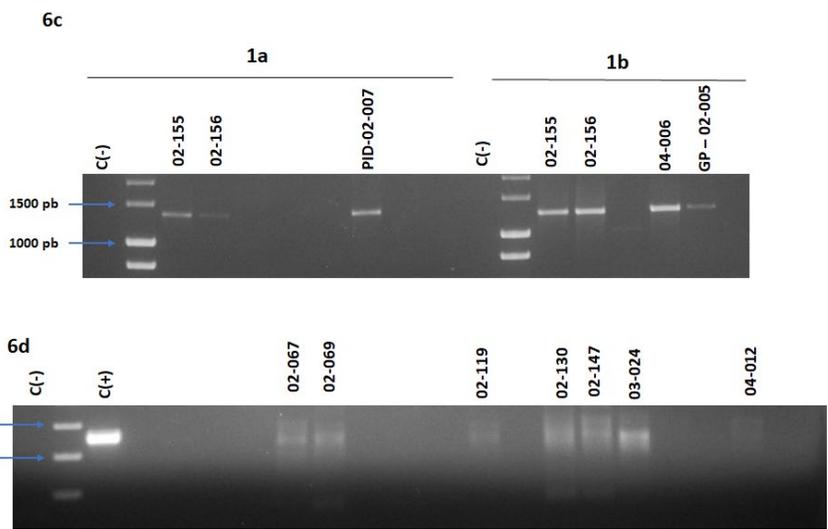


Figura 6. Detección del genoma de VHC por RT-PCR en muestras de suero de personas con historia transfusional antes de 1996

6a. Amplificación de las regiones 5'UTR, en la cual se observa el fragmento esperado de 251 pb. En este gel se presenta como control positivo el plásmido pBlueScript-VHC. **6b.** Amplificación de la región NS5B, en el cual se observa el fragmento esperado de 370 pb. **6c.** Amplificación de la región NS5A del VHC en el cual se observa el fragmento de 1300 pb tanto para la estrategia diseñada para genotipo 1a como para 1b. **6d.** Amplificación de la región 5'UTR de las muestras negativas seleccionadas al azar para la detección de anticuerpos de anti-VHC. Geles de electroforesis al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Como control negativo muestra de suero donante negativa para anti-VHC y genoma.

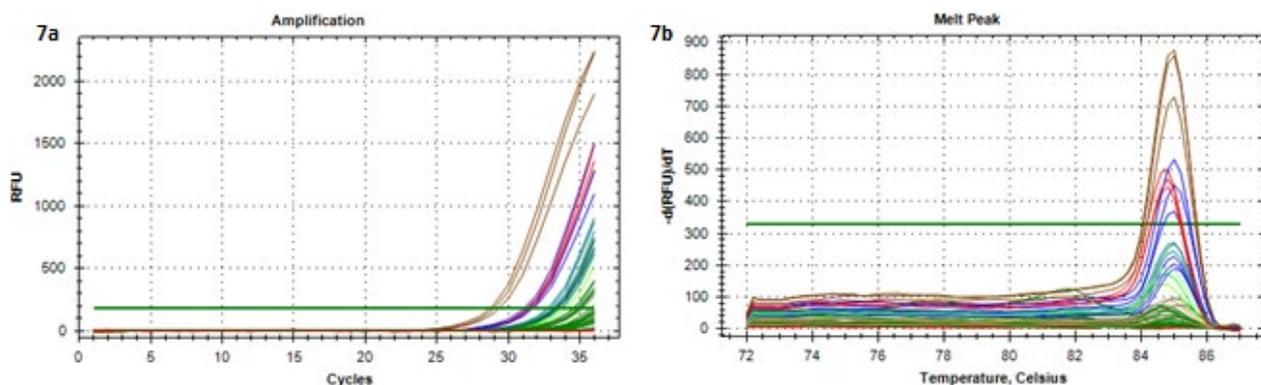


Figura 7. Detección del genoma de VHC por qPCR

7a. Amplificación por qPCR de la región 5'UTR. Se diferencia cada muestra de un color: rojo (02-155), café (02-156), verde fluorescente (03-041), verde aguamarina (04-006), azul rey (02-005), azul oscuro (PID-02-007), rosado (PID-02-008) y verde oscuro para las muestras correspondientes al 10%

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

negativas seleccionadas al azar (02-067, 02-069, 02-119, 02-130, 02-147, 03-024, 04-012, 04-013) y para el control interno. **7b.** Gráfica de curva de Melting con los mismos colores descritos para las muestras.

Tabla 10. Valores de CT de la detección del genoma de VHC por qPCR

Muestra	Promedio valor CT	Desviación estándar
02-155	31,37	0,1513
02-156	28,97	0,31
03-041	33,64	0,3728
04-006	32,86	0,2051
02-005	33,41	0,1992
PID-02-007	31,38	0,29
PID-02-008	32,92	1,1435
02-067	NA	NA
02-069	34,92	0,6505
02-119	34,84	0,1131
02-130	NA	NA
02-147	NA	NA
03-024	NA	NA
04-012	34,28	0,7709
04-013	NA	NA
Control negativo	NA	NA

Con respecto al grupo control positivo se analizaron tres muestras obtenidas de dos PID (PID-02-007, PID-02-008) y un paciente con tratamiento previo con IFN (GP-02-005). Se demostró la amplificación por RT-PCR de 5'UTR y de la región de NS5B en las tres muestras y en dos muestras (02-005 y PID-02-007) se amplificó la región de NS5A (**Tabla 11, Figuras 6a, 6b, 6c**). Adicionalmente, se demostró amplificación de 5'UTR por qPCR en las tres muestras (**Figura 7**)

Tabla 11. Características demográficas y marcadores de infección por VHC del grupo control positivo

Código	Ciudad	Edad	Género	Factor de riesgo reportado	Tratamiento	Genoma VHC	Genotipo/ subgenotipo
GP-02-005	Medellín	59	M	Hemodiálisis Hospitalización Cirugía Trasplante de órganos	IFN	+	1b
PID-02-007	Medellín	38	F	Reutilización de agujas y jeringas	NA	+	1 ^a
PID-02-008	Medellín	30	M	Reutilización de agujas y jeringas	NA	+	1 ^a

Para seleccionar las muestras de explante hepático, se revisó la base de datos del banco de tejidos del Grupo de Gastrohepatología de la Universidad de Antioquia y se escogieron 22 muestras correspondientes a pacientes positivos para anticuerpos anti-VHC. De las 22 muestras, 16 fueron positivas para la amplificación del genoma del VHC (5'UTR). Además, se logró amplificar la región NS5B en 13 muestras y en 3 de las 16 muestras se amplificó la región NS5A. Los tejidos con el prefijo TH se recolectaron en un estudio realizado entre 2001 y 2007, mientras que los tejidos 01-052 y 01-054 se recolectaron en un estudio 2015.

Tabla 12. Características demográficas y marcadores de infección por VHC en pacientes con diagnóstico de hepatopatía terminal y sometidos a trasplante hepático

Código	Género	Diagnóstico	Genoma VHC	Genotipo/ Subgenotipo
01-052	M	Cirrosis por VHC	+	ND
01-054	F	Cirrosis y CHC por VHC	+	ND
TH1	F	Cirrosis por VHC y VHB	+	1b
TH2	M	Cirrosis por VHC	+	1a
TH3	M	Cirrosis por VHC	+	2a

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

TH7	M	Cirrosis y CHC por VHC	+	4a
TH9	M	Cirrosis y CHC por VHC	+	1b
TH10	F	CHC por VHC	+	
TH14	M	Cirrosis por VHC	+	1b
TH15	F	Cirrosis hepática criptogénica y CHC	+	1b
TH16	F	Cirrosis y CHC por VHC	+	1b
TH17	F	Cirrosis por VHC	+	1b
TH29	M	Cirrosis y CHC por VHC	+	1b
TH58	M	CHC por VHC	+	1a
TH67	M	Cirrosis y CHC por VHC	+	1b
TH86	M	Cirrosis por VHC	+	1a

Como control de amplificación de la región 5'UTR del genoma viral, se incluyó el plásmido pBluescript-VHC (**Figura 6a**). A partir del diseño *in silico* del constructo, se procedió a hacer un ciclo de amplificación usando los primers HCV – 211 y HCV- 940 de la estrategia de 5'UTR de VHC y la secuencia espaciadora del gen olfativo OR4 (**Figura 5**). Esta amplificación fue necesaria para obtener el fragmento de ADN que sería clonado en el vector pBluescript (**Figura 8**)

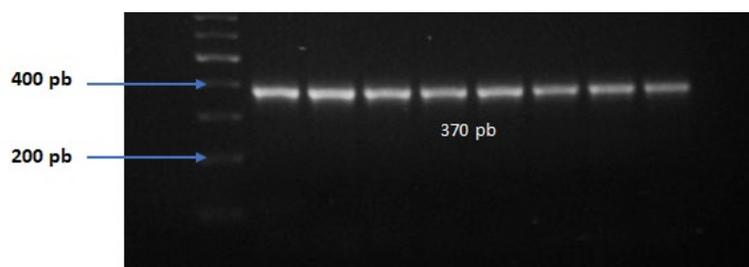


Figura 8. Construcción del control interno para amplificación de la región 5'UTR del genoma viral

Amplificación de una región del gen olfativo OR4 de *Aedes Aegypti* usando los primers diseñados *in silico* HCV211-OR4 anti-sentido y HCV940-OR4 sentido. Las bandas observadas corresponden a la amplificación de 370 pb del gen olfativo OR4. Estos productos de PCR positivos fueron usados para la clonación en el vector pBluescript. Gel al 1,5% de agarosa y teñido con bromuro de etidio.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

Una vez se obtuvieron los productos de PCR con el fragmento de VHC de 370 pb, se procedió a liberar un fragmento de dengue virus (DENV) del plásmido pBlue - qDENV – Control (plásmido donado por el doctor José Usme, profesor de la Universidad Cooperativa de Colombia) (166) para la posterior clonación del fragmento de VHC. Se hicieron dobles digestiones con las enzimas *SacI* y *KpnI* del ADN plasmídico para liberar el inserto de DENV y se purificó a partir de gel las bandas correspondientes al plásmido sin el inserto (**Figura 9**)

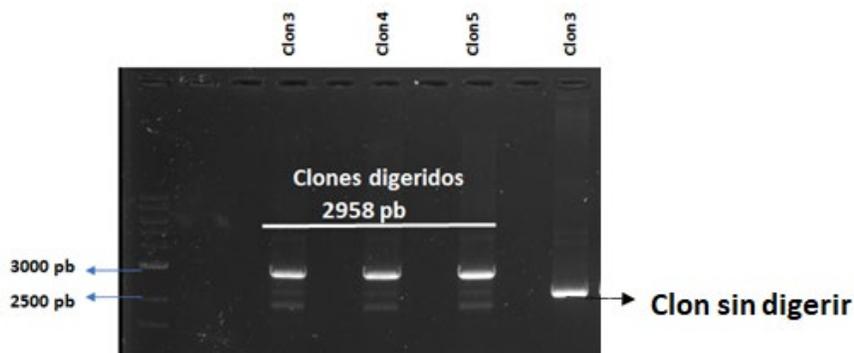


Figura 9. Liberación de un fragmento de DENV usando las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI*

Corte de bandas para purificación del ADN plasmídico vacío. Los números 3, 4 y 5 corresponden a tres clones de bacterias DH5α en estudio. Los clones que se relacionan a la derecha son clones que fueron digeridos por las enzimas *SacI* y *KpnI*, clones que ya no presentan el fragmento de DENV, mientras que los clones que se relacionan a la izquierda son controles donde no hay digestión. Gel al 1,5% de agarosa y teñido con bromuro de etidio.

Cuando se purificó y se liberó el inserto se procedió a la ligación con 3 relaciones vector: inserto (1:1, 3:1, 5:1) y se transformaron las bacterias DH5α para su propagación. Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico y se cuantificó para realizar una doble digestión con las enzimas *SacI* y *KpnI* para verificar la ligación de los insertos (**Figura 10**). La verificación de la clonación se realizó mediante la amplificación del fragmento de 370 pb diseñado *in silico* usando los primers HCV 211- HCV940 (**Figura 5**). Los clones 3 y 5 insertaron correctamente el fragmento de VHC.

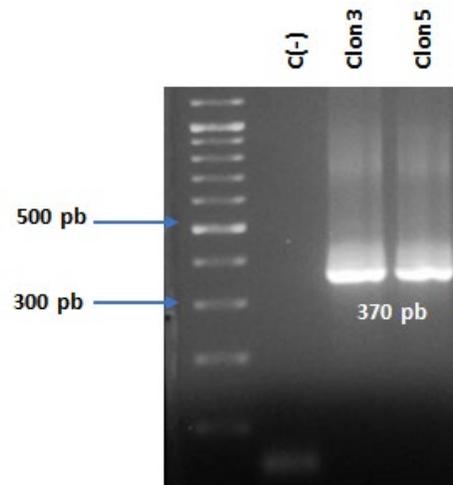


Figura 10. Verificación del constructo pBluescript-VHC mediante PCR

Los clones 3 y 5 corresponden a cultivos de bacterias DH5 α transformadas con plásmidos recombinantes que incorporaron el fragmento flanqueado por los primers de VHC y que puede ser evidenciado mediante la amplificación de una banda de 370 pb en el gel de electroforesis. Gel al 1,5% de agarosa y teñido con bromuro de etidio.

Los análisis filogenéticos se construyeron mediante un enfoque bayesiano con el programa BEAST v1.8 y se obtuvieron árboles de máxima credibilidad, estos resultados se alcanzaron con una corrida de 50 millones de generaciones, valor que permitió llegar a un tamaño de muestra esperado (ESS) por encima de 200, siguiendo el valor ESS en el programa Tracer v1.6. considerando confiables los resultados obtenidos.

Previo a los análisis filogenéticos se realizaron los análisis de recombinación mediante la comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo de investigación y las secuencias referencia reportadas para cada genotipo en la literatura. No se obtuvieron resultados de recombinación en las secuencias.

Para construir los árboles filogenéticos (cladogramas) se tuvieron en cuenta más de 220 secuencias de Colombia, Argentina, Uruguay, Chile, Venezuela, México, Brasil, Estados Unidos, Canadá, Turquía, España, Alemania, Francia, Inglaterra, Portugal, Chipre, Rusia, Japón, India, China, Egipto, entre otros países, con el fin de tener una representación de secuencias a nivel mundial de cada genotipo, pero enfocando los análisis principalmente

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

en las secuencias de América, incluyendo 140 secuencias provenientes de este continente (**Figuras 11, 12, 13 y Tablas suplementarias 2,3 y 4**).

Si bien, para la construcción del árbol filogenético de 5'UTR primero se tuvieron en cuenta alrededor de 150 secuencias incluyendo todas las secuencias reportadas para Colombia (61); el árbol de máxima credibilidad presentado en la **Figura 11** contiene más de 75 secuencias de las cuales 46 secuencias fueron reportadas en países americanos (Argentina, Uruguay, Chile, Venezuela, México, Brasil, Estados Unidos, Canadá) y 13 son específicamente de Colombia (**Tabla suplementaria 2**). Este árbol se obtuvo luego de hacer depuraciones de las secuencias duplicadas que mostraron múltiples politomías en los análisis preliminares realizados con MrBayes v6.4 (datos no mostrados). En la **Figura 11** se observa el árbol de 5'UTR en el cual se diferenciaron 7 de los 8 genotipos reportados hasta el momento. Se observa que la caracterización de los genotipos con la región 5'UTR no permite la resolución filogenética del genotipo 6; pues se agrupa dentro del genotipo 1, es decir, el genotipo 6 no forma un clado específico, si se usa esta región del genoma viral como referencia. Es el mismo caso para los subgenotipos 1a y 1b agrupados en una misma rama.

Se identificaron 20 secuencias propias de este trabajo de investigación, que agruparon en el genotipo 1 (02-155, 02-156, 04-006, y del grupo control 02-005, PID-02-007, PID-02-008, 01-052, 01-054, TH1b, TH2, TH9, TH10, TH14, TH15, TH16, TH17, TH29, TH58, TH67, TH86) usando la secuencia 5'UTR. En este primer análisis se puede determinar que las secuencias PID-02-007, PID-02-008 y 01-052 del grupo control agrupan en el subgenotipo 1a, mientras que las secuencias 02-155, 02-156, 04-006, y del grupo control 02-005, 01-054, TH1b, TH2, TH9, TH10, TH14, TH15, TH16, TH17, TH29, TH58, TH67, TH86 agrupan en subgenotipo 1b (**Figura 11**). La secuencia proveniente de la amplificación de 5'UTR de la muestra TH3 no pudo tenerse en cuenta para este análisis filogenético por baja calidad de la secuencia.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

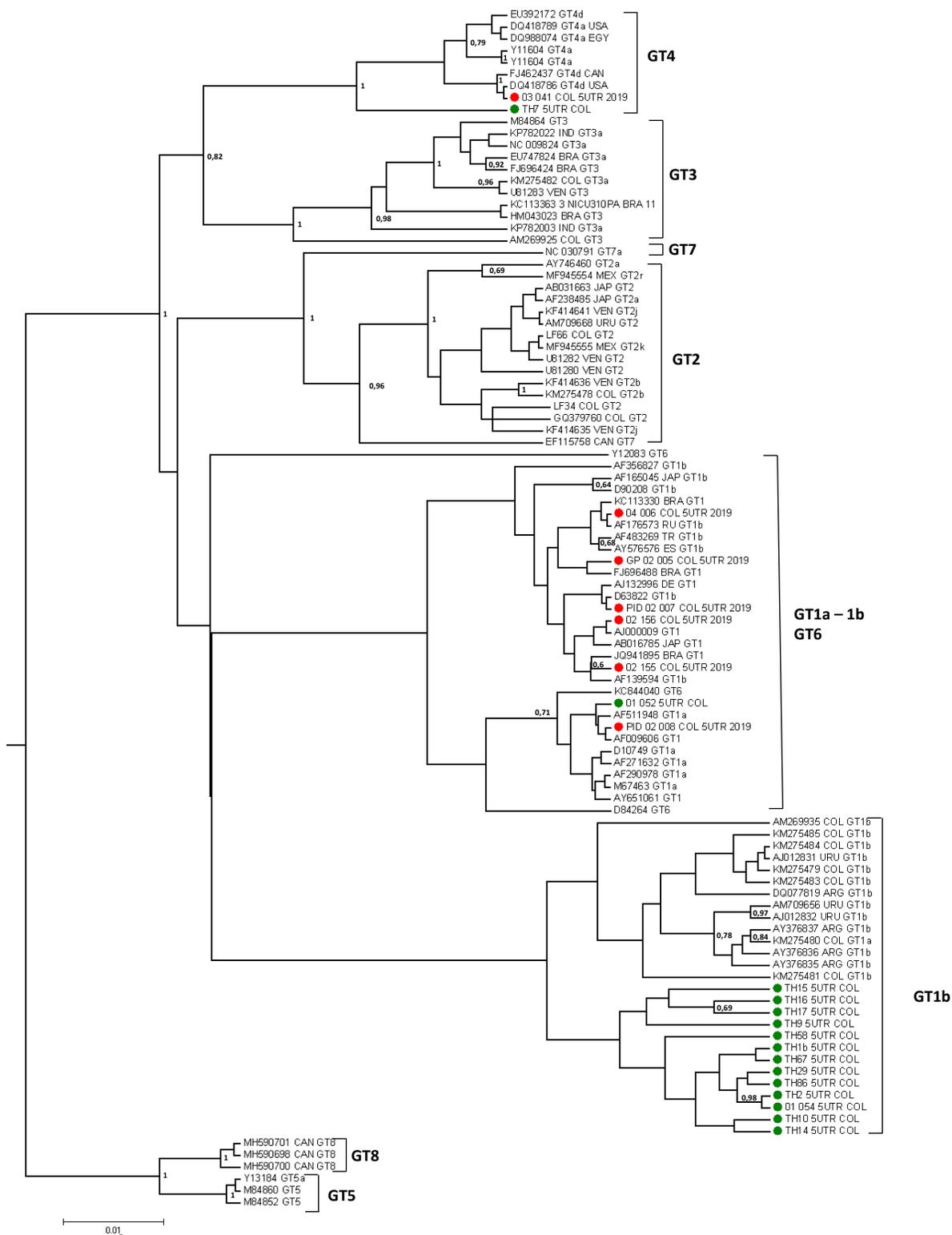


Figura 11. Árbol filogenético usando la región 5'UTR del VHC

Construcción mediante análisis bayesianos usando el programa BEAST versión 1.8.4 y el modelo de sustitución nucleotídica K2+G. En color rojo se observa la agrupación de las secuencias propias de este

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

estudio provenientes de las muestras de personas con antecedente de transfusión y del grupo control positivo en los genotipos 1a, 1b, y 4. Mientras que en color verde se observan las muestras de explante hepático provenientes de pacientes sometidos a trasplantes. Para este análisis se incluyeron todas las secuencias de la región 5UTR reportadas para Colombia, que no fueran idénticas para evitar la formación de politomías, las cuales se identifican con la palabra COL.

Para la construcción de los árboles filogenéticos usando la región NS5B no fue necesario hacer una depuración del DataSet ya que no se observaron secuencias idénticas como si fue el caso de 5'UTR. Para estos análisis se tuvieron en cuenta más de 150 secuencias, incluyendo todas las secuencias reportadas en Colombia (34) y alrededor de 70 secuencias reportadas en América (Argentina, Uruguay, Chile, Venezuela, México, Brasil, Estados Unidos, Canadá) (**Figuras 12, Tablas suplementarias 3 y 4**). Esta región del genoma si permitió la diferenciación de los 8 genotipos reportados, incluso de los subgenotipos 1a y 1b.

Se identificaron 17 secuencias de este trabajo de investigación, que se agruparon en genotipo 1, 12 en el subgenotipo 1b (02-155, 02-156, 04-006, y del grupo control 02-005, TH1b, TH9, TH14, TH15, TH16, TH17, TH29 y TH67) y cinco secuencias en el subgenotipo 1a (PID-02-007, PID-02-008, TH2, TH58, TH86) (**Figura 12**). Además, se identificó que la muestra TH3 agrupó en el genotipo 2a y las muestras 03-041 y TH7 agruparon en el genotipo 4, específicamente en el subgenotipo 4d y 4a, respectivamente (**Figura 13**). Las secuencias de NS5B correspondientes a las muestras 01-052 y TH10 no pudieron ser tenidas en cuenta para los análisis filogenéticos por baja calidad.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

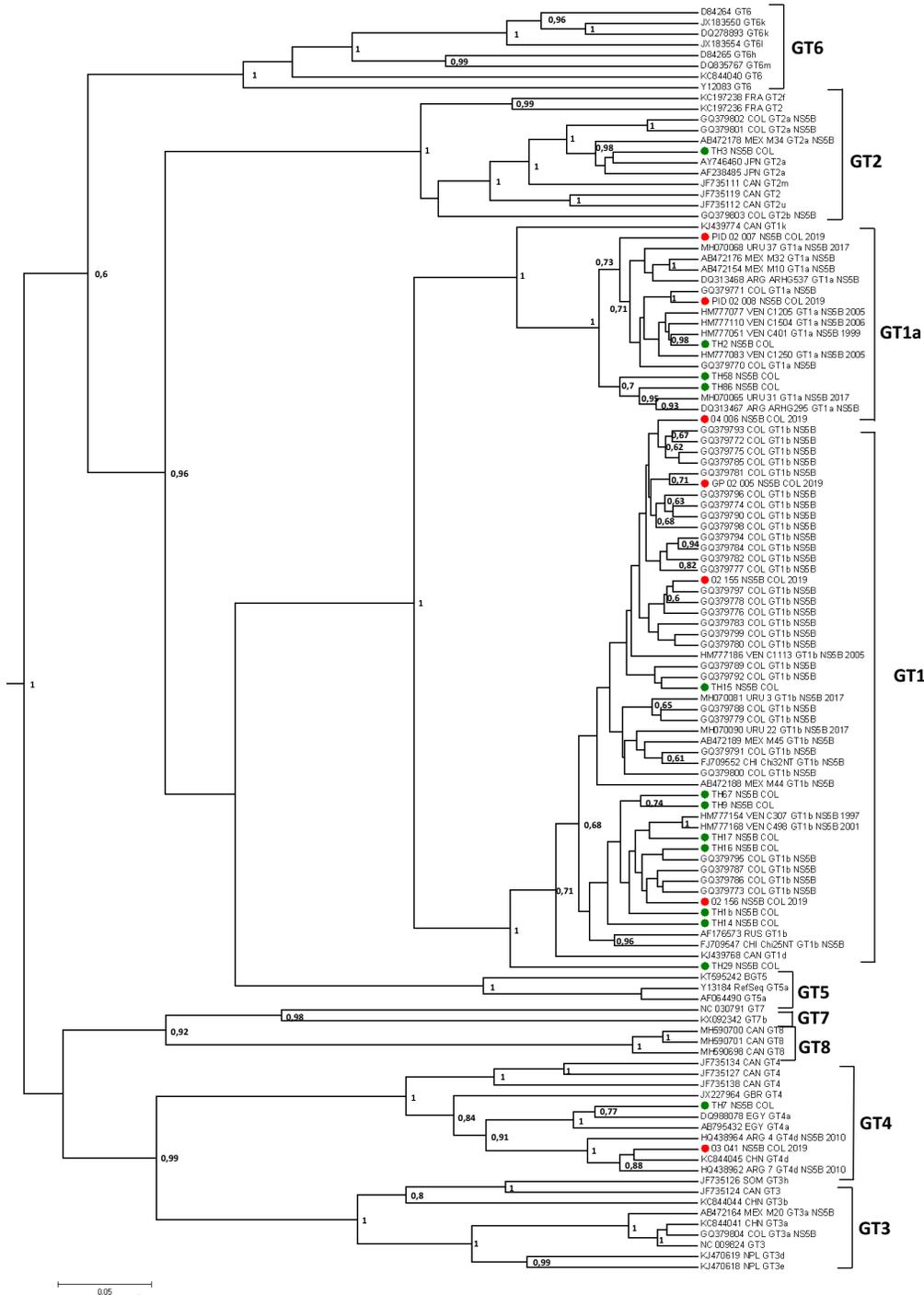


Figura 12. Árbol filogenético usando la región NS5B del VHC

Construcción mediante análisis bayesianos usando el programa BEAST versión 1.8.4 y el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G. En color rojo se observa la agrupación de las secuencias propias de este estudio provenientes de las muestras de personas con antecedente de transfusión y del grupo control positivo en los genotipos. Mientras que en color verde se observan las muestras de explante hepático provenientes de pacientes sometidos a trasplantes en los genotipos 1a, 1b, 2a y 4. Para este análisis se

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

incluyeron todas las secuencias de la región NS5B reportadas para Colombia, las cuales se identifican con la palabra COL.

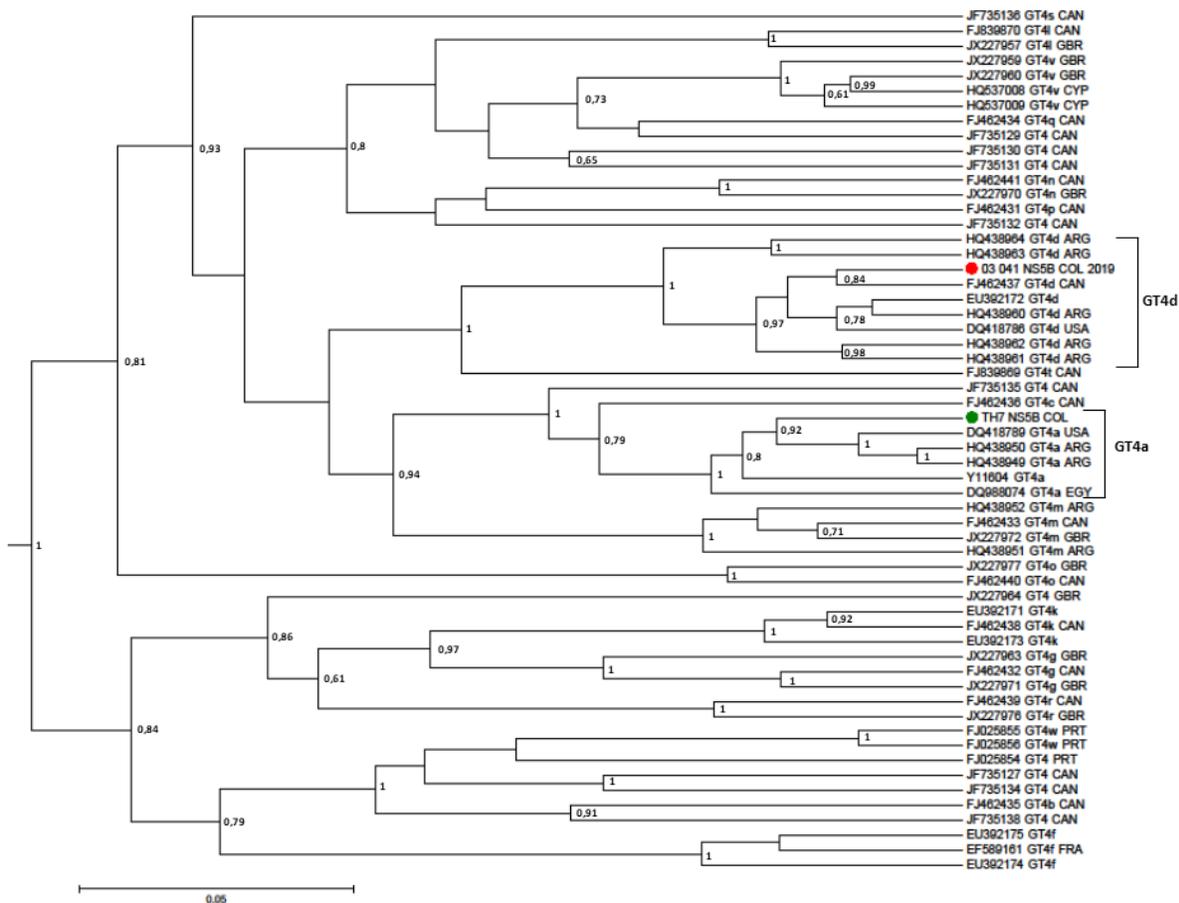


Figura 13. Árbol filogenético usando la región NS5B del VHC para subgenotipos del genotipo 4

Construcción mediante análisis bayesianos usando el programa BEAST versión 1.8.4 y el modelo de sustitución nucleotídica K2+G. Este árbol se construyó usando las secuencias referencia de genotipo 4 reportadas en el ICTV para la clasificación de subgenotipos. En color rojo se observa la agrupación de la secuencia propia de este estudio proveniente de las muestras de personas con antecedente de transfusión en el genotipo 4d. Mientras que en color verde se observa la muestra de explante hepático provenientes de pacientes sometidos a trasplantes en el genotipo 4a.

La muestra 02-155 agrupa en genotipo 1 muy cerca de secuencias del genotipo 6 si se construye el árbol filogenético con la región 5'UTR; sin embargo, el árbol con secuencias de la región NS5B del VHC presenta una correcta resolución filogenética de cada uno de los genotipos y un soporte de ramas de 1, siendo el valor de probabilidad posterior más

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

alto. Es por esto que se corrobora que la secuencia 02-155 agrupa en genotipo 1b si se realizan los análisis usando la región viral NS5B (**Figura 12**).

Las muestras identificadas como genotipo 1b (02-155, 02-156, 04-006, y del grupo control 02-005, TH1b, TH9, TH14, TH15, TH16, TH17, TH29 y TH67) (**Figura 12**), se encuentran agrupadas con secuencias de Colombia, Brasil, Argentina, Uruguay, Chile, Venezuela, México, Turquía, España y Japón. Por otro lado, las muestras que agrupan en el genotipo 1a (PID-02-007, PID-02-008, TH2, TH58 y TH86) están estrechamente relacionadas con secuencias de Colombia, Venezuela, México, Uruguay, Argentina, Brasil y Japón. La muestra caracterizada como genotipo 2a de VHC (TH3) agrupó con secuencias de Colombia, México y Japón. Por último, la muestra correspondiente al genotipo 4, subgenotipo 4a de VHC (TH7) agrupó con secuencias de Argentina, Estados Unidos, Canadá y Egipto; mientras que la muestra en la que se caracterizó el genotipo 4, subgenotipo 4d, (03-041) se agrupa con secuencias de Canadá, Estados Unidos, Argentina, China e Inglaterra. En el árbol no se incluyeron secuencias de genotipo 4 de Colombia porque no hay secuencias publicadas en las bases de datos (**Figuras 12, 13 y Tabla suplementaria 2, 3 y 4**).

Las muestras 02-155, 02-156, 04-006 que agruparon dentro del genotipo 1b son muestras de individuos provenientes de Medellín y Santa Marta, de los cuales 02-155 y 04-006 recibieron transfusión sanguínea en 1986 debido a embarazo ectópico y hemorragia postparto, respectivamente. En el caso de la muestra 02-156 corresponde a una persona transfundida en 1968 que no recuerda el motivo de la transfusión. La muestra del grupo control GP 02-005 que también agrupó en genotipo 1b es una persona con diagnóstico previo de hepatitis C e historia con tratamiento por IFN, pero sin antecedente de transfusión.

La muestra que agrupó en genotipo 4d es una muestra correspondiente a un individuo de Pereira que recibió la transfusión de sangre en 1970 por un accidente de tránsito y en el momento de la entrevista reportó diagnóstico de cirrosis (**Tabla 9 y 11**).

Las muestras que agruparon dentro del genotipo 1a son muestras correspondientes a los dos casos de PID del grupo control que reportan el uso de drogas inyectables y la

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

reutilización de agujas y jeringas como factor de riesgo. Estos individuos solo habían sido diagnosticados mediante prueba rápida.

Con respecto a las muestras de tejidos de explante hepático que agruparon en el genotipo 1b (TH1b, TH9, TH14, TH15, TH16, TH17, TH29 y TH67) fueron obtenidas entre 2001 y 2005 de pacientes con diagnóstico de hepatopatías terminales asociado a la infección por VHC y sometidos a transplante hepático. Con excepción de la muestra TH1 obtenida de un paciente con coinfección por el VHB y la muestra TH15 de un paciente con cirrosis hepática criptogénica y carcinoma hepatocelular. Las muestras TH2, TH58 y TH86 se agruparon en el genotipo 1a. La muestra con genotipo 2a (TH3) corresponde a un paciente con diagnóstico de cirrosis por VHC, mientras que la muestra con genotipo 4a (TH7) corresponde a un paciente con diagnóstico de cirrosis y carcinoma hepatocelular por VHC (**Tabla 12**).

Por último, en el análisis de secuencias NS5A y NS5B del genoma de VHC se identificaron sustituciones asociadas a resistencia (RAS) (**Tabla 3**) en 2 muestras de la población de estudio y en 6 muestras de explante hepático provenientes de pacientes con diagnóstico de hepatopatías terminales. En la **Figura 14a** se observa el alineamiento de aminoácidos de NS5A de VHC con base en la secuencia de referencia NC_004102 y se indica con un recuadro rojo la presencia de las mutaciones Q/L30E/H/R/S en las muestras 02-156 y 04-006 de personas con antecedente transfusional y en las muestras TH15, TH16 y TH17 de pacientes con diagnóstico de hepatopatías terminales y la mutación Y93C/H/N en la muestra TH16. En la **Figura 14b** se presenta el alineamiento de aminoácidos de NS5B de VHC con base en la secuencia de referencia NC_004102 y se presenta en un recuadro rojo la mutación C316H/Y/N en la muestra 02-156 y en las muestras TH9, TH14, TH16 y TH17.

Discusión

La búsqueda activa de personas con historia transfusional antes de 1996 se realizó mediante campañas educativas de promoción y prevención. Con ayuda de la oficina de comunicaciones de la Universidad de Antioquia, se diseñaron dos videos educativos y material gráfico (volantes y afiches) para la difusión en redes sociales y medios de comunicación como una medida de educación acerca de los factores de riesgo de la infección por Virus de las Hepatitis y las formas de prevención para la población, esto nos permitió acercarnos a las comunidades y captar a los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión. A pesar de las estrategias y esfuerzos realizados durante 2018 – 2019 e inicios del 2020 para completar el tamaño de muestra en Medellín (293 casos), solo se alcanzó el 54,2% (159/293) de participación voluntaria en el estudio; las charlas y actividades realizadas en los COVECOM (**Tabla suplementaria 1**) y avisos en periódicos y radio, fueron las actividades con mayor éxito para dar a conocer el proyecto. En Pereira y Santa Marta completaron el tamaño de muestra del proyecto (43 y 57 casos, respectivamente). Es de aclarar que, después de marzo del 2020, esta búsqueda activa tuvo que ser suspendida debido a la situación de la pandemia por SARS-CoV-2.

De las 260 personas que recibieron transfusión de sangre antes de 1996 y que decidieron participar en el estudio, se obtuvo una prevalencia de anticuerpos anti-VHC de 2,6%. Esta prevalencia fue menor a la esperada (> 10%), con base en las prevalencias descritas en dos estudios realizados en Colombia. (143). El primero es un estudio realizado en Medellín por Arroyave y colaboradores, en el cual, se describió una prevalencia de anticuerpos anti-VHC de 6,6% en 166 (11/166) individuos con historia transfusional antes de 1994 (único requisito de inclusión) por diferentes motivos como cirugías (79,7%), exanguinotransfusión (13,1%), accidente de tránsito (24,58%), hemorragia post parto (12,6%), accidente con arma de fuego (12,5%), aborto (5,17%), herida por arma corto punzante (4,86%), entre otros. Este estudio demostró la detección del genoma viral (región 5'UTR) en 7 de las 11 muestras positivas para anticuerpos (63,6%) (143). Por otro lado, un estudio multicéntrico de la Organización Panamericana de la Salud fue realizado en Medellín y Bogotá en 500 pacientes multitransfundidos. En este estudio se calculó una prevalencia de anti – VHC de 9% (45/500) en pacientes multitransfundidos,

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

donde los principales motivos de transfusión fueron hemofilia (32,2%), sangrado agudo (2,56%), anemia (7,1%), enfermedades oncohematológicas (3,4%) y hemodiálisis (6,1%). Se identificaron factores de riesgo con significancia estadística, entre ellos, las transfusiones de sangre antes de 1993 (OR= 13,68 95% IC 6,20-30,86), transfusión de más de 48 unidades de sangre o componentes sanguíneos (OR= 6,08 95% IC 3,06-12,1) y diagnóstico de hemofilia (OR= 18,03 95% IC 3,96-114,17). Di Filippo y colaboradores, reportan una detección del genoma viral (región 5'UTR) en 12 de las 45 muestras positivas para anticuerpos anti-VHC de este estudio (26,6%) (142,153) (**Tabla 9 y Figura 6**) (153).

La baja frecuencia de casos de infección por VHC en personas que recibieron transfusión de sangre antes de 1996 encontrada en el presente estudio (2,6%), podría estar relacionada con una baja circulación de VHC en las ciudades de estudio, con la implementación de tamizaje de unidades de sangre por el decreto 1571 emitido en 1993 y con la pérdida de anticuerpos dos o tres décadas después de adquirir la infección (15,167). La prevalencia de infección por VHC en el estudio de multitransfundidos mostró una reducción importante en pacientes transfundidos entre 1993-1995 (OR= 2,72, IC 95%), comparado con los pacientes transfundidos antes de 1993 (OR = 13,68 95% IC 6,20 – 30,86). Incluso la reducción de la prevalencia en el grupo de pacientes transfundidos después de 1995 fue de más del 90%, lo que coincide con la cobertura de tamizaje del 100% de unidades de sangre que obtuvo el país en ese año (142). Sin embargo, el antecedente de transfusión sigue siendo de importancia, tal como lo confirma el reporte de la cuenta de alto costo, en el que este factor de riesgo sigue siendo el más frecuente en la cohorte de pacientes de tratamiento con AAD (124).

Con respecto a la historia natural de la infección, se ha reportado una progresión lenta de enfermedad hepática en personas negativas para anticuerpos anti-VHC, 20 años después de adquirir la infección. Un estudio realizado en Alemania en 1018 mujeres que recibieron inmunoglobulina anti-D por medio de una transfusión de plasma procedente de un donante positivo para VHC, genotipo 1b, sugirió después de 20 años de seguimiento de datos clínicos y virológicos, de pruebas de función hepática y biopsia de hígado (datos recolectados cada 3 meses) que la infección por VHC presenta diferentes

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

manifestaciones en la producción o pérdida de anticuerpos y en el desarrollo de enfermedad hepática (167).

La reutilización de agujas y jeringas por personas que se inyectan drogas PID es un factor de riesgo que se encuentra en aumento, siendo considerado como uno de los factores de riesgo más importantes para adquirir la infección por VHC junto con las transfusiones de sangre. La OMS estima una prevalencia de anticuerpos anti-VHC del 50% en PID a nivel mundial (reporte del progreso mundial del tratamiento AAD, conferencia realizada por la OMS el 27 de enero de 2021). Para Colombia, diferentes investigadores han demostrado que la prevalencia de infección por VHC en PID se encuentra entre 7,6% - 47,4% (**Tabla 6**) (139,144,147,148,150,168). Es de aclarar, que el consumo de drogas intravenosas se ha convertido en una preocupación creciente para países no industrializados de ingresos medios y bajos mientras que en países industrializados como Estados Unidos y Australia se observa esta actividad desde la década de los 70. Según el Observatorio de Drogas de Colombia (O.D.C) se estima para 2017 una prevalencia de consumo de drogas mayor a 12,2%, sin discriminación por tipo de droga (169) pero se ha reportado un progresivo aumento desde la década de los 90 de los consumidores de heroína desde 5.200 personas en 1992 a 31.900 usuarios para 2013. Diferentes estudios se han llevado a cabo para demostrar el aumento de consumidores de drogas inyectables en Colombia (170,171).

Con respecto a otros factores de riesgo y a la significancia estadística obtenida en la prueba de *Chi* cuadrado empleada en el factor de riesgo de procedimientos odontológicos invasivos ($p=0,00057$), es importante aclarar que la reglamentación e implementación de las normas de bioseguridad en centros de salud ha permitido la disminución de infecciones iatrogénicas en Colombia. El estudio publicado por Yepes y colaboradores de casos y controles (172) aporta evidencia del riesgo de infección por VHC en pacientes hospitalizados, sometidos a cirugía o suturas antes de 1994 en centros hospitalarios de la región caribe lo que plantea la posibilidad de problemas de bioseguridad en centros de atención en salud. Estas condiciones pueden haberse presentado también en hospitales de otras regiones del país. Igualmente la diferencia en la prevalencia de la infección por VHC en pacientes sometidos a hemodiálisis entre lo reportado en el primer estudio y los

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

estudios posteriores (disminución de prevalencia e anti-VHC de 42% a 1%) (**Tabla 6**) sugieren que la transmisión del VHC en estas unidades ha disminuido gracias a las normas de bioseguridad y al seguimiento de los pacientes para identificar los casos positivos para VHC; identificación que permite la asignación de equipos a los pacientes positivos para este u otros virus de transmisión parenteral (173).

Adicionalmente según la guía colombiana de práctica clínica, a toda persona que haga parte de un grupo de riesgo (**Tabla 13**), incluyendo adultos mayores de 50 años, se le deberá realizar una prueba de anticuerpos anti-VHC en el nivel primario de atención para la tamización, diagnóstico y tratamiento de personas infectadas por VHC (174).

Tabla 13. Características de grupos de riesgo a la infección por VHC

1	Personas que han recibido intervenciones médicas o dentales en entornos de asistencia médica en los que las prácticas de control de infecciones están por debajo de los estándares
2	Personas que han recibido transfusiones de sangre antes del momento en el que las pruebas serológicas de VHC de los donantes de sangre se iniciara, o en países en los que las pruebas serológicas de VHC de las donaciones de sangre no se llevan a cabo.
3	Personas que se inyectan drogas.
4	Personas que han tenido tatuajes, perforaciones corporales (piercings) o procedimientos de escarificación en lugares en los que las prácticas para el control de infecciones están por debajo de los estándares.
5	Niños nacidos de madres infectadas con VHC.
6	Personas con infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).
7	Personas que han utilizado drogas psicoactivas intranasales.
8	Población privada de la libertad y/o personas encarceladas
9	Adultos mayores de 50 años

La pérdida de anticuerpos anti-VHC durante la infección crónica por VHC, también podría ser una explicación para los resultados obtenidos en el ensayo del 10% de las muestras

negativas seleccionadas al azar para anticuerpos anti-VHC, en el cual se identificó la presencia de bandas tenues en el ensayo de amplificación (**Figura 6d**) y un resultado preliminar positivo en el ensayo de qPCR (**Tabla 10**). Es necesario la realización de más estudios que permitan confirmar estos resultados, ya que esto podría traer implicaciones importantes en las estrategias que se llevan a cabo para el control de este virus en la población. Es importante recordar que el tamizaje a las unidades de sangre a transfundir se realiza por medio de la detección de anticuerpos anti-VHC, siendo un problema de salud pública los casos en los cuales se puedan perder los anticuerpos 20 años o más después de adquirir la infección. Es de aclarar que estos resultados se consideran preliminares ya que se debe confirmar la presencia del genoma viral por secuenciación.

Otras causas para los resultados obtenidos en el ensayo del 10% de las muestras negativas seleccionadas al azar para anticuerpos anti-VHC, podría deberse a que la carga viral de esas muestras es tan baja que hay limitaciones técnicas y no se logra detectar bien por RT-PCR, ni por secuenciación; aunque, no es el caso para qPCR ya que puede llegar a ser una técnica más sensible (175). Otros autores han demostrado que la baja carga viral no permite una correcta detección del genoma en otros virus, como en el caso del VHB (176,177). No se descarta la posibilidad de contaminación, aunque si se analiza el control negativo tanto en el ensayo de RT-PCR (**Figura 6d**) como en el ensayo de qPCR no se observa ninguna señal. Por lo que los resultados son inconcluyentes. Es necesario realizar nuevos ensayos que permitan concluir.

La amplificación de la región 5'UTR permitió hacer la detección del genoma viral, ya que es una región muy conservada entre todos los genotipos; sin embargo, esta región se ha reportado en la literatura, como una región en la que solo se podrían realizar análisis filogenéticos para una primera aproximación a la identificación de genotipos (100), adicionalmente el uso de NS5B permite determinar genotipo y subgenotipo. Por otro lado, las regiones NS5A y NS5B permiten identificar mutaciones asociadas a resistencia a los AAD, mediante análisis de secuencias obtenidas. La amplificación de las regiones NS5A y NS5B se hizo con base en lo publicado por Paolucci y colaboradores (178) y Pujol y colaboradores, respectivamente (164). La región NS5A es una de las regiones codificantes que mayor variabilidad presenta (44) por lo que optar por una única

estrategia de amplificación pangenotípica no fue posible, de manera que esta estrategia se enfocó en la amplificación de los subgenotipos 1a y 1b ya que son los subgenotipos con mayor prevalencia en la región Latinoamericana (178). Con respecto a la secuenciación de estos productos de amplificación de alrededor de 1300 pb para NS5A, se hace necesaria la implementación de un primer interno que permita abarcar la longitud del fragmento (178). Esta estandarización es de suma importancia puesto que serán las primeras secuencias de NS5A reportadas en Colombia y en el caso de NS5B apoyarán la información presente en las bases de datos, la cual se limita a un solo estudio realizado por Alvarado y colaboradores publicado en el 2010 (152).

Inicialmente se planteó la estandarización de la amplificación de la región NS5A para responder preguntas relacionadas con la evolución de VHC, como lo son eventos de duplicación de la región variable V3 (108), inserción (44), entre otros eventos reportados en la literatura; sin embargo, la baja frecuencia de casos positivos y por ende de secuencias obtenidas (7 secuencias) en este trabajo de investigación impidió avanzar en tal sentido. De igual manera, la región NS5B es lo suficientemente informativa para la determinación de tiempos de divergencia y de estudios filogeográficos que pudieran explicar el origen o introducción de un genotipo particular en el país, no obstante, se vieron limitados por la carencia de metadatos principalmente de las secuencias colombianas reportadas, tal como el año en el que se aisló el virus en las muestras de estudio. A pesar de que Alvarado y colaboradores no describen el año de aislamiento de las secuencias de VHC reportadas para NS5B en su estudio, estimaron mediante análisis bayesiano que el subgenotipo 1b fue introducido en Bogotá en 1950 y tuvo un crecimiento exponencial en la transmisión entre 1970-1990 por la importación de hemoderivados al país (152).

Los análisis filogenéticos realizados (**Figura 11, 12, 13**) permitieron hacer una comparación entre las dos regiones del genoma viral (5'UTR y NS5B) y confirmar que la región NS5B presenta mayor información filogenética que permite resolver los genotipos y subgenotipos. En el caso del árbol construido para la región 5'UTR (**Figura 13**), no se logró una correcta resolución de todos los genotipos; sin embargo, con el árbol construido usando las secuencias de NS5B se demostró que el genotipo 6 no se resuelve

filogenéticamente del genotipo 1 si se analiza la región 5'UTR (**Figura 13**). Otros autores también han demostrado que la región 5'UTR no es una región adecuada para la caracterización de genotipos, pero si permite hacer una primera aproximación a la identificación de genotipos (100–102).

A pesar de que, en las bases de datos, Colombia cuenta con una representación de 56 secuencias para la región 5'UTR, no pudieron ser tenidas en cuenta todas las secuencias de Colombia ya que al construir el árbol se ve reflejado en múltiples politomías y bajos soportes de ramas (**Figura 11**). Esto es debido a la conservación entre todos los genotipos para esta región no codificante por la presencia de la estructura secundaria IRES, que debe ser reconocida por el ribosoma para iniciar la traducción de la poliproteína viral y a la longitud de la secuencia de 251 pb (limitante). Por esta razón solo se incluyeron las secuencias de Colombia para la región 5'UTR que presentaran mayor información filogenética (**Figura 11 y Tabla suplementaria 2**). Se tuvieron en cuenta 13 secuencias colombianas provenientes del estudio de pacientes multitransfundidos (8 secuencias) y de donantes de sangre del Banco de Sangre de la Cruz Roja, sede Bogotá (4 secuencias). La mayoría de estas secuencias (10) agrupan con las secuencias de este trabajo de investigación en genotipo 1b, pero también se tuvieron en cuenta dos secuencias caracterizadas en genotipo 2b y 3a respectivamente del estudio de multitransfundidos. Para los análisis filogenéticos usando la región NS5B se incluyeron todas las secuencias de Colombia disponibles en las bases de datos (33 secuencias), de las cuales, la mayoría fueron reportadas por los autores como genotipo 1, subgenotipo 1b (**Tabla suplementaria 3**).

En este clado de genotipo 1b se agrupan 17 de las secuencias aisladas en este estudio (02-155, 02-156, 04-006, y del grupo control 02-005, TH1b, TH9, TH14, TH15, TH16, TH17, TH29 y TH67) con secuencias colombianas y mexicanas provenientes de donantes de sangre recolectadas entre 2003 – 2007 y 2006 – 2007 respectivamente, con secuencias de Venezuela y Uruguay de pacientes positivos para anticuerpos anti-VHC recolectadas entre 1995 – 2004 y 2015 - 2017 respectivamente y con secuencias de Chile provenientes de pacientes con enfermedad hepática crónica recolectadas entre 1997 – 2006. Este hallazgo coincide con lo reportado en Colombia y en el continente americano

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

donde el subgenotipo 1b prevalece en el continente (94,120,143,153,155,156). Adicionalmente concuerda con lo publicado en la literatura, ya que se ha reportado que el genotipo 1b es más frecuente en pacientes que adquirieron el VHC por medio de transfusiones de sangre (156,179).

Las secuencias del grupo control pertenecientes a PID (PID-02-007 y PID-02-008) y las muestras de tejidos TH2, TH58 y TH86 agruparon en el clado de genotipo 1a estrechamente relacionadas con dos secuencias provenientes de donantes de sangre en Colombia recolectadas entre 2003 – 2007 y con secuencias de Venezuela y Uruguay provenientes de individuos positivos para marcadores serológicos recolectadas entre 1995 – 2004 y 2015 - 2017 respectivamente. No fue posible encontrar mayor información acerca de los grupos poblacionales de Venezuela y Uruguay. Un análisis epidemiológico molecular realizado en Baltimore, Estados Unidos demuestra en una cohorte de PID que las secuencias de VHC están relacionadas con la coinfección por VIH/VHC, es decir, secuencias con estas características agrupan o se encuentran estrechamente relacionadas. Por lo que proponen que para la eliminación del VHC se debe ahondar en estrategias de prevención de la transmisión de VHC y VIH, impidiendo la reutilización de agujas y jeringas en esta población y diagnóstico oportuno para evitar nuevas co – infecciones (180).

El presente estudio es el primero en caracterizar la circulación del genotipo 4, subgenotipos 4a y 4d en Colombia. Las muestras 03-041 y TH7 agruparon con muestras de Estados Unidos, Canadá Argentina, China e Inglaterra, poca información se encuentra acerca de los grupos poblacionales donde se aislaron estas secuencias; pero se reporta que las secuencias de Canadá con las que agrupan las secuencias de este trabajo de investigación provienen de inmigrantes africanos residentes en Quebec, recolectadas entre 2002 y 2007 (**Figura 12 y Tabla suplementaria 3**). Santos y Colaboradores publicaron por primera vez en 2017, la circulación del genotipo 4 en Colombia en una prevalencia del 4% (62/1538). Este estudio corresponde a un análisis retrospectivo de resultados obtenidos entre 2003 y 2017 en tres laboratorios de referencia; en la publicación no se reportaron características sociodemográficas ni epidemiológicas de los casos y la caracterización de genotipos se realizó usando un estuche comercial, con

sondas específicas para cada genotipo por lo que las secuencias no estaban disponibles para incluirlos en los análisis filogenéticos del presente estudio (155). Según el último informe de la cuenta de alto costo presentado en el evento “Reuniones académicas: Un abordaje interdisciplinario de las hepatitis virales UdeA, MinSalud, OPS” realizado en 2020 se describió un aumento en la proporción de casos de VHC genotipo 4 en los pacientes en tratamiento con AAD, dado a que corresponde al segundo genotipo más frecuente con una prevalencia de 19% (271/1413) (181). Este genotipo 4 se ha reportado prevalente en Egipto, pero actualmente se reporta su circulación en Norteamérica, específicamente en Canadá, por la situación de inmigrantes (165,182). Por otro lado, desde 2011 se reporta la circulación del genotipo 4 en Latinoamérica, específicamente en Argentina, de los subgenotipos 4a (22%), 4d (67%) y 4m (11%); sin embargo, no fue posible determinar el grupo poblacional en el que circula este genotipo en Argentina ya que no hay datos de las secuencias disponibles, pero podría sugerirse de acuerdo a los árboles filogenéticos que hay un intercambio de cepas del VHC entre países latinoamericanos. Es importante anotar que para comprobar esta hipótesis sería de gran utilidad plantear análisis filogeográficos que permitan entender como ingresó este genotipo al país y hacer una aproximación del factor de riesgo que podría estar asociado a estos casos.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas NS5A y NS5B del VHC permitió identificar tres mutaciones asociadas a resistencia en las muestras obtenidas. En la región NS5A se identificaron las RAS Q30R y Y93H mientras que para la región NS5B se identificó la mutación C316N (**Figura 14**). La mutación Q30H se ubica entre la región N-terminal y el dominio I de la proteína NS5A mientras que la mutación Y93H se ubica en la mitad del dominio I, son cambios puntuales que disminuyen la afinidad del fármaco a la secuencia de la proteína (88,183). Estas mutaciones son consideradas de importancia clínica pues se ha demostrado que presentan una alta resistencia en cultivo celular (100 - 1000 veces más) comparado con el *wild type* (88). Diferentes estudios han demostrado la presencia de estas mutaciones, incluso de manera basal antes de iniciar el tratamiento con AAD, demostrando que la presión de selección ejercida por el tratamiento antiviral sobre las poblaciones de VHC, permite que haya un

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

recambio poblacional, donde las poblaciones virales con estas variantes asociadas a resistencia en baja proporción, van a convertirse en las poblaciones virales dominantes siendo responsables de la falla al tratamiento (92,184,185). Tal es el caso de un estudio realizado en 2144 participantes positivos para infección por VHC, genotipos 1a, 1b que fueron tratados con Sofosbuvir/Ledipasvir en el que se demostró un aumento de la mutación Q30R en el 1,43% doce semanas post – tratamiento. Se midió el nivel de resistencia en cultivo celular y se obtuvo para esta mutación un nivel entre 100 -1000 veces mayor que el *wild type*. En el caso de Y93H se demostró un aumento del 94,07% 24 semanas post - tratamiento con Ledipasvir y un nivel de resistencia mil veces mayor comparado con el *wild type* (185). Otro estudio realizado en 11 pacientes que presentaron fallas al tratamiento con AAD demostró la presencia de la mutación Y93H en un 38% antes de iniciar el tratamiento y posterior a la falla se identificó que esta proporción aumentó hasta un 99%. Este estudio es de suma importancia ya que se demostró que la resistencia de estas mutaciones en ratones quiméricos es producto de la presión de selección ejercida por el tratamiento, ya que posterior a las fallas del tratamiento en los ratones, la frecuencia de la mutación Y93H pasó de 0% al 98% (92). En la región NS5B se identificó la mutación C316N la cual se encuentra ubicada en el sitio activo de la polimerasa generando un impedimento alostérico para la unión del AAD (88). Al igual que las mutaciones para NS5A, se ha descrito que esta mutación C316N se encuentra de manera basal antes de iniciar el tratamiento y se ha reportado que presenta mayor prevalencia en pacientes con genotipo 1b (88,186), tal como se encontró en este trabajo.

A pesar de que se demostró la presencia de RAS usando técnicas como secuenciación directa (187), la secuenciación directa de Sanger solo permite la identificación de la secuencia consenso derivada de la variabilidad intrínseca de la población viral. Se ha demostrado que la secuenciación de nueva generación (88,90,92) podría ser una mejor aproximación al permitir la identificación de variantes minoritarias. Es importante mencionar que VHC al igual que otros virus con genoma ARN presenta una estructura de cuasiespecies en la persona infectada, es decir que en cada individuo se desarrolla una población heterogénea de virus conformada por variantes de mayor y menor frecuencia. La presencia de mutaciones asociadas a resistencia que puedan interferir con

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

el tratamiento de AAD ha demostrado la necesidad de realizar vigilancia genómica de las poblaciones virales presentes para asegurar la respuesta virológica sostenida principalmente en pacientes con infección por genotipo 1a, que presenten historia de falla al tratamiento y en pacientes con infección por genotipo 3, es necesaria la identificación de la variante Y93 con o sin historia de tratamiento (14,90,92).

Conclusiones

El estudio realizado en población con historia transfusional antes de 1996 presenta un bajo porcentaje de muestras positivas para anticuerpos anti – VHC (2,6%) según el valor estimado con base en los estudios previos realizados en Colombia (10%). Es necesario continuar con la búsqueda activa de casos de infección por VHC para dar cumplimiento con los planes de eliminación de las hepatitis virales, teniendo presente que el factor de riesgo de reutilización de agujas y jeringas por PID está en aumento, pero sin dejar de lado el estudio de los demás factores de riesgo.

Los análisis en la población de estudio confirman que el genotipo 1 de VHC, subgenotipo 1b, sigue siendo prevalente en el país, tal como se observó en el grupo control positivo y en las muestras de explante hepático. El subgenotipo 1a fue identificado en muestras de PID y en muestras de pacientes con hepatopatía y sometidos a trasplante y representa el segundo más frecuente en el presente estudio. Se destaca la primera caracterización del genotipo 4, subgenotipos 4a y 4d, en muestras de pacientes en Colombia.

La identificación de los genotipos y subgenotipos circulantes en la población de VHC es de importancia en la caracterización de epidemiología molecular. A pesar de que actualmente se cuenta con antivirales pangenotípicos es necesario la vigilancia genómica para analizar el cambio a través del tiempo de la circulación de nuevos genotipos y subgenotipos y adicionalmente es de especial importancia en el contexto de pacientes con factores de riesgo y con la posibilidad de reinfección.

Este es el primer estudio que reporta secuencias de la región NS5A del genoma del VHC obtenidas de individuos colombianos. Para NS5B solo se encuentran disponibles secuencias derivadas de un único estudio realizado con muestras en Colombia, pero con limitaciones en la información. Mientras que para la región 5'UTR, es la región con el mayor número de secuencias reportadas para Colombia en las bases de datos, pero con la limitante que para estudios filogenéticos generan politomías por su alto grado de conservación. Se evidencia la necesidad de más estudios filogenéticos con un mayor número de secuencias de VHC de origen colombiano disponibles.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

Se identificaron por primera vez sustituciones asociadas a resistencia (Q30R, Y93H y C316N) a los AAD en muestras de pacientes colombianos. La identificación de estas mutaciones en muestras de personas que aún no han recibido tratamiento antiviral sugiere la necesidad de análisis en los pacientes con infección crónica por VHC previo al inicio del tratamiento y así evitar fallas o recaídas en los pacientes.

Los resultados de este trabajo de investigación aportan nuevo conocimiento en epidemiología molecular del VHC. La caracterización de genotipos de VHC y de sustituciones asociadas a resistencia en pacientes colombianos podría ser considerada en la toma de decisiones y por tanto podría tenerse en cuenta para el control y eliminación de las hepatitis virales para el 2030.

Dentro de las limitaciones del estudio, se tuvieron dificultades en el acceso a la población con historia transfusional antes de 1996 ya que la difusión se realizó directamente por redes sociales y medios de comunicación, así como eventos de promoción y prevención de las hepatitis virales con énfasis en VHC. Otra manera de acceder a la población de estudio podría ser mediante la búsqueda en bases de datos de los bancos de sangre, sin embargo, no es posible acceder a las bases de datos, pues no se encuentran digitalizadas para las personas que recibieron transfusión de sangre antes de 1996. Adicionalmente, el confinamiento a la que fue sometida la población por la pandemia de SARS_CoV_2 en el 2020, restringió aún más el acceso a la población de estudio.

Por otro lado, la baja prevalencia de infección por VHC identificada en las personas con antecedente transfusional limitó el número de secuencias de VHC para incluir en análisis de evolución viral como la identificación del ancestro común más cercano y análisis de recombinación y duplicación en las secuencias de la proteína NS5A. Por lo que se considera necesario la realización de nuevos estudios que permitan analizar un mayor número de secuencias, teniendo en cuenta otras poblaciones de estudio.

Este trabajo de investigación hace parte del macroproyecto financiado por Minciencias: *“Prevalencia y Modelación de la Infección por el Virus de la Hepatitis C en Colombia”*.

Perspectivas

Es necesario confirmar por secuenciación la amplificación obtenida de las tres muestras negativas para anticuerpos anti-VHC, pero positivas para la detección del genoma, ya que estas muestras podrían corresponder a casos de infección oculta.

Es importante realizar análisis de evolución viral como la identificación del ancestro común más cercano, análisis de recombinación y duplicación en la región NS5A del genoma viral, que han sido reportados previamente por otros autores y análisis de filogeografía que nos permita identificar como ha sido la circulación de los genotipos y subgenotipos entre países latinoamericanos en los últimos años.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud O. Hepatitis C [Internet]. 2020. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/es/>
2. World Health Organization. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021 [Internet]. 2016. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf;jsessionid=4FF4ADAE2729D651581ACD0CB015B729?sequence=1>
3. Asamblea Mundial de la Salud. Hepatitis [Internet]. 2014. Disponible en: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA67/A67_R6-sp.pdf?ua=1
4. World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. Towards ending viral hepatitis. 2016 [citado 5 de junio de 2017]; Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf>
5. World Health Organization, World Health Organization, Global Hepatitis Programme. Global hepatitis report, 2017 [Internet]. 2017 [citado 5 de junio de 2017]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
6. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021;73(S1):4-13.
7. Petrick JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, et al. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978–2012. *Int J Cancer*. 2020;147(2):317-30.
8. GLOBOCAN. Cancer today [Internet]. [citado 25 de enero de 2021]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
9. Organización Mundial de la Salud. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. 2018;3.
10. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
11. Organización Mundial de la Salud. Globocan 2020 Colombia [Internet]. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>
12. Rusyn I, Lemon SM. Mechanisms of HCV-induced liver cancer: What did we learn from in vitro and animal studies? *Cancer Lett*. 10 de abril de 2014;345(2):210-5.
13. Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol Orlando Fla*. marzo de 2010;134(3):237-50.
14. Piecha F, Gänßler J-M, Ozga A-K, Wehmeyer MH, Dietz J, Kluwe J, et al. Treatment and re-treatment results of HCV patients in the DAA era. *PloS One*. 2020;15(5):e0232773.

15. Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 1571 de 1993 [Internet]. Diario oficial No 40989. Sec. Reglamentación Título IX de la ley 09 de 1979, 1571 oct 12, 1993 p. 30. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/DECRETO%20%201571%20DE%201993.pdf
16. Beltrán M, Raad J, Ayala M, Ching R. Tamizaje de enfermedades infecciosas en bancos de sangre, Colombia, 1995. *Biomédica*. 1 de junio de 1997;17(2):137-42.
17. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 21 de abril de 1989;244(4902):359-62.
18. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology*. 1 de marzo de 1985;88(3):773-9.
19. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [citado 6 de mayo de 2020]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification
20. Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 de julio de 2011;108(28):11608-13.
21. Kapoor A, Simmonds P, Scheel TKH, Hjelle B, Cullen JM, Burbelo PD, et al. Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. *mBio*. 9 de abril de 2013;4(2):e00216-13-e00216-13.
22. Lyons S, Kapoor A, Sharp C, Schneider BS, Wolfe ND, Culshaw G, et al. Nonprimate Hepaciviruses in Domestic Horses, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. diciembre de 2012;18(12):1976-82.
23. Smith DB, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. Proposed update to the taxonomy of the genera Hepacivirus and Pegivirus within the Flaviviridae family. *J Gen Virol*. noviembre de 2016;97(11):2894-907.
24. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky J-M, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primer*. 2 de marzo de 2017;3:17006.
25. Hourieux C, Ait-Goughoulte M, Patient R, Fouquenot D, Arcanger-Doudet F, Brand D, et al. Core protein domains involved in hepatitis C virus-like particle assembly and budding at the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Microbiol*. abril de 2007;9(4):1014-27.
26. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne J-P. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol*. septiembre de 2005;79(17):11353-65.
27. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:113-42.

28. Griffin Stephen D.C., Beales Lucy P., Clarke Dean S., Worsfold Oliver, Evans Stephen D., Jaeger Joachim, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 21 de diciembre de 2002;535(1-3):34-8.
29. Lorenz IC. The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 (NS2): An Up-and-Coming Antiviral Drug Target. *Viruses.* 6 de agosto de 2010;2(8):1635-46.
30. Hügler T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Kräusslich HG, Rice CM, et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology.* 25 de mayo de 2001;284(1):70-81.
31. Foster TL, Belyaeva T, Stonehouse NJ, Pearson AR, Harris M. All Three Domains of the Hepatitis C Virus Nonstructural NS5A Protein Contribute to RNA Binding. *J Virol.* 15 de septiembre de 2010;84(18):9267-77.
32. Ross-Thriepfand D, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *J Gen Virol.* abril de 2015;96(Pt 4):727-38.
33. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol.* octubre de 1999;6(10):937-43.
34. Vassilaki N, Mavromara P. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life.* julio de 2009;61(7):739-52.
35. Vassilaki N, Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J Biol Chem.* 17 de octubre de 2003;278(42):40503-13.
36. Baril M, Brakier-Gingras L. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(5):1474-86.
37. Mohamadi M, Azarbayjani K, Mozhgani S-H, Bamdad T, Alamdary A, Nikoo HR, et al. Hepatitis C virus alternative reading frame protein (ARFP): Production, features, and pathogenesis. *J Med Virol.* 29 de mayo de 2020;
38. Dalagiorgou G, Vassilaki N, Foka P, Boumlic A, Kakkanas A, Kochlios E, et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol.* junio de 2011;92(Pt 6):1343-51.
39. Moustafa S, Karakasiliotis I, Mavromara P. Hepatitis C Virus core+1/ARF Protein Modulates the Cyclin D1/pRb Pathway and Promotes Carcinogenesis. *J Virol.* 1 de mayo de 2018;92(9).
40. Tabata K, Neufeldt CJ, Bartenschlager R. Hepatitis C Virus Replication. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 de marzo de 2020;10(3).

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

41. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 2 de julio de 1999;285(5424):110-3.
42. Yamamoto H, Collier M, Loerke J, Ismer J, Schmidt A, Hilal T, et al. Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA. *EMBO J*. 14 de diciembre de 2015;34(24):3042-58.
43. Hashem Y, des Georges A, Dhote V, Langlois R, Liao HY, Grassucci RA, et al. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature*. noviembre de 2013;503(7477):539-43.
44. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(43):15992.
45. Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses*. septiembre de 2010;2(9):2078-95.
46. Lindenbach BD. Virion Assembly and Release. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:199-218.
47. Rai R, Deval J. New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: Targeting NS4B. *Antiviral Res*. 1 de mayo de 2011;90(2):93-101.
48. Daito T, Watashi K, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, et al. Cyclophilin inhibitors reduce phosphorylation of RNA-dependent protein kinase to restore expression of IFN-stimulated genes in HCV-infected cells. *Gastroenterology*. agosto de 2014;147(2):463-72.
49. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*. 11 de enero de 1996;334(2):77-81.
50. Bassendine MF, Sheridan DA, Bridge SH, Felmlee DJ, Neely RDG. Lipids and HCV. *Semin Immunopathol*. enero de 2013;35(1):87-100.
51. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 30 de octubre de 1998;282(5390):938-41.
52. Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de octubre de 1999;96(22):12766-71.
53. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*. 1 de octubre de 2002;21(19):5017-25.
54. Fan H, Qiao L, Kang K-D, Fan J, Wei W, Luo G. Attachment and Postattachment Receptors Important for Hepatitis C Virus Infection and Cell-to-Cell Transmission. *J Virol*. 01 de 2017;91(13).

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

55. Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, Davis C, Reynolds GM, Jennings A, et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol.* mayo de 2008;82(10):5007-20.
56. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspé G, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 15 de junio de 2003;187(12):1951-8.
57. Navas M-C, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin A-M, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol.* junio de 2002;67(2):152-61.
58. Milovanova SY, Lysenko Kozlovskaya LV, Milovanova LY, Mrykhin NN, Russkih AV, Muchin NA. HCV-associated mixed cryoglobulinemia and b-cell non-Hodgkin's lymphoma - pathogenetically related problems. *Ter Arkh.* 20 de junio de 2018;90(6):112-20.
59. Revie D, Salahuddin SZ. Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infections. *World J Gastroenterol.* 21 de marzo de 2014;20(11):2777-84.
60. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* junio de 2007;5(6):453-63.
61. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev.* 10 de octubre de 2007;59(12):1200-12.
62. Salvatierra K, Salvatierra K. Hepatitis C virus: A global public health problem. *Infectio.* junio de 2017;21(2):117-25.
63. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, et al. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J Virol.* julio de 2013;87(14):8169-78.
64. Moradpour D, Cerny A, Heim MH, Blum HE. Hepatitis C: an update. *Swiss Med Wkly.* 2001;131(21-22):291-8.
65. Jaramillo Aristizábal MC, García Rendón MV, Restrepo Gutiérrez JC. Serología en hepatitis virales. *Iatreia.* 2011;24(1).
66. Davis GL, Lau JY, Urdea MS, Neuwald PD, Wilber JC, Lindsay K, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology Baltim Md.* junio de 1994;19(6):1337-41.
67. Freiman JM, Tran TM, Schumacher SG, White LF, Ongarello S, Cohn J, et al. Hepatitis C Core Antigen Testing for Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 6 de septiembre de 2016;165(5):345-55.
68. McHutchison JG, Person JL, Govindarajan S, Valinluck B, Gore T, Lee SR, et al. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology Baltim Md.* enero de 1992;15(1):19-25.

69. Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K. Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology* Baltim Md. agosto de 1992;16(2):300-5.
70. Vallari DS, Jett BW, Alter HJ, Mimms LT, Holzman R, Shih JW. Serological markers of posttransfusion hepatitis C viral infection. *J Clin Microbiol.* marzo de 1992;30(3):552-6.
71. Shivkumar S, Peeling R, Jafari Y, Joseph L, Pant Pai N. Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 16 de octubre de 2012;157(8):558-66.
72. Jacobson IM, Brown RS, Freilich B, Afdhal N, Kwo PY, Santoro J, et al. Peginterferon alfa-2b and weight-based or flat-dose ribavirin in chronic hepatitis C patients: a randomized trial. *Hepatology* Baltim Md. octubre de 2007;46(4):971-81.
73. Jeffers LJ, Cassidy W, Howell CD, Hu S, Reddy KR. Peginterferon alfa-2a (40 kd) and ribavirin for black American patients with chronic HCV genotype 1. *Hepatology* Baltim Md. junio de 2004;39(6):1702-8.
74. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, Pockros PJ, Reddy KR, Hadziyannis SJ, et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* Baltim Md. mayo de 2006;43(5):954-60.
75. Feld JJ, Jacobson IM, Hézode C, Asselah T, Ruane PJ, Gruener N, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med.* 31 de diciembre de 2015;373(27):2599-607.
76. Zeuzem S, Foster GR, Wang S, Asatryan A, Gane E, Feld JJ, et al. Glecaprevir-Pibrentasvir for 8 or 12 Weeks in HCV Genotype 1 or 3 Infection. *N Engl J Med.* 25 de 2018;378(4):354-69.
77. Alqahtani S, Ozaras R, Isakov V, Wyles D, Ferenci P, Feld JJ, et al. Time to viral suppression is not related to achievement of SVR12 in HCV GT1-infected patients treated with ombitasvir/paritaprevir/ritonavir and dasabuvir with or without ribavirin. *J Viral Hepat.* 2017;24(4):280-6.
78. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* Baltim Md. octubre de 2005;42(4):962-73.
79. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* Baltim Md. enero de 2014;59(1):318-27.
80. Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* Baltim Md. octubre de 1996;24(4):778-89.

81. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet Lond Engl.* 31 de octubre de 1998;352(9138):1426-32.
82. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 22 de septiembre de 2001;358(9286):958-65.
83. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *N Engl J Med.* 31 de marzo de 2011;364(13):1195-206.
84. Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology Baltim Md.* octubre de 1998;28(4):1121-7.
85. Marcellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med.* 15 de noviembre de 1997;127(10):875-81.
86. American Association for the Study of Liver Disease A. Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C | HCV Guidance [Internet]. [citado 7 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.hcvguidelines.org/>
87. Treatment of Hepatitis C - 2018 EASL Recommendations [Internet]. EASL-The Home of Hepatology. [citado 7 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://easl.eu/publication/easl-recommendations-treatment-of-hepatitis-c/>
88. Li DK, Chung RT. Overview of Direct-Acting Antiviral Drugs and Drug Resistance of Hepatitis C Virus. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2019;1911:3-32.
89. Aldunate Caramori F, Echeverría Chagas N, Chiodi D, López P, Sánchez-Cicerón A, Fajardo Rossi Á, et al. Pretreatment Hepatitis C Virus NS5A/NS5B resistance-associated substitutions in genotype 1 uruguayan infected patients. 2018 [citado 23 de octubre de 2019]; Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/22071>
90. Wyles DL. Resistance to DAAs: When to Look and When It Matters. *Curr HIV/AIDS Rep.* diciembre de 2017;14(6):229-37.
91. Sullivan JC, De Meyer S, Bartels DJ, Dierynck I, Zhang EZ, Spinks J, et al. Evolution of treatment-emergent resistant variants in telaprevir phase 3 clinical trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* julio de 2013;57(2):221-9.
92. Kai Y, Hikita H, Morishita N, Murai K, Nakabori T, Iio S, et al. Baseline quasispecies selection and novel mutations contribute to emerging resistance-associated substitutions in hepatitis C virus after direct-acting antiviral treatment. *Sci Rep [Internet].* 30 de enero de

- 2017 [citado 14 de enero de 2021];7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5278351/>
93. Kukulj G, McGibbon GA, McKercher G, Marquis M, Lefèbvre S, Thauvette L, et al. Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *J Biol Chem.* 25 de noviembre de 2005;280(47):39260-7.
 94. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky J-M, Razavi H, Terrault N, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primer.* 2 de marzo de 2017;3:17006.
 95. Imran M, Waheed Y, Manzoor S, Bilal M, Ashraf W, Ali M, et al. Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors. *Virol J.* 22 de junio de 2012;9(1):126.
 96. Chen S, Yang C, Zhang W, Mahalingam S, Wang M, Cheng A. Flaviviridae virus nonstructural proteins 5 and 5A mediate viral immune evasion and are promising targets in drug development. *Pharmacol Ther.* 2018;190:1-14.
 97. Dunford L, Carr MJ, Dean J, Waters A, Nguyen LT, Ta Thi TH, et al. Hepatitis C Virus in Vietnam: High Prevalence of Infection in Dialysis and Multi-Transfused Patients Involving Diverse and Novel Virus Variants. *PLoS ONE [Internet].* 14 de agosto de 2012 [citado 26 de enero de 2021];7(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3419252/>
 98. Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol.* mayo de 1995;76 (Pt 5):1197-204.
 99. Rolfe KJ, Alexander GJM, Wreghitt TG, Parmar S, Jalal H, Curran MD. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* octubre de 2005;34(2):115-21.
 100. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol.* abril de 1993;74 (Pt 4):661-8.
 101. Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol.* abril de 2007;45(4):1102-12.
 102. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol.* mayo de 1994;75 (Pt 5):1053-61.
 103. di Filippo D, Cortes-Mancera F, Beltran M, Arbelaez MP, Jaramillo S, Restrepo JC, et al. Molecular characterization of hepatitis c virus in multi-transfused Colombian patients. *Virol J.* 23 de octubre de 2012;9:242.
 104. Chaiwong S, Sistayanarain A. Characterization of partial NS5B region among hepatitis C virus genotype 6 subtypes isolated from Thai blood donors: Characterization of NS5B Among Hepatitis C Virus Genotype 6. *J Med Virol.* octubre de 2016;88(10):1785-90.

105. Blach S, Zeuzem S, Manns M, Altraif I, Duberg A-S, Muljono DH, et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(3):161-76.
106. Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Tremblay CL. Hepatitis C Virus Genotype 7, a New Genotype Originating from Central Africa. Loeffelholz MJ, editor. *J Clin Microbiol*. marzo de 2015;53(3):967-72.
107. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis*. 20 de 2018;218(11):1722-9.
108. Le Guillou-Guillemette H, Ducancelle A, Bertrais S, Lemaire C, Pivert A, Veillon P, et al. Identification of a duplicated V3 domain in NS5A associated with cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HCV-1b patients. *J Clin Virol*. 1 de agosto de 2015;69:203-9.
109. Guillou-Guillemette HL, Pivert A, Bouthry E, Henquell C, Petsaris O, Ducancelle A, et al. Natural non-homologous recombination led to the emergence of a duplicated V3-NS5A region in HCV-1b strains associated with hepatocellular carcinoma. *PLOS ONE*. 10 de abril de 2017;12(4):e0174651.
110. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. septiembre de 2013;10(9):553-62.
111. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. noviembre de 2014;61(1 Suppl):S45-57.
112. Carney K, Dhalla S, Aytaman A, Tenner CT, Francois F. Association of tattooing and hepatitis C virus infection: a multicenter case-control study. *Hepatol Baltim Md*. junio de 2013;57(6):2117-23.
113. Reid S, Day CA, Bowen DG, Minnis J, Ludlow J, Jacobs S, et al. Vertical transmission of hepatitis C: Testing and health-care engagement. *J Paediatr Child Health*. 2 de enero de 2018;
114. Sharvadze L, Nelson KE, Imnadze P, Karchava M, Tsertsvadze T. Prevalence of HCV and genotypes distribution in general population of Georgia. *Georgian Med News*. diciembre de 2008;(165):71-7.
115. Baatarkhuu O, Kim DY, Ahn SH, Nymadawa P, Dahgwahdorj Y, Shagdarsuren M, et al. Prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus among apparently healthy individuals in Mongolia: a population-based nationwide study. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. diciembre de 2008;28(10):1389-95.
116. Ashraf S, Ahmad A. Viral hepatitis in Pakistan: challenges and priorities. *Asian Pac J Trop Biomed*. 1 de marzo de 2015;5(3):190-1.
117. Chiavetta JA, Escobar M, Newman A, He Y, Driezen P, Deeks S, et al. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

- lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 14 de octubre de 2003;169(8):767-73.
118. Department of Health and Human Services C for DC and P. Hepatitis C [Internet]. 2016. Disponible en: https://www.cdc.gov/knowmorehepatitis/media/pdfs/factsheet-boomers_sp.pdf
 119. Sayiner M, Wymer M, Golabi P, Ford J, Srishord I, Younossi ZM. Presence of hepatitis C (HCV) infection in Baby Boomers with Medicare is independently associated with mortality and resource utilisation. *Aliment Pharmacol Ther.* mayo de 2016;43(10):1060-8.
 120. Kershenobich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* julio de 2011;31 Suppl 2:18-29.
 121. Indolfi G, Nesi A, Resti M. Intrafamiliar transmission of hepatitis C virus. *J Med Virol.* 2013;85(4):608-14.
 122. Omar MZ, Metwally MA, El-Feky HM, Ahmed IA, Ismail MA, Idris A. Role of intrafamiliar transmission in high prevalence of hepatitis C virus in Egypt. *Hepatic Med Evid Res.* 2017;9:27-33.
 123. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento Hepatitis B y C 2017-2019 [Internet]. 2019. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Info-Evento.aspx>
 124. Ministerio de Salud y Protección Social. Situación de la hepatitis C crónica en el régimen contributivo de Colombia 2017-2018 [Internet]. 2017. Disponible en: <https://cuentadealtocosto.org/site/hepatitis-c/situacion-de-la-hepatitis-c-cronica-en-el-regimen-contributivo-de-colombia-2017-2018/>
 125. Lopez MC, Beltrán M, Navas MC. Epidemiología de la infección por el Virus de la Hepatitis C en Colombia. En Prensa.
 126. Echavarría E. Estudio de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en donantes de sangre y grupos de alto riesgo. *Acta Med Colomb.* 1992;17(1):11-5.
 127. B AC, Beltrán M, Olaya B, Hernández M. Riesgo de enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión en el Valle del Cauca, Colombia. *Colomb Médica.* 1999;30(1):13-18-18.
 128. Robinson JW, Rosas M, Guzman F, Patarroyo ME, Moreno A. Comparison of prevalence of anti-hepatitis C virus antibodies in differing South American populations. *J Med Virol.* 1996;50(2):188-92.
 129. Fernando de la Hoz. Epidemiología de la hepatitis C en Latinoamérica y Colombia. *Biomédica.* 2000;20:66-73.
 130. Coordinación Red Nacional de Bancos de Sangre y Servicios de Transfusión, Dirección Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud (INS). Informe Ejecutivo de la Red Nacional Bancos de Sangre Colombia 2008 - 2018. 2018.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

131. Farfán YA, Garzón MA, Tovar MHR, Molano JC, Lizarazo JI, Marulanda JC. Prevalencia de hepatitis C por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en donantes del banco de sangre. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2007;22(4):5.
132. Bedoya JAP, Márquez C, María M, Arias C, Antonio J. Seroprevalence of markers of transfusion transmissible infections in blood bank in Colombia. *Rev Saúde Pública.* diciembre de 2012;46(6):950-9.
133. Mejía C, Guerra G, Monroy R, Riaño R, Yervid RSA. CARACTERIZACIÓN DE DONANTES DE SANGRE DEL HEMOCENTRO CENTRO ORIENTE COLOMBIANO REACTIVOS PARA ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y PARA HEPATITIS C DURANTE LOS AÑOS 2012 Y 2013. 2014;(45):6.
134. Ruiz Mendoza L, Villegas Gracia R, Cardona Arias J. Prevalencia de agentes transmisibles por transfusión y factores asociados en un banco de sangre de Córdoba- Colombia 2014-2016. *Rev UDCA Actual Divulg Científica [Internet].* 26 de septiembre de 2018 [citado 23 de febrero de 2020];21(2). Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/969>
135. Arias JAC, Duque JF, Gutiérrez LFH. Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en un banco de sangre de Medellín-Colombia, 2005-2018. *Acta Biológica Colomb.* 1 de septiembre de 2019;24(3):486-92.
136. Zambrano-Plata GE, Cortez J. Seroprevalencia de vih, hepatitis b, hepatitis c, chagas y sífilis en donantes de bancos de sangre de cúcuta (colombia) 1.998 - 1.999. *Respuestas.* 2001;6(1):45-9.
137. Giraldo-Valencia EC, Morales-Gallo ME, Maya-Guerrero MA, Rendón-Castrillón LE, Arias JAC. Prevalencia de marcadores de infecciones transmisibles y su relación con variables demográficas en un banco de sangre de Antioquia- Colombia, 2010-2013. 2015;(1):17.
138. Quesada P, Whitby D, Benavente Y, Miley W, Labo N, Chichareon S, et al. Hepatitis C virus seroprevalence in the general female population from 8 countries. *J Clin Virol.* julio de 2015;68:89-93.
139. Cardona-Arias JA, Correa JCC, Higueta-Gutiérrez LF. Prevalence of hepatitis B/C viruses and associated factors in key groups attending a health services institution in Colombia, 2019. *PLOS ONE.* 22 de septiembre de 2020;15(9):e0238655.
140. Alvarado-Mora MV, Fernandez MFG, Gomes-Gouvêa MS, Neto RS de A, Carrilho FJ, Pinho JRR. Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV) and Hepatitis Delta (HDV) Viruses in the Colombian Population—How Is the Epidemiological Situation? *PLOS ONE.* 29 de abril de 2011;6(4):e18888.
141. Ramírez R, Fernández J, Guevara JG, Valderrama LA, León Castro A, Arango Álvarez J, et al. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis C en unidades de diálisis de Cali-Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2010;25(1).
142. Beltrán M, Navas M-C, De la Hoz F, Mercedes Muñoz M, Jaramillo S, Estrada C, et al. Hepatitis C virus seroprevalence in multi-transfused patients in Colombia. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* diciembre de 2005;34 Suppl 2:S33-38.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

143. Arroyave J, Álvarez C, Correa G, Balcázar N, Arbelaez MP, Navas MC, et al. Hepatitis C Infections among Individuals who Received Transfusions prior to 1994 in Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol.* diciembre de 2014;29(4):383-9.
144. Prieto Ortiz JE, Pardo SS, Díaz LR, Pacheco SH. Hepatitis C crónica: aspectos clínicos, serológicos y de tratamiento en dos centros de atención en Bogotá, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2014;29(4).
145. Yepes I de J, Lince B, Caez C, Vuono G de. Factores de riesgo para la infección por el virus de la hepatitis C en la Costa Caribe colombiana: un estudio de casos y controles. *Biomédica.* 1 de diciembre de 2016;36(4):564-71.
146. Rojas Rodríguez CA, Tobon Guevara A, Sepulveda Copete M, Rojas Rojas N, Jimenez Rivera DF. Hepatitis C: una aproximación clínica y epidemiológica en Cali, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol.* 19 de diciembre de 2018;33(4):379.
147. Berbesi-Fernández D, Segura-Cardona Á, Montoya-Vélez L, Castaño-Perez GA. Hepatitis C y VIH en usuarios de drogas inyectables en Armenia-Colombia. *Adicciones.* 15 de diciembre de 2015;27(4):246-52.
148. Toro-Tobón D, Berbesi-Fernandez D, Mateu-Gelabert P, Segura-Cardona ÁM, Montoya-Vélez LP. Prevalence of hepatitis C virus in young people who inject drugs in four Colombian cities: A cross-sectional study using Respondent Driven Sampling. *Int J Drug Policy.* 2018;60:56-64.
149. Toro-Tobón D, Berbesi-Fernández D. Prevalence of HIV/Hepatitis C Virus Co-Infection and Injection Risk Correlations in People Who Inject Drugs in Colombia: A Cross-Sectional Study Using Respondent Driven Sampling. *Subst Use Misuse.* 2020;55(3):414-23.
150. Berbesi-Fernández DY, Segura-Cardona AM, Montoya-Velez LP, Santamaría AÁ. Uso de heroína inyectada y el riesgo de hepatitis C en tres ciudades de Colombia. *Rev Bras Epidemiol.* julio de 2017;20(3):435-44.
151. Hoyos-Orrego A, Massaro-Ceballos M, Ospina-Ospina M, Gómez-Builes C, Vanegas-Arroyave N, Tobón-Pereira J, et al. Serological markers and risk factors for hepatitis B and C viruses in patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2006;48(6):321-6.
152. Mora MVA, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JRR. Molecular characterization, distribution, and dynamics of hepatitis C virus genotypes in blood donors in Colombia. *J Med Virol.* noviembre de 2010;82(11):1889-98.
153. di Filippo D, Cortes-Mancera F, Beltran M, Arbelaez MP, Jaramillo S, Restrepo JC, et al. Molecular characterization of hepatitis c virus in multi-transfused Colombian patients. *Virol J.* 2012;9:242.
154. Cortes-Mancera F, Loureiro CL, Hoyos S, Restrepo J-C, Correa G, Jaramillo S, et al. Etiology and Viral Genotype in Patients with End-Stage Liver Diseases admitted to a Hepatology Unit in Colombia. *Hepat Res Treat [Internet].* 2011 [citado 3 de abril de 2018];2011. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3177233/>

155. Santos Ó, Gómez A, Vizcaíno V, Casas MC, Ramírez M del P, Olaya P. Genotipos circulantes del virus de la hepatitis C en Colombia. *Biomédica*. 24 de enero de 2017;37(1):22-7.
156. Zein NN, Rakela J, Krawitt EL, Reddy KR, Tominaga T, Persing DH. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med*. 15 de octubre de 1996;125(8):634-9.
157. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2 de marzo de 2004;140(5):346-55.
158. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM, Pottathil MR, Marshall DJ, De Arruda M, et al. Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients. *J Clin Microbiol*. julio de 1998;36(7):1895-901.
159. García Deltoro M, Ricart Olmos C. Infección por el virus de la hepatitis C y nuevas estrategias de tratamiento. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 1 de mayo de 2019;37:15-9.
160. World Health Organization. Accelerating access to hepatitis C diagnostics and treatment. Overcoming barriers in low - and middle - income countries. Global progress report 2020. 2020.
161. Do A, Reau NS. Chronic Viral Hepatitis: Current Management and Future Directions. *Hepatol Commun*. marzo de 2020;4(3):329-41.
162. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 1692 de 2017 [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1692-de-2017.pdf>
163. Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follett E, et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol*. mayo de 1992;73 (Pt 5):1131-41.
164. Sulbarán MZ, Di Lello FA, Sulbarán Y, Cosson C, Loureiro CL, Rangel HR, et al. Genetic History of Hepatitis C Virus in Venezuela: High Diversity and Long Time of Evolution of HCV Genotype 2. *PLoS ONE* [Internet]. 13 de diciembre de 2010 [citado 20 de febrero de 2021];5(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001475/>
165. Smith D, Bukh J, Kuiken C, Scott A, Rice C, Simmonds P. HCV Classification. A web resource to manage the classification and genotype and subtype assignments of hepatitis C virus. *ICTV* [Internet]. HCV Classification. [citado 19 de enero de 2021]. Disponible en: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification
166. Álvarez-Díaz DA, Quintero PA, Peláez-Carvajal D, Ajami NJ, Usme-Ciro JA. Novel pan-serotype control RNA for dengue virus typing through real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. septiembre de 2019;271:113677.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

167. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* Baltim Md. julio de 2000;32(1):91-6.
168. Sepulveda J IC, Velez JP. View of Hepatitis B and C prevalence among heroin addicts in methadone maintenance treatment (MMT) and not in MMT in Pereira, Colombia [Internet]. [citado 3 de abril de 2018]. Disponible en: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/25212091/1161>
169. Observatorio de Drogas de Colombia. Colombia Drug Report 2017 [Internet]. 2017. Disponible en: http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/odc-libro-blanco/colombia_drug_report_2017.pdf
170. Alonso Castaño Pérez G, Calderón Vallejo GA. Consumo de heroína en Colombia, prácticas relacionadas e incidencia en la salud pública. *Rev Cuba Salud Pública*. diciembre de 2010;36(4):311-22.
171. Castaño Pérez GA, Calderón Vallejo GA. Patterns of heroin use in a sample of consumers in Medellín - Colombia. *Rev Bras Epidemiol*. septiembre de 2012;15(3):504-22.
172. Yepes I de J, Lince B, Caez C, Vuono G de. Factores de riesgo para la infección por el virus de la hepatitis C en la Costa Caribe colombiana: un estudio de casos y controles. *Biomédica*. 1 de diciembre de 2016;36(4):564-71.
173. Rolando J. Hepatitis C en hemodiálisis. *Rev Colomb Gastroenterol*. marzo de 2005;20(1):32-42.
174. Sistema General de Seguridad Social en Salud M de S y PS. Guía de Práctica Clínica Para la tamización, diagnóstico y tratamiento de personas con infección por el virus de la hepatitis C. Segunda edición [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/socializacion-gpc-hep-cGPC140219.pdf>
175. Andrade E, Rocha D, Fontana-Maurell M, Costa E, Ribeiro M, de Godoy DT, et al. One-step real-time PCR assay for detection and quantification of RNA HCV to monitor patients under treatment in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 1 de septiembre de 2018;22(5):418-23.
176. Perlejewski K, Bukowska-Ośko I, Rydzanicz M, Pawełczyk A, Caraballo Cortès K, Osuch S, et al. Next-generation sequencing in the diagnosis of viral encephalitis: sensitivity and clinical limitations. *Sci Rep*. 30 de septiembre de 2020;10(1):16173.
177. Wang X, Xu L, Chen Y, Liu A, Wang L, Xu P, et al. Integrating nested PCR with high-throughput sequencing to characterize mutations of HBV genome in low viral load samples. *Medicine (Baltimore)*. julio de 2017;96(30):e7588.
178. Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, Gulminetti R, Novati S, Barbarini G, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients. *Virology*. 17 de diciembre de 2013;10:355.
179. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbiol Rev*. abril de 2000;13(2):223-35.

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

180. Falade-Nwulia O, Hackman J, Mehta SH, McCormick SD, Kirk GD, Sulkowski M, et al. Factors associated with phylogenetic clustering of hepatitis C among people who inject drugs in Baltimore. *BMC Infect Dis.* 10 de noviembre de 2020;20(1):815.
181. Ministerio de Salud y Protección Social. Cuenta de Alto Costo. Día Mundial de lucha contra la Hepatitis [Internet]. 2019. Disponible en: https://www.cuentadealtocosto.org/site/images/Dia_mundial_Hepatitis_28072019.pdf
182. Cooper CL, Read D, Vachon M-L, Conway B, Wong A, Ramji A, et al. Hepatitis C virus infection characteristics and treatment outcomes in Canadian immigrants. *BMC Public Health.* 3 de septiembre de 2020;20(1):1345.
183. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol.* julio de 2013;11(7):482-96.
184. Yamashita T, Takeda H, Takai A, Arasawa S, Nakamura F, Mashimo Y, et al. Single-molecular real-time deep sequencing reveals the dynamics of multi-drug resistant haplotypes and structural variations in the hepatitis C virus genome. *Sci Rep.* 14 de febrero de 2020;10(1):2651.
185. Sarrazin C, Dvory-Sobol H, Svarovskaia ES, Doehle BP, Pang PS, Chuang S-M, et al. Prevalence of Resistance-Associated Substitutions in HCV NS5A, NS5B, or NS3 and Outcomes of Treatment With Ledipasvir and Sofosbuvir. *Gastroenterology.* septiembre de 2016;151(3):501-512.e1.
186. Ef D, Pr H, Jj O, Lk N. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatol Baltim Md [Internet].* enero de 2015 [citado 25 de marzo de 2021];61(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25123381/>
187. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, et al. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2014;9(1):e86413.

Material Suplementario

Tabla suplementaria 1. Visitas COVECOM

Lugar/barrio o comuna visitados	Fecha
Metrosalud / Comuna 6 – Doce de octubre	24/09/2018
	01/10/2018
	29/10/2018
Junta comunal Santa Mónica / Comuna 12 – La América, Campo Alegre	26/09/2018
	29/04/2019
Sede social Cristo Rey / Comuna 15 – Guayabal	27/09/2018
	03/10/2018
Casa de la cultura Los Colores / Comuna 11 – Laureles	04/10/2018
	05/10/2018
Unidad Intermedia de Metrosalud / Comuna 13 - San Javier	05/10/2018
	11/10/2018
Unidad Intermedia de Metrosalud / San Cristóbal	18/10/2018
	22/10/2018
Unidad Intermedia de Metrosalud / Comuna 5 - Castilla	22/10/2018
	26/10/2018
Unidad Intermedia de Metrosalud / Comuna 16 – Belén	26/04/2019
	08/04/2019
Casa de la cultura El Poblado / Comuna 14	12/04/2019
	12/04/2019
Centro de Salud Civitón / Comuna 7 – Robledo	12/04/2019
	23/04/2019
Museo Pedro Nel Gómez / Comuna 4 – Aranjuez	30/04/2019
	07/05/2019
Casa de Gobierno / Belén AltaVista	09/05/2019
	20/05/2019
Unidad Hospitalaria de Santa Cruz / Comuna 2	20/05/2019
	24/05/2019
Unidad Intermedia de Metrosalud / San Antonio de Prado	21/06/2019
Acción comunal /Comuna 1 – Santo Domingo	
Parque Biblioteca La Ladera / Comuna 8 – Villa Hermosa	
Unidad Intermedia de Metrosalud / Comuna 3 – Manrique – La Piloto	
Unidad Intermedia de Metrosalud / La Cruz	
Parque de la Vida / Comuna 10 – La Candelaria	

Acción comunal / Comuna 9 – Buenos Aires

01/06/2019

Acción Comunal / San Sebastián de Palmitas

18/06/2019

Tabla suplementaria 2. Descripción de secuencias usadas para el análisis filogenético usando la región genómica viral 5'UTR

Código GenBank	Genotipo	Subgenotipo	Tamaño	País	Año	Tipo de muestra
KM275484	1	1b	250 pb	Colombia	2005	suero
KM275480	1	1a	249 pb	Colombia	2005	suero
KM275485	1	1b	249 pb	Colombia	2005	suero
KM275483	1	1b	249 pb	Colombia	2005	suero
KM275481	1	1b	249 pb	Colombia	2005	suero
KM275479	1	1b	249 pb	Colombia	2005	suero
LF34	2	NR	200 pb	Colombia	2018	suero
LF66	2	NR	200 pb	Colombia	2018	suero
AF290978	1	1a	9365 pb	NR	NR	NR
AF511948	1	1a	9424 pb	NR	NR	NR
M67463	1	1a	9416 pb	NR	NR	NR
AF271632	1	1a	9618 pb	NR	NR	NR
AF009606	1	1a	9646 pb	NR	NR	NR
AY651061	1	1a	9441 pb	NR	NR	NR
D10749	1	1a	9502 pb	NR	NR	NR
DQ077819	1	1b	218 pb	Argentina	NR	NR
AJ012831	1	1b	253 pb	Uruguay	NR	NR
AY376837	1	1b	250 pb	Argentina	NR	NR
AY376836	1	1b	250 pb	Argentina	NR	NR
AY376835	1	1b	250 pb	Argentina	NR	NR
AJ012832	1	1b	252 pb	Uruguay	NR	NR
AM709656	1	1b	220 pb	Uruguay	NR	NR
AF483269	1	1b	9361 pb	Turquía	NR	NR
AY576576	1	1b	321 pb	España	NR	NR
AF139594	1	1b	9616 pb	NR	NR	NR
AF176573	1	1b	9600 pb	Rusia	NR	NR
AJ000009	1	NR	9379 pb	NR	NR	NR
AJ132996	1	NR	9418 pb	Alemania	NR	NR
AF356827	1	1b	9606 pb	NR	NR	NR
D63822	1	1b	9461 pb	NR	NR	NR
D90208	1	1b	9413 pb	NR	NR	NR

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

AM269935	1	1b	259 pb	Colombia	NR	NR
AY746460	2	2a	9689 pb	Japón	NR	NR
KM275478	2	2b	249 pb	Colombia	2005	suero
GQ379760	2	NR	200 pb	Colombia	2007	sangre
KF414641	2	2j	206 pb	Venezuela	2009	suero
KF414636	2	2b	206 pb	Venezuela	2006	suero
KF414635	2	2j	206 pb	Venezuela	2011	suero
U81282	2	NR	379 pb	Venezuela	1996	NR
U81280	2	NR	313 pb	Venezuela	1996	NR
MF945555	2	2k	386 pb	México	2015	plasma
MF945554	2	2r	286 pb	México	2015	plasma
AF238485	2	2a	9416 pb	Japón	NR	NR
AB031663	2	NR	9488 pb	Japón	NR	suero
AM709668	2	NR	220 pb	Uruguay	NR	NR
NC_009824	3	3a	9456 pb	NR	NR	NR
KM275482	3	3a	249 pb	Colombia	2005	suero
U81283	3	NR	231 pb	Venezuela	1996	NR
EU747824	3	3a	239 pb	Brasil	1997	sangre
KP782022	3	3a	218 pb	India	2015	plasma
KP782003	3	3a	209 pb	India	2015	plasma
AM269925	3	NR	257 pb	Colombia	NR	suero
M84864	3	NR	321 pb	NR	NR	NR
Y11604	4	4a	9355 pb	NR	NR	NR
M84862	4	NR	321 pb	NR	NR	NR
M84845	4	NR	321pb	NR	NR	NR
M84832	4	NR	321 pb	USA	NR	NR
Y13184	5	5a	9343 pb	África	1997	NR
M84860	5	NR	321 pb	USA	NR	NR
M84852	5	NR	321 pb	USA	NR	NR
Y12083	6	6a	9340 pb	USA	NR	NR
D84264	6	NR	9601 pb	NR	NR	NR
KC844040	6	NR	9447 pb	USA	NR	NR
NC_030791	7	7a	9443 pb	Canadá	NR	plasma
EF115758	7	NR	196 pb	Canadá	2006	suero
FJ69648	1	NR	341 pb	Brasil	NR	NR
JQ941895	1	NR	341 pb	Brasil	NR	NR
AB016785	NR	NR	9538 pb	NR	NR	NR
KC113330	1	NR	341 pb	Brasil	NR	NR
AF165045	NR	NR	9389 pb	NR	NR	NR
MH590701	8	NR	9437 pb	Canadá	NR	plasma
MH590698	8	NR	9409 pb	Canadá	NR	plasma
MH590700	8	NR	9547 pb	Canadá	NR	plasma

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

FJ696424	3	NR	339 pb	Brasil	NR	NR
HM043023	3	NR	339 pb	Brasil	NR	NR
KC113363	3	NR	339 pb	Brasil	NR	NR

NR. No Reportan

Tabla suplementaria 3. Descripción de secuencias usadas para el análisis filogenético usando la región genómica viral NS5B

Código GenBank	Genotipo	Subgenotipo	Tamaño	País	Año	Tipo de muestra
HM777110	1	1a	256 pb	Venezuela	2006	suero
HM777083	1	1a	256 pb	Venezuela	2005	suero
HM777051	1	1a	256 pb	Venezuela	1999	suero
HM777077	1	1a	256 pb	Venezuela	2005	suero
AB472176	1	1a	338 pb	México	NR	suero
AB472154	1	1a	373 pb	México	NR	suero
DQ313468	1	1a	379 pb	Argentina	NR	NR
DQ313467	1	1a	379 pb	Argentina	NR	NR
MH070068	1	1a	359 pb	Uruguay	2017	NR
MH070069	1	1a	359 pb	Uruguay	2017	NR
HM777186	1	1b	256 pb	Venezuela	2005	suero
HM777154	1	1b	265 pb	Venezuela	1997	suero
HM777168	1	1b	265 pb	Venezuela	2001	suero
AB472189	1	1b	338 pb	México	NR	suero
AB472188	1	1b	338 pb	México	NR	suero
FJ709552	1	1b	342 pb	Chile	NR	suero
FJ709547	1	1b	342 pb	Chile	NR	suero
MH070090	1	1b	1629 pb	Uruguay	2017	NR
MH070081	1	1b	1629 pb	Uruguay	2017	NR
AF176573	1	1b	9600 pb	Rusia	NR	NR
KJ439774	1	1k	9446 pb	Canadá	NR	Suero
KJ439768	1	1d	9451 pb	Canadá	NR	Suero
AY746460	2	2a	9689 pb	Japón	NR	NR
AF238485	2	2a	9416 pb	Japón	NR	NR
AB472178	2	2a	338 pb	México	NR	suero
KC197238	2	2f	9616 pb	Francia	NR	Plasma
KC197236	2	NR	9415 pb	Francia	NR	Plasma
JF735111	2	2m	9618 pb	Canadá	NR	Suero
JF735119	2	NR	9628 pb	Canadá	NR	Suero
JF735112	2	2u	9520 pb	Canadá	NR	Suero
NC_009824	3	3a	9456 pb	NR	NR	NR
AB472164	3	3a	338 pb	México	NR	suero

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

KC844044	3	3b	9434 pb	China	2011	NR
KC844041	3	3a	9477 pb	China	2011	NR
JF735126	3	3h	9633 pb	Somalia	NR	Suero
JF735124	3	NR	9583 pb	Canadá	NR	Suero
KJ470619	3	3d	9458 pb	Nepal	NR	NR
KJ470618	3	3e	9458 pb	Nepal	NR	NR
KC844045	4	4d	9427 pb	China	2010	NR
HQ438964	4	4d	209 pb	Argentina	2010	plasma
HQ438962	4	4d	209 pb	Argentina	2010	plasma
AB795432	4	4a	9617 pb	Egipto	2012	NR
DQ988078	4	4a	9050 pb	Egipto	2006	NR
JX227964	4	NR	9337 pb	Inglaterra	NR	NR
JF735127	4	NR	9441 pb	Canadá	NR	NR
JF735134	4	NR	9437 pb	Canadá	NR	NR
JF735138	4	NR	9563 pb	Canadá	NR	NR
Y13184	5	5a	9343 pb	NR	NR	NR
KT595242	5	NR	9100 pb	Burkina Faso	NR	NR
AF064490	5	5a	9408 pb	NR	NR	NR
Y12083	6	6a	9340 pb	NR	NR	NR
D84264	6	NR	9601 pb	NR	NR	NR
KC844040	6	NR	9447 pb	NR	NR	NR
DQ278893	6	6k	9430 pb	NR	NR	NR
JX183550	6	6k	9459 pb	NR	NR	NR
JX183554	6	6l	9423 pb	NR	NR	NR
DQ835767	6	6m	9444 pb	NR	NR	NR
D84265	6	6h	9621 pb	NR	NR	NR
NC_030791	7	7a	9443 pb	NR	NR	NR
KX092342	7	7b	9382 pb	NR	NR	NR
GQ379771	1	1a	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379770	1	1a	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379780	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379792	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379785	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379775	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379793	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379772	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379778	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379776	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379777	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379797	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379781	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379798	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

GQ379796	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379790	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379774	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379783	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379789	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379799	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379784	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379794	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379788	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379779	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379782	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379787	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379786	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379773	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379795	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379791	1	1b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379801	2	2a	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379802	2	2a	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379803	2	2b	313 pb	Colombia	NR	sangre
GQ379804	3	3a	313 pb	Colombia	NR	sangre
MH590701	8	NR	9437 pb	Canadá	NR	plasma
MH590700	8	NR	9547 pb	Canadá	NR	plasma
MH590698	8	NR	9409 pb	Canadá	NR	plasma

NR. No Reporta

Tabla suplementaria 4. Descripción de secuencias usadas para el análisis filogenético de genotipo 4 usando la región genómica viral NS5B

Código GenBank	Genotipo	Subgenotipo	Tamaño	País	Año	Tipo de muestra
JF35136	4	4s	9426 pb	Canadá	NR	Suero
FJ462440	4	4o	9422 pb	Canadá	NR	Suero
JX227977	4	4o	9286 pb	Inglaterra	NR	Plasma
EF589161	4	4f	9304 pb	Francia	NR	Suero
EU392174	4	4f	9298 pb	NR	NR	Plasma
EU392175	4	4f	9297 pb	NR	NR	Plasma
FJ462441	4	4n	9435 pb	Canadá	NR	Suero
JX227970	4	4n	9301 pb	Inglaterra	NR	Plasma
DQ418786	4	4d	9273 pb	USA	NR	NR
FJ462437	4	4d	9421 pb	Canadá	NR	suero

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

EU392172	4	4d	9299 pb	NR	NR	Plasma
HQ438964	4	4d	209 pb	Argentina	2010	Plasma
HQ438963	4	4d	209 pb	Argentina	2010	Plasma
HQ438962	4	4d	209 pb	Argentina	2010	Plasma
HQ438961	4	4d	209 pb	Argentina	2009	Plasma
HQ438960	4	4d	209 pb	Argentina	2009	Plasma
FJ462431	4	4p	9475 pb	Canadá	NR	Suero
FJ839869	4	4t	9488 pb	Canadá	NR	Suero
FJ839870	4	4l	9388 pb	Canadá	NR	Suero
JX227957	4	4l	9317 pb	Inglaterra	NR	Plasma
JF735130	4		9430 pb	Canadá	NR	suero
FJ462434	4	4q	9433 pb	Canadá	NR	suero
FJ735129	4	4	255 pb	NR	NR	NR
HQ537009	4	4v	9177 pb	Chipre	2006	NR
HQ537008	4	4v	9174 pb	Chipre	2005	NR
JX227960	4	4v	9270 pb	Inglaterra	NR	plasma
JX227959	4	4v	9323 pb	Inglaterra	NR	plasma
JF735131	4	4	9426 pb	Canadá	NR	suero
FJ462433	4	4m	9425 pb	Canadá	NR	suero
JX227972	4	4m	9305 pb	Inglaterra	NR	plasma
HQ438952	4	4m	207 pb	Argentina	2008	plasma
HQ438951	4	4m	209 pb	Argentina	2008	plasma
JF735132	4	4	9535 pb	Canadá	NR	suero
FJ462436	4	4c	9468 pb	Canadá	NR	suero
JF735135	4	4	9431 pb	Canadá	NR	suero
DQ988074	4	4a	9054 pb	Egipto	NR	plasma
Y11604	4	4a	9355 pb	NR	NR	NR
DQ418789	4	4a	9295 pb	USA	NR	NR
HQ438950	4	4a	209 pb	Argentina	2008	plasma
HQ438949	4	4a	209 pb	Argentina	2007	plasma
FJ462435	4	4b	9440 pb	Canadá	NR	suero
JF735138	4	4	9563 pb	Canadá	NR	suero
JF735127	4	4	9441 pb	Canadá	NR	suero
JF735134	4	4	9437 pb	Canadá	NR	suero
FJ025856	4	4w	9271 pb	Portugal	NR	plasma
FJ025854	4	4	9267 pb	Portugal	NR	plasma
FJ462432	4	4g	9435 pb	Canadá	NR	suero
JX227971	4	4g	9174 pb	Inglaterra	NR	plasma
JX227963	4	4g	9314 pb	Inglaterra	NR	plasma
FJ462439	4	4r	9440 pb	Canadá	NR	suero
JX227976	4	4r	9319 pb	Inglaterra	NR	plasma
EU392173	4	4k	9312 pb	NR	NR	plasma

Infección por el Virus de la Hepatitis en pacientes con antecedente transfusional antes de 1996

FJ462438	4	4k	9438 pb	Canadá	NR	suero
JX227964	4	4	9337 bp	Inglaterra	NR	plasma

NR. No Reporta