



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA  
ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST PARA EL  
DIAGNÓSTICO OPORTUNO DE HEPATITIS C**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:  
**SUSANA SÁNCHEZ MONROY**

ASESORES DE TESIS  
**E.B.C. MARÍA ANDREA FLORES ARCOS**  
**Q.F.B. BEATRIZ LUCÍA GONZÁLEZ MALDONADO**  
**Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

**Evaluación de la prueba de inmunocromatografía Advanced Quality™ Rapid Anti-HCV Test para el diagnóstico oportuno de Hepatitis C**

Que presenta la pasante: **Susana Sánchez Monroy**

Con número de cuenta: **302293643** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de mayo de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
<b>VOCAL</b>	MVZ. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>SECRETARIO</b>	QFB. Beatriz Lucía González Maldonado	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

Gracias a Dios por permitirme vida, salud, acompañarme en todo momento, ser mi ayuda, guía y fortaleza hasta este momento

Al Apóstol de Jesucristo, Doctor Honoris Causa Samuel Joaquín Flores quien me ha enseñado con su ejemplo y dedicación que “la fe es la medida del bienestar, el progreso y el desarrollo del ser humano para superarse cada día y ser útiles”. A él con todo amor y mi más sincero reconocimiento por su 50 aniversario de ministerio apostólico.

Agradezco a mis Padres a quienes reconozco su incansable labor, procurando siempre lo mejor para mí y mis hermanos aun más allá de sus fuerzas, han sido un gran ejemplo para mí en todos los aspectos, Dios recompense su amor, cuidados y desvelos, todos los días agradezco a Dios por tenerlos.  
¡Los amo!

Dedico este trabajo a mis hermanos y hermanas:  
René, José, Efraín, Mercedes, Ruth, Bet-súa, Martha, Esther, Abraham  
Gracias y Dios les pague por cuidarme, quererme, siempre me han motivado en todo cuanto he emprendido, saben que los Amo mucho.

A mis sobrinos:  
Samantha, José, Sury, Ana, Daniel, Andrea, Rodrigo, Omar, Abril, Dana, Elías,  
Jonathan

A todos mis compañeros y amigos que he tenido la dicha de conocer a lo largo de mi vida; a quienes conocí en la universidad Paloma, Leslie, I rasema, Blanca, Luis, Jessica, Vicente. Gracias por permitirme compartir con ustedes tantos buenos momentos, por estar conmigo cuando los he necesitado y por darme su amistad incondicional, ¡Los quiero Muchísimo!

A quienes tuve la oportunidad de conocer durante mi servicio social en el *H.G.Z N° 57*, gracias por su paciencia, cariño y amistad.

A mis Asesores quienes estuvieron conmigo durante este tiempo brindándome sus conocimientos, Gracias por su tiempo y dedicación

A la Química Andrea Flores Arcos quien me invito a realizar este proyecto y confió en mi para la realización de este, Andy gracias por tu infinita paciencia y tu gran amistad.

Gracias al *H.R.A.E.B.I* por permitirme realizar este proyecto, al jefe de laboratorio Esteban del toro Godínez y a todo el personal por apoyarme y brindarme su ayuda para culminarlo.

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	iii
ABREVIATURAS .....	iv
RESUMEN .....	vii
<b>1.0 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 HEPATITIS.....	1
1.2 EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) .....	1
1.3 TRANSMISIÓN .....	2
1.4 GENOMA VIRAL.....	3
1.5 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES .....	4
1.5.1 PROTEÍNA C.....	4
1.5.2 GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA (E1, E2) .....	5
1.5.3 p7.....	5
1.6 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES.....	5
1.6.1 NS2 .....	5
1.6.2 NS3 .....	5
1.6.3 NS4A .....	6
1.6.4 NS4B .....	6
1.6.5 NS5A .....	6
1.6.6 NS5B .....	6
1.7 CICLO DE REPLICACIÓN.....	7
1.9 LA INFECCIÓN POR EL VHC .....	9
1.10 SITUACIÓN MUNDIAL Y EN MÉXICO .....	10
1.11 RESPUESTA INMUNE .....	12
1.12 PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	16
1.13 TRATAMIENTO .....	18
1.14 DIAGNÓSTICO .....	20
1.14.1 PRUEBAS INDIRECTAS .....	20
1.14.2 PRUEBAS DIRECTAS .....	25
<b>2.0 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>3.0 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>30</b>
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
<b>4.0 HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>5.0 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	32
5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	32
5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	33
5.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES.....	33
5.4.1 INDEPENDIENTES.....	33
5.4.2 DEPENDIENTES.....	33
5.5 CAPTACIÓN DE PACIENTES.....	33
5.6 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLÍNICAS.....	34
5.7 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CON EL KIT COMERCIAL ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST .....	34

5.8 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHC DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA.....	36
ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST .....	40
<b>6.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>41</b>
6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
<b>7.0 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
7.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	45
7.2 EVALUACIÓN DE LA PRUEBA RAPIDA ADVANCEDQUALITY™ RAPID ANTI-HCV .....	49
<b>8.0 DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>9.0 CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>10.0 REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. PRINCIPALES GENOTIPOS EN PAÍSES INDUSTRIALIZADOS. ....	2
FIGURA 2. GENOMA DEL VHC. ....	4
FIGURA 3. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VHC. ....	8
FIGURA 4. PREVALENCIA MUNDIAL ESTIMADA DEL VHC. ....	10
FIGURA 5. CASOS DE HEPATITIS C POR ENTIDAD FEDERATIVA CON MAYOR FRECUENCIA HASTA LA SEMANA 47, 2013.....	12
FIGURA 6. ESQUEMA QUE DESCRIBE LA GENERACIÓN DE CUASIESPECIES VIRALES Y LA SELECCIÓN DE MUTANTES DE ESCAPE A LA NEUTRALIZACIÓN DURANTE LA INFECCIÓN POR VHC).....	17
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN DEL GENOMA DEL VHC Y LAS REGIONES QUE DETECTAN LOS INMUNOENSAYOS.....	22
FIGURA 8. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA.....	35
FIGURA 9. INTERPRETACIÓN DE POSIBLES RESULTADOS CON LA PRUEBA RÁPIDA. ....	36
FIGURA 10. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA BASADA EN QUIMIOLUMINISCENCIA.....	37
FIGURA 11. CUESTIONARIO UTILIZADO PARA RECABAR INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y DATOS DEL PACIENTE.....	43
FIGURA 12. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA REALIZAR LA PRUEBA.....	44
FIGURA 13. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA POR QUIMIOLUMINISCENCIA .....	46
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN SEROPOSITIVA POR GÉNERO.....	46
FIGURA 15. SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA VHC POR EDAD Y SEXO .....	47
FIGURA 16. FACTORES DE RIESGO EN LOS SUJETOS SEROPOSITIVOS .....	48
FIGURA 17. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS ENCONTRADOS EN LA POBLACIÓN .....	48
FIGURA 18. ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS C SEGÚN EL HRAEB.....	54
TABLA 1. HEPATITIS C PREVALENCIA REGIONAL DE 2010. ....	11
TABLA 2. RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN DEL EQUIPO DE QUIMIOLUMINISCENCIA ACCES 2 DE BECKMAN COULTER.....	39
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS ENSAYOS UTILIZADOS DE ANTICUERPOS ANTI-VHC	40
TABLA 4. TABLA DE CONTINGENCIA PARA EVALUACIÓN DE LA PRUEBA ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV .....	50

## ABREVIATURAS

**ALT:** Alaninaaminotransferasa

**APC:** Células Presentadoras de Antígeno (Antigen Presenting Cells)

**AST:** Aspartatoaminotransferasa

**BCIP/NBT:** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetra zolium

**CARDIF:** Adaptador CARD inductor de IFN $\beta$

**CDC:** Centro para el control y la prevención de enfermedades (centers for Disease control and Prevention)

**cDCs:** Células dendríticas convencionales (Conventional dendritic cells)

**C/O:** Valor de Corte (Cut Off)

**CLDN1:** Claudina 1

**EIA:** Enzimoinmunoanálisis

**HCA:** Hepatitis C Aguda

**HRAEBI:** Hospital Regional de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia

**HVR1:** Región Hipervariable 1 (Hypervariable región 1)

**IFN:** Interferón

**IL:** Interleucina

**IMPDH:** Inosinamonofosfato deshidrogenasa

**IRES:** Sitio interno de Entrada al Ribosoma (internal ribosome entry site)

**IRF3:** Factor regulador de Interferón 3 (Interferon regulatory factor 3)

**ISSSTE:** Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

**JAK:** Janus quinasa (Janus Kinase)

**LDLR:** Receptor de Lipoproteína de Baja Densidad (low density lipoprotein receptor)

**LiPA:** ensayo de sonda en línea (Line Probe Assay)

**MAVS:** Proteína mitocondrial de señalización (Mitochondrial antiviral signaling)

**NAT:** Técnica de Ácidos Nucleicos (Nucleic acid test)

**NK:** Asesina natural (Natural killer)

**UTR:** Región No Traducida (Untranslated región)

**OAS:** Oligoadenilatosintetasa

**OCLN:** Occludina

**ORF:** Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)

**PAMP:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen-associated molecular patterns)

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (polymerase chain reaction)

**pDCs:** Células dendríticas plasmocitoides (Plasmacytoid dendritic cells)

**PEG:** Pegilado

**RBV:** Ribavirina

**RdRp:** RNA-polimerasa RNA-dependiente

**RIBA:** Prueba de inmunotransferencia recombinante (Recombinant Immuno Blot Assay)

**RIG-1:** Gen inducible por ácido retinoico-1 (retinoic acid-inducible gene 1)

**RNA:** Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)

**SNPs:** Polimorfismo de un solo nucleótido (Single nucleotide polymorphism)

**RLU:** Unidades Relativas de Luz (Relative light units)

**SR-B1:** Receptor Scavenger Clase B tipo 1 (scavenger receptor class B type I)

**STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción (Signal Transducer and Activator of Transcription)

**TIR:** Receptor Toll/IL-1 (Toll/interleukin-1 receptor)

**TLRs:** Receptores tipo Toll (Toll-like receptor)

**TMA:** Amplificación mediada por transcripción (Transcription-Mediated Amplification)

**TRIF:** Adaptador inductor de IFN $\beta$  que contiene un dominio TIR (TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- $\beta$ )

**UIM:** Unidad de Investigación Multidisciplinaria

**VHC:** Virus de la Hepatitis C

**VPN:** Valor Predictivo Negativo

**VPP:** Valor Predictivo Positivo

Este trabajo recibió apoyo del proyecto SALUD-2012-1-181585: Análisis de la dinámica y evolución intrahospedero de las variantes virales resistentes a los fármacos de nueva generación contra el virus de la hepatitis C. del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, Conacyt-SSA-IMSS-ISSSTE

## RESUMEN

La hepatitis C es una enfermedad causada por el virus de la hepatitis C, actualmente es considerada un grave problema de salud en México y en el mundo, al ser una enfermedad asintomática es de gran importancia establecer el diagnóstico oportuno para iniciar el tratamiento cuanto antes; pues esta puede llegar a desarrollar consecuencias graves como cirrosis o cáncer hepático.

El diagnóstico de la enfermedad se inicia con el hallazgo de anticuerpos anti-VHC y posteriormente se confirma la infección activa con técnicas moleculares que son costosas, requieren personal y equipos especializados por lo cual gran parte de la población mexicana no tiene acceso a ellas.

En este trabajo se realizó la evaluación de una prueba rápida con el fin de conocer las ventajas y desventajas operacionales que presenta cuando se utiliza en población mexicana, para verificar si los resultados obtenidos son confiables. Dicha evaluación se realizó en las instalaciones del laboratorio del *Hospital Regional de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia (HRAEBI)* perteneciente al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y con la colaboración de la *Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM)* de la *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC)*.

La prueba “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST” basada en el principio de inmunocromatografía demostró ser efectiva y confiable al presentar una sensibilidad del 100% y una especificidad de 99.6%, en pacientes que pudieran haber estado en contacto con el virus. Del análisis epidemiológico se evidenció que la principal forma de contagio es a través de la transfusión sanguínea en pacientes mayores de 55 años, no se observó influencia del género para padecer la enfermedad. Se obtuvo una seroprevalencia del 2.1% para la población estudiada.

En conclusión, “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST” puede emplearse con seguridad como una alternativa para el diagnóstico serológico de la hepatitis C.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 HEPATITIS

Se define como hepatitis a la lesión inflamatoria difusa del hígado producida por diferentes agentes etiológicos, clínicamente puede ser asintomática o cursar con grados variables de insuficiencia hepática. Bioquímicamente presenta en forma constante, la elevación de aminotransferasas. Dentro de las diferentes causas que generan la enfermedad, se encuentran agentes infecciosos, trastornos metabólicos, y agentes físicos (Halabe, 2000).

Existen siete tipos diferentes de virus hepatotrópicos capaces de producir hepatitis; se les designa como A, B, C, D, E, F, G, aunque hay evidencias de la existencia de más virus que pueden causar inflamación y necrosis del hígado. Todos los virus hepatotrópicos tienen la capacidad de causar infección aguda del hígado pero sólo el B, C y D, ocasionan formas crónicas de la enfermedad (Halabe, 2000).

### 1.2 EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

El virus de la hepatitis C es la principal causa de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y cáncer hepático. Fue identificado en 1989, lo que abrió un nuevo camino para la virología al revelar el primer virus RNA humano de sentido positivo, claramente capaz de lograr la persistencia en su hospedador y de producir una enfermedad crónica (Rehermann, 2009).

El VHC es un virus RNA de cadena simple positiva que pertenece a la familia *Flaviviridae* miembro del género *Hepacivirus*, mide entre 30 y 80 nm de diámetro con una envoltura lipoproteica, la nucleocápside es de simetría icosaédrica y encierra 9400 bases alineadas en una única molécula de RNA de polaridad positiva. Se han identificado seis genotipos (1 a 6) y diversos subtipos distribuidos en todo el mundo Figura 1 (Romero, 2012).

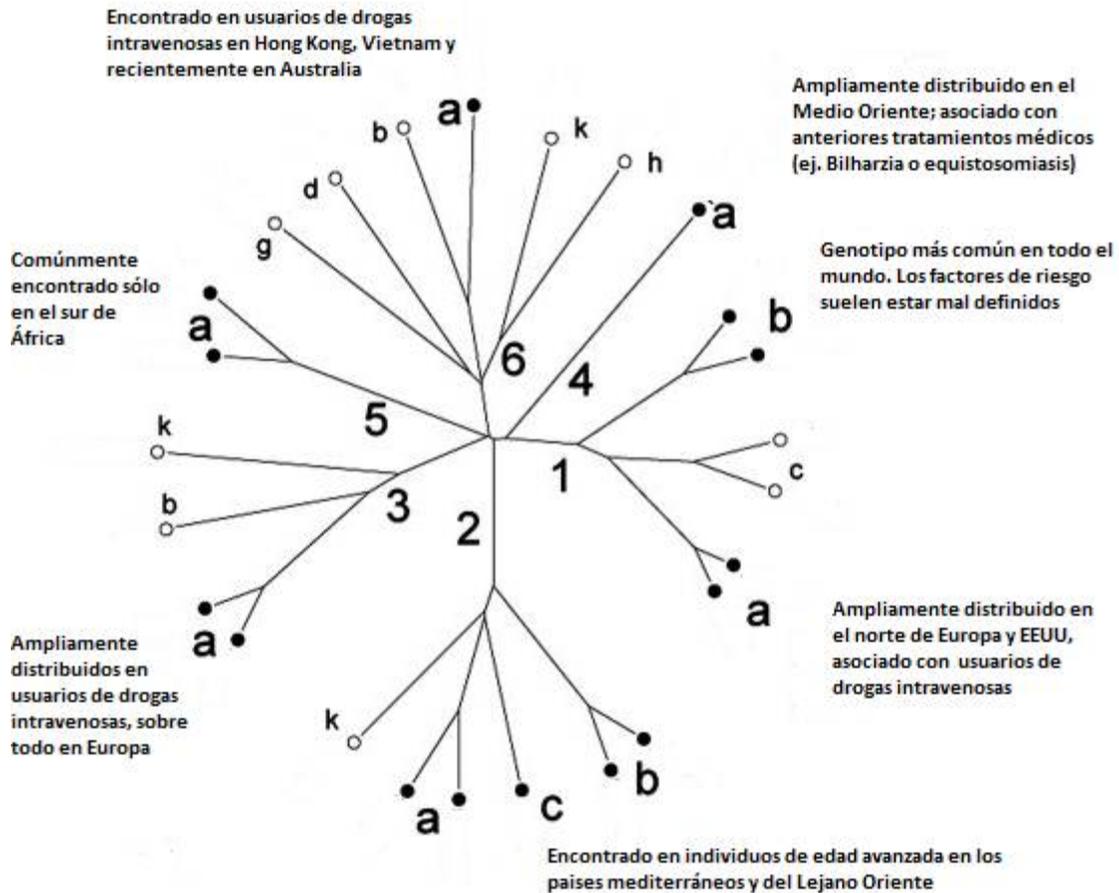


Figura 1. Principales genotipos en países industrializados. (Modificada de Simmonds, 2005)

Los modelos matemáticos de dinámica del VHC indican que un paciente con infección crónica produce alrededor de 10<sup>12</sup> viriones por día, con una vida media de 2 a 3 horas. El período de incubación para la hepatitis C se estima entre 4 y 10 semanas en el 80%-90% de los infectados (Lindenbach, 2007).

### 1.3 TRANSMISIÓN

La transmisión más eficiente del VHC es a través de grandes o repetidas exposiciones percutáneas directas a la sangre como:

- La transfusión
- El trasplante de donantes infectados
- El consumo de drogas intravenosas

Se transmite con menor eficiencia por pequeñas exposiciones percutáneas de dosis única:

- Pinchazos accidentales
- Exposición de mucosas a sangre o suero derivado de líquidos (relaciones sexuales con una pareja infectada, durante el nacimiento).

También hay evidencia de la transmisión nosocomial por:

- Contaminación cruzada de las agujas
- Jeringas reutilizadas
- Frascos de medicamentos de uso múltiple incluidos los procedimientos anestésicos (Alter, 2007; Contreras, 2011).

#### **1.4 GENOMA VIRAL**

El genoma del VHC tal como se muestra en la Figura 2 tiene un marco de lectura abierto (ORF) continuo, flanqueado por regiones no traducidas (UTR, untranslated region) en 5' y 3'. La UTR 5' del VHC contiene 341 nucleótidos, es la región más conservada y su principal función es permitir la unión del ribosoma de las células hospedadoras al RNA vírico en la estructura conocida como Sitio interno de Entrada al Ribosoma (IRES, internal ribosome entry sites). El marco de lectura abierto contiene los nucleótidos 9024 hasta 9111 dependiendo del genotipo. Se codifica una única poliproteína que se escinde por proteasas del hospedero en 10 proteínas virales individuales con diferentes características (Wook, 2013).

El tercio N-terminal de la poliproteína da lugar a las proteínas estructurales core (c), E1 y E2 (gp31 y gp70) que forman la partícula viral. Los dos tercios C-terminales codifican para las proteínas no estructurales, esenciales para la replicación del RNA viral, y son procesadas por dos proteasas virales: la autoproteasa zinc-dependiente NS2/NS3, que corta la unión NS2-NS3 y libera NS3, la cual, junto con su cofactor NS4A, es la proteasa encargada de cortar y liberar el resto de las proteínas no estructurales NS4B, NS5A y NS5B (Piñeiro, Martínez, 2012).

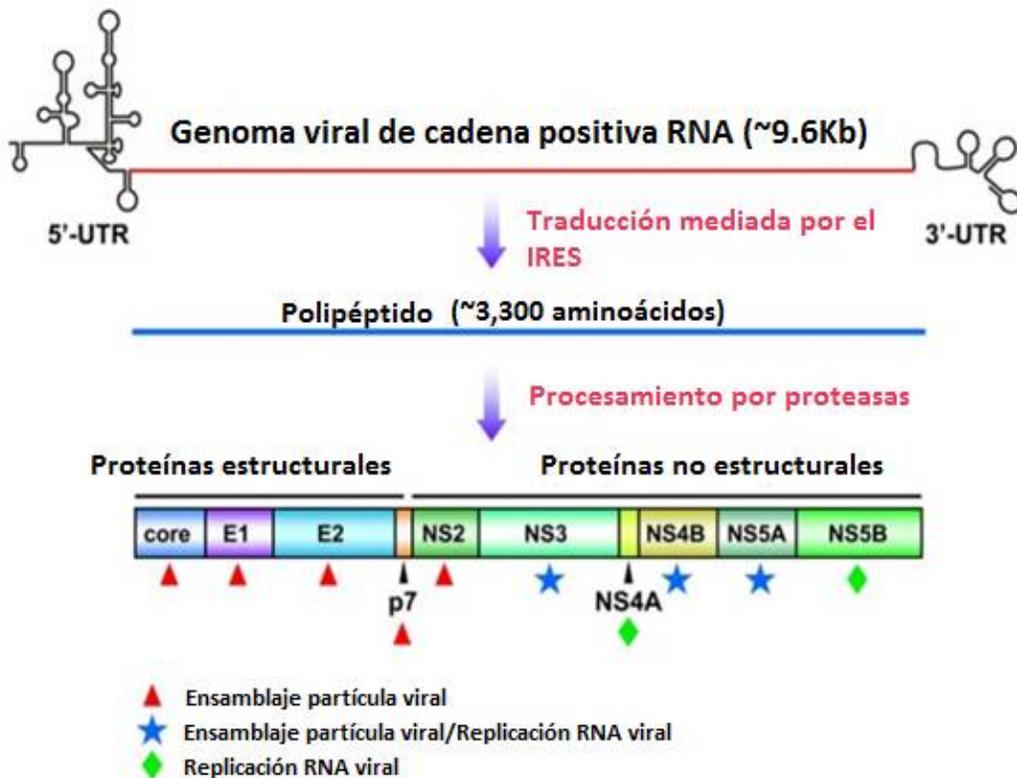


Figura 2. Genoma del VHC. (Modificada de Ke, 2012)

## 1.5 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

### 1.5.1 PROTEÍNA C.

Es la primer proteína codificada por el VHC, alternativamente se denomina proteína de la cápside o core, es rica en residuos de prolina, una vez madura se une al RNA viral para formar la nucleocápside (Lindebach, 2007).

La mayor parte de la proteína C se encuentra en el citoplasma, donde se ha unido a la membrana del RE (Retículo endoplásmico) o localizada en la superficie de gotas de lípidos. Además de su papel en la formación de la nucleocápside, puede modular la transcripción de genes, proliferación, muerte y señalización celular, su potencial oncogénico; puede interferir con el metabolismo de los lípidos y puede suprimir la respuesta inmune del hospedero (Penin, 2004).

### **1.5.2 GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA (E1, E2)**

Las dos glicoproteínas de la envoltura E1 (aprox. 31 kDa) y E2 (aprox. 70 kDa) se cree que desempeñan papeles fundamentales en los diferentes pasos del ciclo de replicación. En la actualidad, existe una fuerte evidencia de que son esenciales para la entrada a la célula hospedador, mediante la unión a receptores y la inducción de la fusión con una membrana de la célula hospedador (Penin, 2004).

### **1.5.3 p7**

El polipéptido p7 es una pequeña proteína hidrofóbica, necesaria para el ensamblaje viral. Algunos datos importantes indican que p7 puede mediar la permeabilidad de iones de la membrana. Estas propiedades sugieren que p7 pertenece a la familia de las porinas y podría tener un papel importante en la liberación de partículas virales y la maduración (Penin, 2004).

## **1.6 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES**

### **1.6.1 NS2**

Es una proteína integral de membrana no glicosilada que no parece ser esencial para la formación del complejo de replicación. La molécula NS2 junto con el primer tercio N-terminal de la NS3 conforman una autoproteasa zinc-dependiente que induce el corte entre NS2 y NS3. Se desconoce si NS2 por sí sola realiza alguna otra función viral (Guarner, 2008; Penin, 2004).

### **1.6.2 NS3**

NS3 es una molécula multifuncional ya que presenta, en el primer tercio (N-terminal) de su estructura, actividad de serin proteasa y en el resto, función de RNA helicasa necesarias para la traducción y replicación del genoma viral. Para la actividad enzimática el dominio serin proteasa de NS3 requiere de la interacción de NS4A, así como la coordinación estructural de un ion  $Zn^{2+}$  (Lindenbach, 2007).

### **1.6.3 NS4A**

Es la proteína NS más pequeña; sin embargo, tiene múltiples funciones en el ciclo de vida del virus, es un cofactor de la serin proteasa, facilita el reconocimiento de sustratos de RNA por la NS3 proteasa/helicasa (Lindenbach, 2007).

### **1.6.4 NS4B**

Es una proteína integral de membrana que contiene cuatro dominios transmembranales, es probable que juegue un papel fundamental en la organización de la membrana. Se ha encontrado que la expresión de NS4B induce la formación de una banda membranosa aparentemente derivada del RE que alberga todas las proteínas estructurales y no estructurales, así como RNA virales. Por lo tanto, una función de NS4B puede ser la de inducir una alteración de la membrana que sirve como andamio para la formación del complejo de replicación (Penin, 2004; Lindenbach, 2007).

### **1.6.5 NS5A**

Es una zinc-metaloproteínasa altamente fosforilada asociada a membrana de función desconocida, pero parece ser que tiene un papel fundamental en la regulación de la replicación viral (Guarner, 2008).

### **1.6.6 NS5B**

Es la enzima más importante en la replicación del RNA viral, al igual que otras polimerasas, NS5B tiene estructura de mano derecha. NS5B es la RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRp) clave para la síntesis de nuevos genomas de RNA y al igual que las demás RNA polimerasas, no posee mecanismos de corrección de error, de manera que cada mutación introducida al azar durante el proceso de copia es fijada en la nueva secuencia sintetizada. Debido a que NS5B y NS3 son enzimas clave para la replicación del virus, en la actualidad, se están desarrollando terapias específicas para bloquear su actividad (Lindenbach, 2007; Piñeiro, 2012).

## 1.7 CICLO DE REPLICACIÓN

El VHC infecta principalmente a los hepatocitos, a pesar de que se han detectado genomas virales y antígenos en células de Kupffer y endoteliales. El virus también se encuentra en células mononucleares de sangre periférica y ganglios linfáticos. Lo que habla en favor de su linfotropismo y sugiere la existencia de fuentes extrahepáticas de virus infeccioso durante la infección persistente (Lloyd, 2007).

La entrada viral en la célula hospedera implica una compleja serie de interacciones. Se basa en las interacciones específicas con moléculas de superficie celular, es decir; receptores que determinan la especificidad de unión y el tropismo de la célula huésped, incluyendo el tetraspanin CD81, el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), Claudina 1 (CLDN1), y Ocludina (OCLN) como se muestra en la Figura 3 (Wook, 2013; Ke, 2012).

La partícula viral se asocia con lipoproteínas para unirse a glicosaminoglicanos (GAGs) y al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), luego interactúa con CD81 y SR-BI. La partícula viral se interioriza por el proceso de endocitosis dependiente del pH, mediada por clatrina, las glicoproteínas de la envoltura de las partículas virales se fusionan con la membrana endosomal, pierde su envoltura y se libera el genoma viral en el citoplasma (Wook, 2013; Ke, 2012).

Una vez alcanzado el citoplasma, la traducción se inicia en el RE rugoso a través del IRES en la región 5' UTR y genera una única poliproteína de aproximadamente 300 aminoácidos que se escinde por proteasas celulares y virales en 10 proteínas estructurales y no estructurales, el procesamiento comienza por el extremo N-terminal con la actuación de las enzimas celulares, que liberan las proteínas estructurales (E1 y E2) y la proteína p7. A continuación, el procesamiento continúa en el orden preferente NS3/4A, NS5A/B, NS4A/B, NS4B/5A, liberándose las proteínas no estructurales (Rehermann, 2009).

Los productos derivados de este proceso se asocian a las membranas del RE formando el complejo replicativo de vesículas de membrana doble que actúan como “fábricas de replicación” y sirven como plataforma para el montaje de

complejos de proteínas (replicasa) que catalizan la amplificación del genoma de RNA viral, se derivan principalmente del RE. Estos reordenamientos de membrana son inducidos por la expresión de NS4B.

La replicación inicia con la síntesis de un genoma de cadena negativa. El RNA de cadena negativa entonces sirve como una plantilla para las múltiples rondas de cadena positiva nacientes. Los genomas nacientes RNA de cadena positiva se pueden traducir para producir nuevas proteínas virales y servir como plantillas para la replicación o se empaqueta en cápsides nacientes, esto puede ocurrir en el RE (Romero Col., 2012; Wook, 2013; Lindenbach, 2007).

El proceso de liberación no se entiende completamente. Sin embargo, parece estar estrechamente relacionado con el metabolismo lipídico, los viriones se cree que son exportados y liberados por la vía secretora (Wook, 2013).

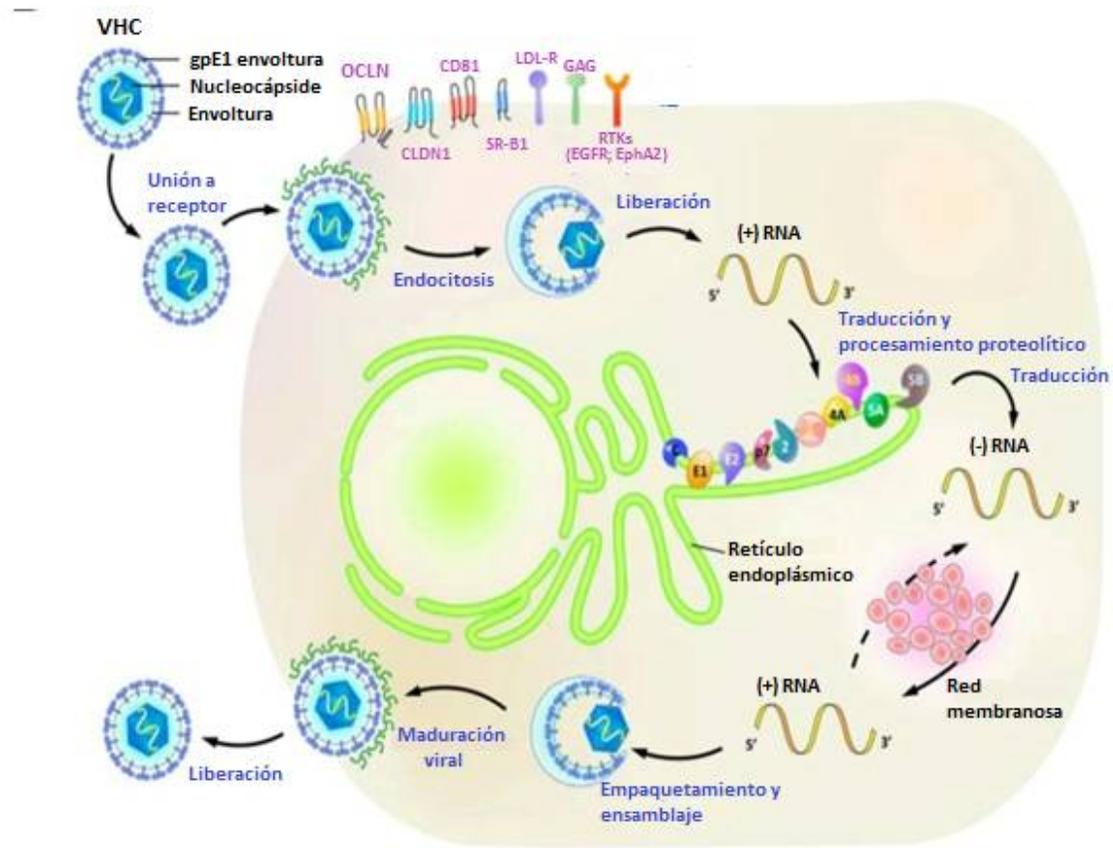


Figura 3. Ciclo de replicación del VHC. (Modificada de Ke, 2012)

## 1.9 LA INFECCIÓN POR EL VHC

El cuadro clínico de la infección puede ir desde un padecimiento leve que dura unas cuantas semanas (infección aguda), hasta una afección grave que dura toda la vida (infección crónica) (Diago, 2004).

El curso de la **hepatitis C aguda** es variable, aunque la elevación de los niveles en suero de la alaninaaminotransferasa (ALT), a menudo es un patrón fluctuante suele ser su rasgo más característico. La normalización de los niveles de ALT puede ocurrir y sugiere recuperación total, pero este es frecuentemente seguido por elevaciones de ALT que indican progresión a la enfermedad crónica.

Sólo el 20%-30% de todos los pacientes que contraen una hepatitis aguda por el VHC presentarán cuadro clínico, los síntomas prodrómicos son sistémicos y variables. La aparición de ictericia puede estar precedida por 1 o 2 semanas de anorexia, náuseas, vómitos, astenia, artralgias, mialgias, dolor de cabeza, fotofobia, faringitis, así como alteraciones del gusto y olfato. El hígado aumenta de tamaño y puede haber dolor en hipocondrio derecho (Martínez, 2011).

Después de la infección aguda, del 15% a 25% de las personas resuelven la enfermedad sin secuelas como resultado de la disminución de la producción de partículas virales en las células infectadas (Rallón, 2007).

La **hepatitis crónica** es definida como una enfermedad continúa sin mejora durante al menos seis meses; es un complejo síndrome clínico-patológico con distintas etapas de necro-inflamación y daño hepático. La persistencia viral, con grados variables de daño hepático, puede conducir a cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular (Rallón, 2007).

La mayoría de las personas (60%-75%) que tienen hepatitis C crónica no presentan síntomas. La infección crónica por el VHC se presenta en el 75%-85% de las personas, con elevación persistente o fluctuante de ALT que indica

enfermedad hepática activa. La tasa de progresión a cirrosis suele ser lento, con 20 o más años que transcurre entre la infección y la aparición de complicaciones graves.

### 1.10 SITUACIÓN MUNDIAL Y EN MÉXICO

Se calcula que cada año se infectan con este virus entre 3 y 4 millones de personas en el mundo. Hay unos 150 millones de personas que sufren la infección crónica y están en riesgo de sufrir cirrosis hepática o cáncer del hígado, la mayoría de estas personas provienen de Asia (94.6 millones). Cada año mueren más de 350,000 personas por causa de enfermedades hepáticas vinculadas con la hepatitis C (OMS, 2013). Las estimaciones de prevalencia son 400,000 los sujetos con infección crónica en Australia y Oceanía, 14 millones en América, 16 millones en el Oriente Medio, 17.5 millones en Europa, 28 millones en África y 83 millones en Asia estas se presentan en la Figura 4 y la Tabla 1 (Alter, 2007; Lavanchy, 2011).

En América Latina, la prevalencia en la población general es de alrededor del 1.3%, uno de los más bajos en el mundo. Sin embargo, la prevalencia varía entre los países y las regiones de cada país (Méndez-Sánchez, 2010).

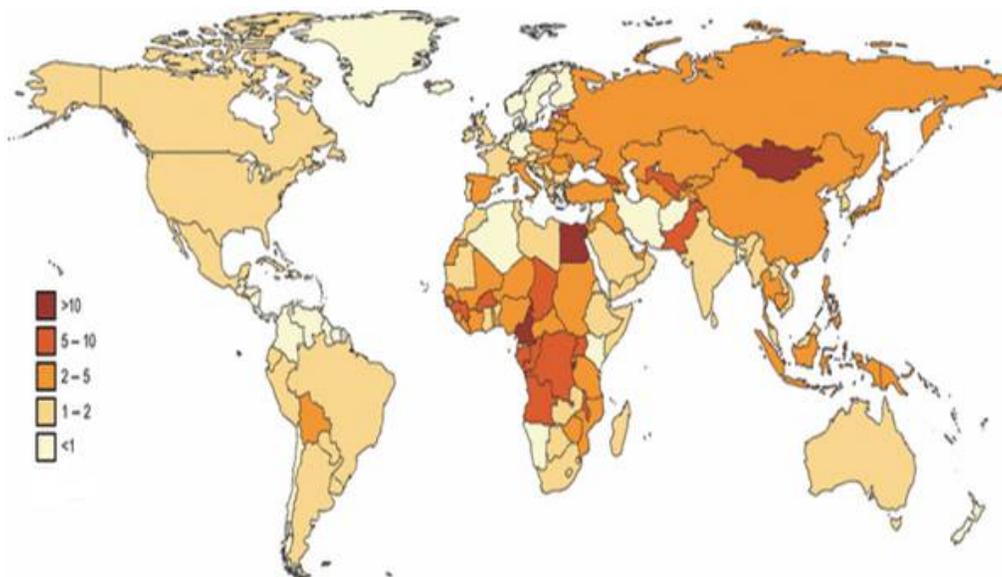


Figura 4. Prevalencia mundial estimada del VHC. (Tomado de Lavanchy, 2011)

<b>REGIÓN</b>	<b>Anti- VHC (%)</b>
<b>África</b>	3.2
<b>América</b>	1.5
<b>Asia</b>	2.1
<b>Australia y Oceanía</b>	1.2
<b>Europa</b>	2.3
<b>Medio Oriente</b>	4.7

**Tabla 1. Hepatitis C prevalencia regional de 2010. (Tomada de Lavanchy, 2011)**

En México se señala una prevalencia de alrededor de 1.4%, siendo significativamente diferente en el norte (2.0%) que en el sur (1.5%) y las entidades del centro (1.1%) del país (Kershenobich, 2011).

El VHC mostró una tendencia ascendente durante el año 2000 a 2008 con una tasa promedio anual de crecimiento de 10% en el número de casos, lo que equivale de 100 a 200 casos adicionales por año, la incidencia nacional para el 2009 fue de 1.9 por cada 100 mil habitantes. Las entidades más afectadas son Baja California, Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Colima, Jalisco y el Distrito Federal en la Figura 5, se representa el número de pacientes infectados por entidad hasta la semana 47 del 2013. El 54% se presentó en hombres y el grupo de edad más afectado es de 50 a 59 años (Secretaría de salud, 2012).

Se estima que en México hay de 400,000 a 1,400,000 personas infectadas (anti-VHC positivos) y de éstos 200,000 a 700,000 presentan viremia activa y requieren tratamiento antiviral, los genotipos de VHC que predominan son el 1a y el 1b y en una menor proporción el 2a y el 3b, desafortunadamente los pacientes que

presentan genotipo 1b son más resistentes al tratamiento con Interferón pegilado y ribavirina (Secretaría de salud, 2012).

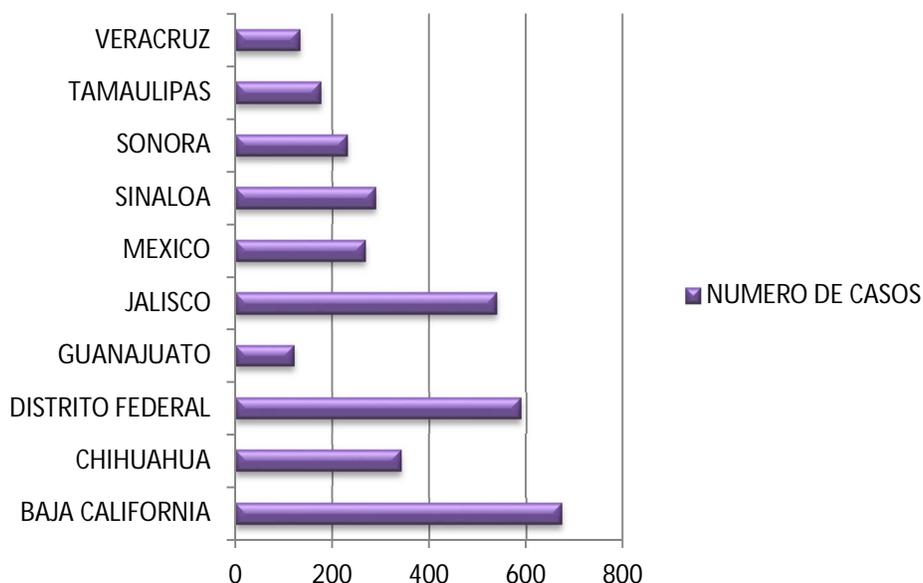


Figura 5. Casos de hepatitis C por entidad federativa con mayor frecuencia hasta la semana 47, 2013

El número de pacientes en México que se detectan y los que se tratan es aún escaso, lo que se expresa en el hecho de que en el 2005, la cirrosis hepática (complicación tardía de la hepatitis C) fuera la tercera causa más común de mortalidad en hombres y la séptima en mujeres (Kershenobich, 2011).

Existe una gran dificultad para conocer la tasa real de nuevos casos de infección por el VHC debido a que la fase aguda de la infección por el VHC muchas veces pasa inadvertida, por presentarse de forma asintomática, unido a que no existe un marcador serológico específico para el diagnóstico de la hepatitis aguda, lo que justifica que no se conozca con certeza la incidencia de hepatitis C aguda (Martínez-Rebollar, 2011).

### 1.11 RESPUESTA INMUNE

La importancia del sistema inmune en el control del VHC es bien conocida. Hasta en un 20% de los pacientes que se infectan por primera vez por dicho virus, el sistema inmune es capaz de eliminarlo sin necesidad de ningún tratamiento farmacológico.

La infección viral de las células blanco inicia una serie de eventos intracelulares que culminan en la generación de un estado antiviral, tanto en el interior de la célula infectada como en las células vecinas. El estado antiviral es dependiente de la inducción de los interferones de tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ).

El sistema de reconocimiento de patógenos se basa en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son reconocidos por los receptores específicos expresados en la célula huésped, iniciando señales que en última instancia, inducen la expresión de los genes efectores antivirales. Para los virus de RNA han sido identificados diversos PAMPs como se menciona a continuación, los cuales son reconocidos por diferentes receptores tipo Toll (TLRs).

En los hepatocitos, el reconocimiento de motivos virales en la superficie celular está mediado a través de TLR3 e intracelularmente por genes inducibles por ácido retinoico I (RIG-I) para la producción de IFN- $\beta$ . TLR3 reconoce dsRNA en endosomas, mientras que RIG-I reconoce el sitio poliuridina 3'UTR en citoplasma. Después de la activación, TLR3 recluta a la molécula adaptadora TIR que contiene el dominio del receptor adaptador de inducción de IFN  $\beta$  (TRIF) y RIG-I recluta la molécula adaptadora de IFN $\beta$  CARDIF, también denominado IPS-1 (promotor estimulador de la proteína 1)/MAVS (proteína mitocondrial de señalización)/VISA (señalización inducida por el adaptador del virus).

Ambos procesos resultan en la señalización del factor regulador de IFN3 (IRF3) y la síntesis de IFN $\beta$ . Una vez secretado IFN $\beta$  induce un estado antiviral que se extiende a las células vecinas que aún no han sido infectadas. La unión de IFN $\beta$  con el receptor de IFN $\alpha/\beta$  activa la vía JAK/STAT, lo que resulta en la inducción de genes estimulados por IFN (ISGs) que degradan o inhiben la traducción del RNA viral (Rehermann, 2009. Lloyd, 2007).

El VHC atenúa la respuesta a IFN en múltiples niveles. Un mecanismo de evasión clave lo constituye la proteína NS3/4a del VHC, que cuando se sobreexpresa induce la expresión de moléculas que bloquean TLR3 y RIG-I. Un segundo mediador clave es la proteína de cápside, que cuando se sobreexpresa interfiere

en la vía de señalización JAK/STAT y en la expresión de ISG. Varias proteínas del VHC interfieren directamente con la función de ISGs como la NS5A que inhibe la 2'-5' oligoadenilatosintetasa (2'-5'OAS) e induce la IL-8, que inhibe la expresión de ISG.

En general el IFN tipo I también es producido por las células no parenquimatosas, especialmente por las células dendríticas plasmocitoides (pDCs) en los tejidos inflamados y en los nódulos linfáticos. En la infección por VHC, la frecuencia de pDCs en la sangre y su capacidad para producir IFN- $\alpha$  se reduce. Un segundo grupo de células dendríticas, las DCs convencionales (cDCs) reside en los tejidos y transporta antígeno a través de la linfa a ganglios linfáticos de drenaje. Tanto la maduración y la diferenciación funcional de cDCs se ve alterada durante la infección por el VHC, con disminución de la IL-12 y aumento de IL-10 que inhibe la producción de IFN- $\alpha$ .

Las células NK se encuentran con frecuencia en el hígado y son capaces de ejercer citotoxicidad rápidamente y liberar citocinas. Se ha descrito que diversos factores genéticos pueden contribuir a niveles diferenciados de respuesta de las células NK.

Las células T CD4<sup>+</sup> son fundamentales para la respuesta inmune celular y humoral eficaz contra el VHC. Un fallo en la generación y mantenimiento de las células T CD4<sup>+</sup> funcionales específicas de antígeno es una característica definitoria de varias infecciones virales de RNA persistentes. El papel crucial de células T CD4<sup>+</sup> se evidenció en estudios de agotamiento en chimpancés, donde la pérdida de células CD4<sup>+</sup> dio lugar a una infección persistente. Ahora es ampliamente aceptado que una respuesta fuerte y multiespecífica de células T CD4<sup>+</sup> se asocia con liquidación y resolución de la enfermedad.

La causa de la aparente insuficiencia de la respuesta de células T CD4<sup>+</sup> en los pacientes que desarrollan infección crónica no se entiende bien. Las teorías actuales incluyen agotamiento, anergia o tal vez ambas cosas. Agotamiento puede ser consecuencia de la alta tasa de producción viral superior a la capacidad de la

respuesta inmune, lo que resulta en células T que se estimulan en exceso y por lo tanto no se pueden activar. Anergia o inactivación funcional, puede ser resultado de concentraciones altas y sostenidas de antígeno (Lloyd, 2007).

Las funciones efectoras de las células T CD8<sup>+</sup> incluyen la destrucción de células blanco infectadas (citotoxicidad) y la secreción no citolítica de citocinas antivirales tales como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Al igual que con células T CD4<sup>+</sup> en la respuesta del VHC, una respuesta fuerte multiespecífica en el inicio de la infección está asociada con la remoción viral. Las razones para la persistencia del VHC a pesar de una vigorosa respuesta de células T aún no están claras; sin embargo, el desarrollo de mutantes de escape virales resultantes de la alta tasa de replicación y propenso a errores de la RNA polimerasa se cree que desempeñan un papel importante. Se ha demostrado evidencia de mutación de múltiples epítomos HLA de Clase I (Lloyd, 2007).

Los anticuerpos generalmente juegan un papel fundamental en la defensa del hospedero contra los patógenos dentro del espacio extracelular, existen mecanismos efectores para la eliminación del virus, incluyendo la neutralización, activación del complemento, opsonización y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La respuesta inmune humoral en la infección por el VHC primaria es de título bajo, y con excepción de las respuestas contra la proteína core, la generación de la respuesta se retrasa en el desarrollo, son detectables mediante inmunoensayos de tercera generación en un promedio de 23 días (intervalo 7-72) después de detectar la viremia plasmática o 39 días (intervalo 23-72) después de la exposición probable. Estos anticuerpos permanecen detectables a lo largo de décadas de infección crónica. En aquellos que eliminan el virus, los niveles de anticuerpos disminuyen gradualmente en el título, la tasa de seroconversión se extiende entre 7-25 años (Lloyd, 2007).

Los anticuerpos neutralizantes se han documentado en los seres humanos y en los chimpancés infectados con el VHC, aunque las respuestas generalmente

carecen de reactividad cruzada con virus heterólogos y aparecen tarde en el curso de la infección primaria, se ha demostrado que se dirigen a la región hipervariable 1 (HVR-1) de la proteína E2 del VHC, y las mutaciones en esta región del virus se han asociado con la aparición de las cuasiespecies que conducen a escapar de la neutralización (Lloyd, 2007).

## **1.12 PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

El sistema inmune de los pacientes infectados crónicamente por el VHC no posee la misma eficiencia funcional y el repertorio celular que el de los pacientes que han sido capaces de controlar la infección aguda por el VHC. Esto parece indicar que el virus ha desarrollado estrategias de evasión de la inmunidad. Aunque estos mecanismos de escape se han considerado muy diversos y complejos, se han sistematizado en grupos:

### **a) Escape del reconocimiento de células T**

En cuanto a la primera estrategia de escape del VHC, las mutaciones en la secuencia viral y los cambios en las cuasi especies virales con variantes del VHC que son portadoras de mutaciones en epítomos “helper” (cooperadores) y en epítomos citotóxicos, constituyen un mecanismo importante de escape para el virus.

La RdRp tiene una alta tasa de error, que combinado con la falta de la capacidad de corrección permite la generación de la diversidad genética significativa, y el virus tiene proteínas (núcleo, NS3/4A, NS5A) que interfieren activamente con la respuesta inmune innata. Las cuasiespecies son variantes virales que existen como una nube de secuencias de viriones ligeramente diferentes que surgen bajo las presiones selectivas de la inmunidad del hospedador (Figura 6), tales como el reconocimiento de células T citotóxicas y los medicamentos antivirales (Lloyd, 2007).

Las mutaciones de escape pueden afectar al procesamiento de epítomos, la unión a MHC y el reconocimiento por células T CD8+ y CD4+ (Rehermann, 2009).

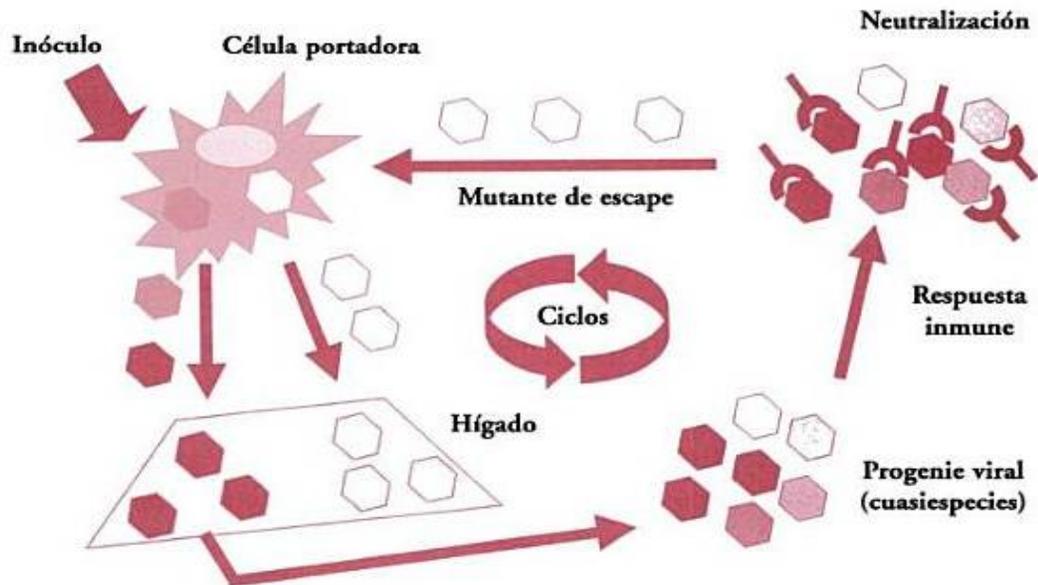


Figura 6. Esquema que describe la generación de cuasiespecies virales y la selección de mutantes de escape a la neutralización durante la infección por VHC. (Tomada de Diago, 2004).

b) Resistencia a las funciones efectoras inmunológicas

La resistencia del virus a las funciones inmunitarias efectoras mediante la inmunodepresión por productos de genes virales y el agotamiento de las células T por la prolongada exposición a antígenos virales (Rallón, 2007).

c) Interferencia en los mecanismos de señalización celular

Las alteraciones funcionales de la respuesta inmunitaria de células T, a través de la interferencia en la señalización celular, constituye otra estrategia importante de evasión viral, que no solo alteraría la funcionalidad de las células T de forma directa, sino también indirectamente por sus efectos en la célula dendrítica, que es un elemento clave en la inducción de la respuesta inmunitaria celular.

Las células dendríticas tienen un papel crucial como modulador de la respuesta inmunitaria antiviral por ser APC profesionales que desencadenan la respuesta inmunitaria específica contra el antígeno. Así, una alteración en la función o maduración de las células dendríticas, durante la infección primaria por el VHC podría contribuir al retraso en la aparición de las células T CD4+ y CD8+.

Experimentos llevados a cabo con células dendríticas derivadas de monocitos, indican que éstas muestran un proceso de maduración alterado en la infección crónica por el VHC. En este sentido, es de interés conocer que algunas proteínas del VHC, principalmente el core y E1 provocan una maduración defectuosa en las células dendríticas, inhibiendo su capacidad para inducir las respuestas inmunitarias celulares (Rallón, 2007).

### **1.13 TRATAMIENTO**

En México, se utiliza aún la combinación de Interferón pegilado (PEG-IFN) y ribavirina (RBV). La duración del tratamiento puede variar dependiendo del genotipo. Se administra por 48 semanas para los pacientes infectados con los genotipos 1 y 4, mientras que los pacientes con genotipos 2 y 3 son tratados sólo durante 24 semanas. El objetivo de este tratamiento es obtener una respuesta virológica sostenida (RVS), definida como niveles indetectables de RNA del VHC en el suero después de 24 semanas de tratamiento (Asselah y cols, 2010).

La ribavirina es un análogo de nucleósido con actividad contra un número determinado de virus. El mecanismo de la acción de la ribavirina es complejo y no completamente entendido. Las posibilidades incluyen la inhibición directa de VHC, un aumento de la frecuencia de mutagénesis que resulta en el llamado "catástrofe de error", la inhibición de la inosinamonofosfato deshidrogenasa (IMPDH), o la modulación de la respuesta inmune antiviral innata y adaptativa incluyendo una inducción aumentada de genes estimulados por Interferón (ISG) en respuesta a IFN- $\alpha$ .

La adición de ribavirina a IFN- $\alpha$  mejora las tasas de RVS en más del doble de pacientes en comparación con solo el IFN- $\alpha$ . Por lo tanto, la aplicación de la ribavirina, que fue aprobado para el tratamiento de la hepatitis C crónica en 1998, representó el próximo gran avance en la lucha contra esta enfermedad (Lange, 2013).

Otra mejora significativa en el tratamiento de la hepatitis C fue la aprobación de IFN- $\alpha$  pegilado (PEG-IFN- $\alpha$ ) en 2001. Con la pegilación de IFN- $\alpha$  se lograron profundos cambios farmacocinéticos que se caracterizan por concentraciones séricas más altas y de mayor duración, con el objetivo de mantener una mayor presión antiviral constante sobre el VHC y dosificación menos frecuente (Lange, 2013).

Desafortunadamente, esta estrategia terapéutica es eficaz en sólo el 50% de los pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC, aunque se han alcanzado tasas mucho más altas en individuos infectados con otros genotipos virales. Hay una serie de efectos adversos para la terapia IFN  $\alpha$ -PEG/RBV tales como depresión, citopenia, disfunción de la tiroides y erupciones en la piel haciendo que el tratamiento no sea bien tolerado en muchos casos. Por lo tanto, la capacidad de predecir las fallas del tratamiento podría reducir costos y evitar al paciente dolor y llevar a la toma de mejores decisiones clínicas.

Diversos marcadores de predicción pueden influir en el resultado del tratamiento anti-VHC, tales como el genotipo del virus, la carga viral, la complejidad de la población viral y la secuencia del genoma. Recientemente se ha informado de la asociación entre los diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) localizados cerca del gen de la interleucina-28B (IL-28B) y el tratamiento antiviral, el aclaramiento viral espontáneo y la progresión a la cronicidad. Estos hallazgos sugieren que estos polimorfismos podrían ser utilizados como factores de predicción para personalizar la terapia antiviral (Fonseca-Coronado, 2011).

Las terapias antivirales dirigidas específicamente para inhibir la serinproteasa NS3/4a del VHC y la RNA polimerasa NS5B dependiente de RNA han entrado recientemente en el mercado en diversos países (Soriano, 2009). Estudios clínicos realizados en pacientes “naive” (no tratados previamente) infectados con el genotipo 1 mostraron que la terapia triple con los inhibidores de la proteasa, IFN y RBV mejoran significativamente la RVS en comparación con el régimen de tratamiento de doble estándar. Sin embargo, se ha descrito que los pacientes naive a la terapia triple, presentan variantes virales resistentes a los fármacos de nueva generación (Fonseca-Coronado, 2012).

## **1.14 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico virológico y el control de la hepatitis por infección del VHC se basan en 2 categorías:

1. Pruebas indirectas: Ensayos serológicos capaces de detectar el anticuerpo específico para VHC ( anti-VHC )
2. Pruebas directas: Ensayos que pueden detectar, cuantificar o caracterizar componentes de las partículas virales del VHC.

Las pruebas virológicas directas e indirectas juegan un papel clave en el diagnóstico de la infección, en la toma de decisiones terapéuticas y en la evaluación de la respuesta a la terapia viral (Pawlotsky, 2002).

### **1.14.1 PRUEBAS INDIRECTAS**

#### **1.14.1.1 ENSAYOS SEROLÓGICOS**

La detección de anticuerpos anti- VHC en plasma o suero se basa en el uso de los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) de tercera generación, que detectan las mezclas de anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos de VHC. Los antígenos recombinantes se utilizan para capturar los anticuerpos circulantes anti-VHC en los pocillos de placas de microtitulación, microperlas o los titulares específicos adaptados a dispositivos automatizados cerrados. La presencia de

anticuerpos anti-VHC se revela por los anti-anticuerpos marcados con una enzima que cataliza la transformación de un sustrato en un compuesto coloreado.

La especificidad de los EIA de tercera generación para anti-VHC es mayor al 99%. Los EIAs pueden ser totalmente automatizados y se adaptan bien a las pruebas de gran volumen. Las pruebas de inmunotransferencia recombinante (RIBA), hoy en día son clínicamente obsoletas debido a la buena evolución de los EIA anti-VHC de tercera generación (Chevaliez, Pawlotsky, 2006).

El resultado del anti-HCV se interpreta cualitativamente y se reporta como reactivo o no reactivo, aun cuando los inmunoensayos detectan el anti-HCV mediante una reacción antígeno-anticuerpo y su intensidad es directamente proporcional a la concentración del anticuerpo, que se mide en una escala de valores continuos con el índice S/CO (del inglés signal to cut off). El índice se obtiene al dividir la señal que emite la muestra entre un control y es calculado automáticamente por el equipo; el índice se observa en la pantalla simultáneamente con el reporte de reactividad.

Los ensayos inmunoenzimáticos se han diseñado para detectar anticuerpos dirigidos a las proteínas estructurales y no estructurales del genoma del HCV. La clasificación de los inmunoensayos es compleja; de manera simplificada, se describen las características relacionadas con la generación (ejemplo: versión 1.0, versión 2.0 y versión 3.0) y el método del ensayo (ejemplo: colorimetría, inmunofluorescencia o quimioluminiscencia). Las diferencias entre las generaciones de los inmunoensayos se relacionan con los anticuerpos dirigidos a las proteínas específicas del genoma viral.

- La primera generación (versión 1.0), estuvo disponible a partir de 1990, detecta el antígeno recombinante c100-3 localizado en la región no estructural NS4.
- Los ensayos de segunda generación (versión 2.0), implementados en 1992, incluyen además antígenos de las regiones Core y NS3.

- La tercera generación (versión 3.0) aprobada en 1996, también incluye la región NS5, es más sensible y específica que las versiones previas; detecta anticuerpos dirigidos a epítomos mejor caracterizados en un mayor número de sitios del genoma viral (Core, NS3, NS4 y NS5) ver Figura 7(Contreras-Navarro, 2007).

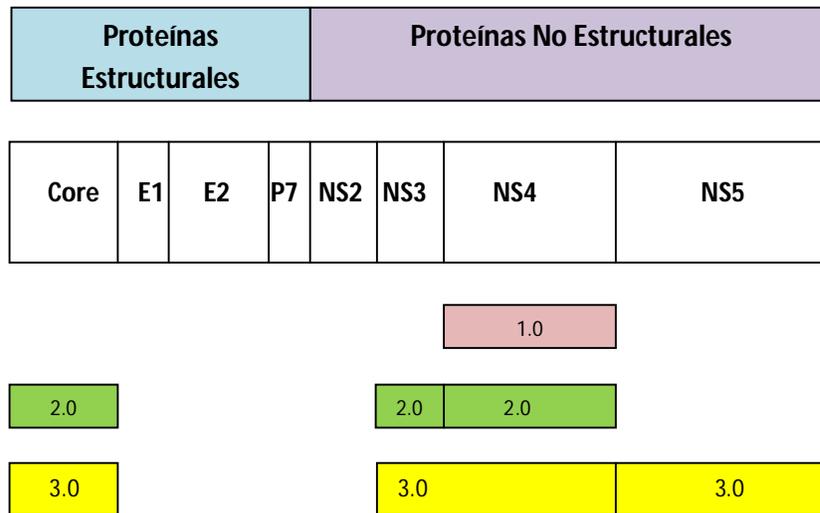


Figura 7. Representación del genoma del VHC y las regiones que detectan los inmunoensayos. (Tomada de Contreras-Navarro, 2007)

El nivel del índice S/CO refleja la concentración del anticuerpo y es probable que la replicación continua del virus estimule la mayor producción de anticuerpos. El nivel alto del índice del anticuerpo se relaciona con elevada probabilidad de infección por el VHC y en personas asintomáticas, este hallazgo es una “oportunidad de oro” para identificar enfermedad hepática crónica, ofrecer tratamiento antiviral oportuno y así evitar complicaciones.

Los niveles altos del anti-VHC no sustituyen la prueba del VHC RNA en ningún caso. Aproximadamente 9 de cada 10 muestras con niveles altos del índice S/CO, son positivas para el RNA del VHC, el resultado positivo del anticuerpo debe ser validado con las pruebas complementarias para confirmar verdaderos positivos o descartar falsos positivos (Contreras-Navarro, 2007).

#### 1.14.1.2 RIBA

La inmunotransferencia con antígenos recombinantes o “inmunoblot” recombinante (RIBA) es un enzimoimmunoanálisis cualitativo para la detección de anticuerpos frente a proteínas individuales codificadas por el VHC. Utiliza antígenos recombinantes VHC codificados y péptidos sintéticos que han sido inmovilizados como bandas individuales en las tiras de análisis. Igual que el ELISA, existen tres generaciones, la tercera (RIBA-3.0) es la utilizada en la actualidad.

La muestra se diluye e incuba con la tira de análisis (tira inmunoabsorbente), si la muestra contiene anticuerpos específicos, éstos se fijarán a las correspondientes bandas de antígeno recombinante (NS3 y NS5) y/o péptido sintético de núcleo de la tira. La tira se incuba en presencia de un conjugado de cabra anti-IgG humana, marcado con peroxidasa. El conjugado se fija a la porción IgG humana del complejo Ag-Ac. Finalmente se añade un sistema colorimétrico de detección enzimática, y si el conjugado se fija a la muestra, la reacción enzimática originará un producto de reacción de color azul-negro insoluble en cada banda específica de antígeno, péptido o control VHC, de diferente intensidad.

Si se observa reactividad con  $\geq 2$  proteínas indica un resultado positivo, el resultado de la prueba se considera que es indeterminado si se detecta reactividad a sólo una proteína. Los resultados indeterminados se presentan por la reacción cruzada de anticuerpos no específicos o puede ser indicativo de infección reciente que aún no ha dado lugar a una amplia respuesta humoral.

En los individuos infectados por el VHC, los resultados del ensayo son generalmente indeterminados durante la primera semana de la infección y se convierten en positivos 1-6 meses más tarde, los resultados falsos negativos se pueden observar en pacientes inmunocomprometidos o en personas que han resuelto la infección en los cuales los niveles de anti-VHC están disminuyendo.

Estos ensayos no son de uso rutinario, debido a la relativa disminución de la sensibilidad, alto costo, complejidad, y la larga duración del procedimiento. Por

otra parte, el resultado verdadero positivo de un RIBA sólo indica la presencia de anticuerpos anti-VHC y puede reflejar una infección anterior con una remoción espontánea, la confirmación de la infección activa aún requiere de pruebas para el RNA del VHC (Saleem, 2012).

#### **1.14.1.3 ENSAYOS RÁPIDOS**

A pesar de la excelente sensibilidad y especificidad de los EIA de tercera generación, el tiempo de respuesta para informar el resultado de la prueba es de al menos 1 día, lo que hace difícil la entrega del resultado al paciente en su primera visita. Las pruebas rápidas tienen un formato tal que no requieren de la instrumentación complicada o de personal técnico calificado para realizarlas. Potencialmente, generan resultados dentro de una hora.

Existen muchas pruebas rápidas en el mercado, fabricadas por diferentes laboratorios como la analizada (ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST) para la determinación de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C en sangre total, suero o plasma.

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, Centers for Disease Control and Prevention), ha completado recientemente la evaluación de 3 pruebas de diagnóstico rápido para la detección de anti-VHC IgG (Orasure, Chembio y MedMira) en los entornos de laboratorio y de campo. En estos ensayos, que se basan en antígenos recombinantes derivados de núcleo, las proteínas NS3, NS4, NS5 y en un formato inmunocromatográfico, se encontró que presentan una alta especificidad de más del 99%, con una sensibilidad que oscila entre 86% a 99%.

El CDC recomienda que una persona tiene evidencia serológica de infección por el VHC si el resultado positivo de la detección de anti-VHC se confirma por los resultados positivos de una prueba posterior, utilizando un ensayo de anticuerpos inmunoblot recombinante (RIBA) o NAT para la detección de RNA del VHC. Sin embargo, a pesar de estas recomendaciones, el ensayo complementario no ha sido ampliamente interpretado por muchos laboratorios, por diversas razones, que

incluyen la complejidad de los ensayos, el tiempo de respuesta prolongado de los resultados y el costo elevado (Saleem, 2012).

## 1.14.2 PRUEBAS DIRECTAS

### 1.14.2.1 ENSAYOS CUALITATIVOS

Consisten en la amplificación del RNA blanco, ya sea por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o por TMA (amplificación mediada por transcripción), cualquiera que sea la técnica utilizada, debe de reportarse como UI de RNA del VHC/mL (UI/ml). Recientemente, se ha incorporado la PCR en tiempo real (Forns, Costa, 2005).

En el ensayo cualitativo RT-PCR, el RNA del VHC se extrae y por transcripción inversa se genera DNA monocatenario complementario (DNAc), que es utilizado como molde. Los iniciadores utilizados son secuencias que corresponden a la región 5' UTR ya que es la región más conservada. Posterior a la extracción del RNA de la muestra, la fase de amplificación viene seguida de la fase de detección mediante una hibridación con sonda específica. La prueba es muy sensible y puede detectar desde 100 copias de RNA del VHC por ml (20 UI/mL).

El análisis con **TMA** utiliza un sistema más complejo de reacciones con las enzimas *RNA-T-7 polimerasa* y *MLV-RT transcriptasa inversa* bajo condiciones isotérmicas de amplificación del ARN mediante intermediarios del ADN. Pueden detectar niveles muy bajos de ARN-VHC (5-10 UI/mL) que son imperceptibles con sistemas RT-PCR.

Los ensayos de detección cualitativos deben detectar RNA del VHC 50UI/ml o menos, y tienen la misma sensibilidad para la detección de todos los genotipos. La PCR en tiempo real que también es capaz de cuantificar el RNA del VHC, tiene límites de detección más bajos de 15UI/mL (Cobas Taqman, Roche Molecular Systems); este ensayo es más rápido y rentable que las otras técnicas y ya ha remplazado otras plataformas de pruebas de NAT (Técnicas de Ácidos Nucleicos) en muchas instituciones (Chevaliez, 2007).

#### 1.14.2.2 ENSAYOS CUANTITATIVOS

El método del **bADN** (sistema “*Branched*”) de detección del RNA utiliza una sonda de oligonucleótidos en fase sólida que captura el blanco de RNA, seguido de una hibridación secundaria mediante una sonda ramificada (bADN). Es un método de análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Para poner de manifiesto la reacción, se añade un complejo de enzima conjugada al que posteriormente se le agrega un sustrato, con el que la quimioluminiscencia producida es proporcional a la cantidad de ARN del blanco.

El sistema de **RT-PCR** también se utiliza para la cuantificación del RNA, añadiendo un control externo o estándar de cantidad conocida de RNA que se amplifica junto con la muestra (PCR competitiva). La comparación de muestra y estándar nos permitirá calcular la concentración de RNA de la muestra. En la PCR en tiempo real, cada ciclo de amplificación conduce a la emisión de una señal fluorescente y el número de señales por ciclo es proporcional a la cantidad de RNA del VHC en la muestra de partida.

#### 1.14.2.3 GENOTIPIFICACIÓN

El genotipo se puede determinar mediante métodos moleculares. El método de referencia para la determinación del genotipo del VHC es la secuenciación directa de las regiones específicas del genoma (core, NS4, NS5 y el extremo 5´), ya que aquí es donde se pueden localizar con mayor exactitud las diferencias que caracterizan a los distintos genotipos y subtipos. El más utilizado, es la región 5´UTR, que sirve también para la determinación de ARN-VHC (cualitativa o cuantitativa).

Existen diferentes métodos comerciales que permiten determinar los genotipos. “Versant HCV Genotype 2.0 Assay” (*Bayer Diagnostics*), es un método LiPA (Line Probe Assay, ensayo de sonda en línea) que identifica los genotipos 1 a 6 del VHC y los subtipos en muestras de suero humano o de plasma EDTA. Está basado en la hibridación reversa; una vez obtenido el amplificado de la región 5´UTR y core del RNA-VHC, se hibrida en sondas de oligonucleótidos

inmovilizados. Las sondas que están adheridas a una tira de nitrocelulosa son específicas de las regiones 5'UTR y core de los diferentes genotipos del VHC. Después del paso de la hibridación, se lava el producto de PCR sin hibridar de la tira, y se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (conjugado) al híbrido biotilado. El cromógeno BCIP/NBT (sustrato) reacciona con el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina para formar un precipitado de color morado/marrón, que produce un patrón de bandas visible en la tira (Chevaliez, Pawlotsky, 2006).

#### **1.14.2.4 LOS INMUNOENSAYOS PARA VHC ANTÍGENO CENTRAL**

Una nueva prueba ha sido recientemente desarrollada para detectar la proteína nuclear del VHC (antígeno del VHC [Ag]), que está codificada por una de las regiones más conservadas del genoma del virus y que en pacientes anti-VHC positivos parece estar correlacionada con los niveles de RNA-VHC. Esta proteína puede ser una diana ideal para el desarrollo de métodos para detectar un Ag VHC y lo más importante para identificar las muestras de individuos en la etapa temprana de la infección (Icardi, 2001).

La caracterización antigénica de la proteína del núcleo demostró su potencial de marcador de diagnóstico. Un ensayo cuantitativo de antígeno, ya está disponible comercialmente en Europa (Architect HCV Ag de Abbott). Este es un inmunoensayo basado en quimioluminiscencia en la que las micropartículas están recubiertas con un anticuerpo monoclonal para el antígeno del núcleo del VHC. Se ha demostrado que tiene una sensibilidad que va desde 80% al 99% y una especificidad que va desde 96% al 100%. Las ventajas del ensayo de antígeno del núcleo del VHC son:

1. Es un Inmunoensayo, que no requiere procesamiento de la muestra como en ensayos moleculares.
2. El resultado positivo confirma la infección activa.

Una de las limitaciones de la prueba del antígeno del core del VHC es que tiene una menor sensibilidad que NAT, aproximadamente 1000UI/mL. (Saleem, 2012).

## 2.0 JUSTIFICACIÓN

La hepatitis C constituye un grave problema de salud pública que requiere de atención prioritaria en el ámbito nacional e internacional. La enfermedad crónica producida por el VHC en la mayoría de los casos cursa de forma silenciosa, aspecto que determina su importancia epidemiológica. Se estima que existen alrededor de 170 millones de personas infectadas en el mundo. La prevalencia global estimada de la infección por el VHC es del 2.2% en el Reino Unido mientras que en Egipto, se reporta la más alta (1.5% - 20%). En México se reporta una prevalencia de 1% a 1.9%. Con base en un escenario conservador, podría estimarse que en nuestro país existen alrededor de 1.2 millones de personas infectadas por VHC (Uribe, 2002).

Se ha estimado que la infección crónica por el VHC, será responsable de alrededor de 250,000 a 350,000 defunciones al año, esencialmente relacionadas con la descompensación de la cirrosis, enfermedad hepática terminal y el carcinoma hepatocelular (NIH Consensus Statement, 2002). La infección por el VHC se ha situado como la principal causa de hepatopatía crónica en el mundo, cerca del 27% de los casos de cirrosis y el 25% de los casos de hepatocarcinoma en el mundo ocurren en individuos con infección crónica por VHC (Chevaliez S, 2007).

Es difícil determinar la incidencia de la infección por VHC, debido a que la mayoría de las infecciones agudas son asintomáticas, las pruebas serológicas que se emplean actualmente para el escrutinio no permiten distinguir entre infección aguda, crónica o resuelta y la gran mayoría de los países no recolectan información de forma sistemática sobre los casos incidentes de enfermedad aguda (Chevaliez S, 2007).

La evolución clínica de la infección por VHC es variable, aproximadamente 55% a 85% tienen un curso crónico, de ellos, entre 5% a 25% desarrollan cirrosis en un lapso de 20 a 25 años y con un riesgo aproximado de 1% a 2% por año de

aparición de carcinoma hepatocelular. Por lo cual es importante contar con pruebas diagnósticas rápidas, económicas y confiables que nos permitan realizar una detección oportuna de la enfermedad antes de que evolucione a consecuencias más severas, reduciendo por lo tanto costos de tratamiento. Por lo anterior en este trabajo se decidió evaluar el reactivo “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST” como una opción para ofrecer un diagnóstico confiable a una mayor cantidad de pacientes en un tiempo más corto siguiendo el algoritmo que se utiliza en el HRAEBI ver Figura 18.

### 3.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la prueba “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST” estimando su especificidad y sensibilidad en muestras de pacientes diagnosticados y en los que presentan factores de riesgo relacionados con una posible infección por VHC.

#### 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Utilizar la prueba de inmunoquimioluminiscencia como referencia para conocer el estado serológico real de las muestras evaluadas con el kit “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST”.
- Estimar la sensibilidad y especificidad para conocer la exactitud diagnóstica.
- Reducir el tiempo de diagnóstico serológico
- Conocer la principal forma de contagio y la seroprevalencia de la enfermedad usando solamente los datos epidemiológicos recabados en el HRAEBI.

## 4.0 HIPÓTESIS

Si se tiene una alta sensibilidad y especificidad de la prueba rápida ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST, entonces podrá garantizarse un diagnóstico confiable en pacientes en riesgo de contraer la enfermedad.

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

*DISEÑO*: Explicativo, comparativo, prospectivo y longitudinal

*LUGAR DE ESTUDIO*: Laboratorio clínico, Sección de inmunología del HRAEBI

*POBLACIÓN*: Individuos menores de 65 años que asisten al HRAEBI y que poseen factores de riesgo que los predispone a presentar una posible infección por el virus de la hepatitis C.

### 5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- A. Ser derechohabientes del ISSSTE
- B. Pacientes de ambos sexos
- C. Menores de 65 años
- D. Individuos que se identifiquen con alguno de los siguientes factores de riesgo:
  - 1. Pacientes con antecedentes de transfusiones sanguíneas
  - 2. Pacientes toxicómanos (uso compartido de jeringas)
  - 3. Individuos que hayan practicado sexo con usuarios de drogas intravenosas
  - 4. Individuos que hayan sufrido lesiones con objetos punzocortantes que hayan estado en contacto con pacientes enfermos
  - 5. Individuos con “piercing” o perforaciones
  - 6. Pacientes en hemodiálisis
  - 7. Personal que labore en el sector salud que haya estado en contacto con derivados sanguíneos u objetos punzocortantes empleados en su práctica diaria.

### 5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1. Individuos que no sean derechohabientes del instituto y que no presenten factores de riesgo que los ponga en riesgo de ser infectados por el VHC.

### **5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

1. Pacientes que no firmen el consentimiento informado.
2. Muestras con resultados reactivos tanto en la prueba rápida como en la prueba por quimioluminiscencia, cuyo resultado no sea confirmado por la técnica de PCR.

### **5.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES**

#### **5.4.1 INDEPENDIENTES**

1. Factores de riesgo.

Se señalan como todas las características presentes en los individuos sujetos de estudio que aumentan la probabilidad de padecer una infección provocada por el virus de la hepatitis C.

#### **5.4.2 DEPENDIENTES**

1. Frecuencia de los casos encontrados positivos para VHC.
2. Sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas.

### **5.5 CAPTACIÓN DE PACIENTES.**

Las muestras utilizadas fueron obtenidas de pacientes que acudieron al servicio de laboratorio del HRAEBI a realizarse pruebas rutinarias o de control en el periodo de octubre del 2012 a enero del 2013; estos pacientes recibieron una plática informativa para la cual se elaboró material didáctico de apoyo, durante las charlas se abordaron aspectos generales de la enfermedad causada por el virus de la hepatitis C, se hizo énfasis en las principales formas de contagio con el fin de que los pacientes pudieran reconocer si estaban en riesgo de padecer la enfermedad; también se mencionó la importancia del diagnóstico oportuno, es importante indicar que todas las muestras se obtuvieron con el consentimiento de los pacientes firmando de conformidad ver Figura 12.

## **5.6 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLÍNICAS.**

Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa con sistema BD vacutainer™ en tubo tapón rojo, después de coagulada la muestra se obtuvieron los sueros por centrifugación durante 15min. a 4200rpm. Obteniéndose 233 sueros no reactivos y 13 sueros reactivos para HVC.

También se analizaron 66 muestras de suero reactivas proporcionadas por la UIM las cuales fueron almacenadas a -4°C hasta su análisis, por lo que se descongelaron a temperatura ambiente antes de ser empleadas. Para la evaluación del kit comercial se utilizaron 233 muestras de suero no reactivas y 79 muestras de suero reactivas estas últimas confirmadas por PCR.

## **5.7 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CON EL KIT COMERCIAL ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST**

### **Principio del procedimiento.**

El ensayo se fundamenta en la inmunocromatografía de flujo lateral. El conjugado VHC antígeno-oro coloidal incrustado en la almohadilla de la muestra reacciona con el anticuerpo VHC presente en la muestra de sangre, suero o plasma formando un complejo de conjugado/anticuerpo VHC. A medida que la mezcla avanza a lo largo de la tira de prueba, el complejo de conjugado/anticuerpo es capturado por un anticuerpo vinculante de proteína A que lo inmoviliza en una membrana formando una línea de color en la región de prueba (T).

Una muestra negativa no produce la línea de prueba debido a la ausencia del complejo de conjugado/anticuerpo. Los antígenos utilizados en la prueba son proteínas recombinantes que corresponden a regiones “core”, NS3, NS4 y NS5 altamente inmunoreactivas del VHC.

Sin importar cual sea el resultado de la prueba, aparecerá una línea de color en la región de control (C) al final del procedimiento de prueba. Esta línea de control es el resultado del conjugado de oro coloidal vinculado a un anticuerpo anti HCV

inmovilizado en la membrana. La línea de control indica que el conjugado de oro coloidal es funcional. La ausencia de la línea de control indica que la prueba no es válida.

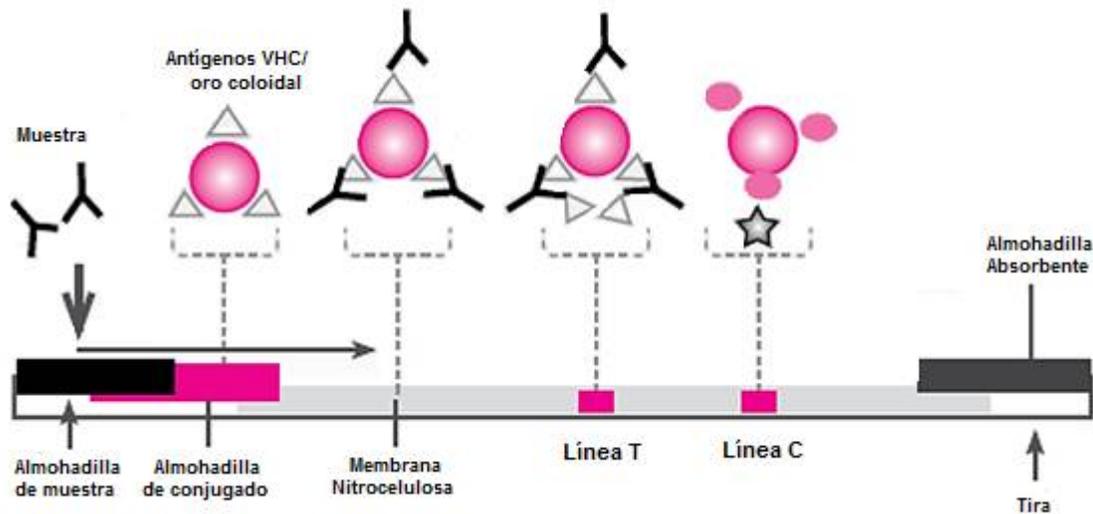


Figura 8. Fundamento de la prueba de inmunocromatografía. (Modificado de Wiener Laboratorios SAIC).

Los kits se mantuvieron a 4°C; antes de realizar la prueba los reactivos permanecieron a temperatura ambiente por 15 minutos al igual que el dispositivo, el diluyente de muestra y la muestra de suero.

Empleando la pipeta proporcionada por el "kit" se adicionó una gota (10µl) de muestra (suero) al pocillo "S" del cartucho. Enseguida se agregaron dos gotas de diluyente de muestra al pocillo "D". El resultado se Interpretó a los 15 minutos.

Se consideró como prueba reactiva cuando la banda de prueba y la banda control se colorearon de rojo- púrpura; no reactivo cuando sólo la banda control aparecía de un color rojo-púrpura en la región de control. Si la banda control no se observaba, la prueba se consideró inválida, en la Figura 9 se ilustran los posibles resultados que pueden observarse y su correcta interpretación. Se utilizaron como controles alícuotas de un suero reactivo VHC previamente identificado.

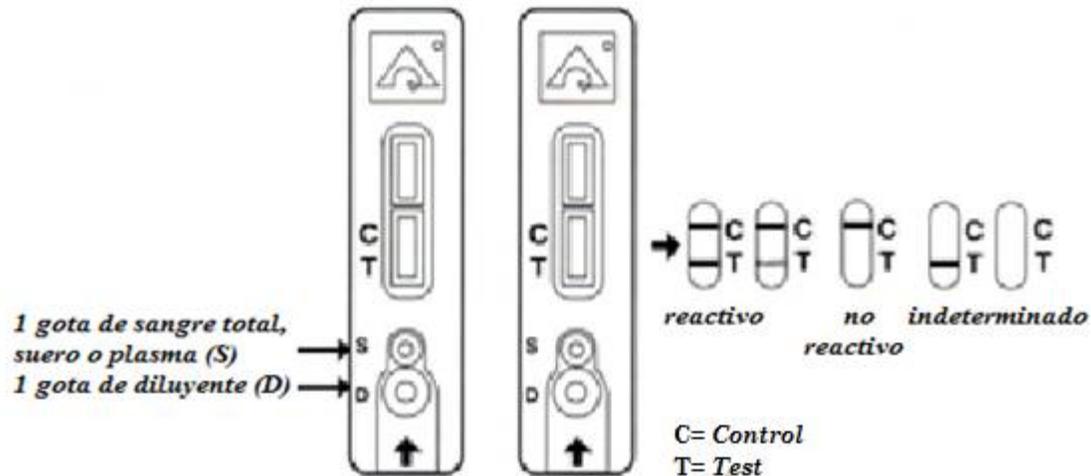


Figura 9. Interpretación de posibles resultados con la prueba rápida. (Tomada de inserto de la prueba Accutrack S.A. de C.V.)

Los “kits” fueron proporcionados por Roche como parte de la “Campaña de pruebas rápidas para detección de hepatitis C”. Fabricados por INTEC products, Inc. en Xiamen, China y distribuido en México por Accutrack S.A de C.V.

## 5.8 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VHC DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA.

### Principio del procedimiento

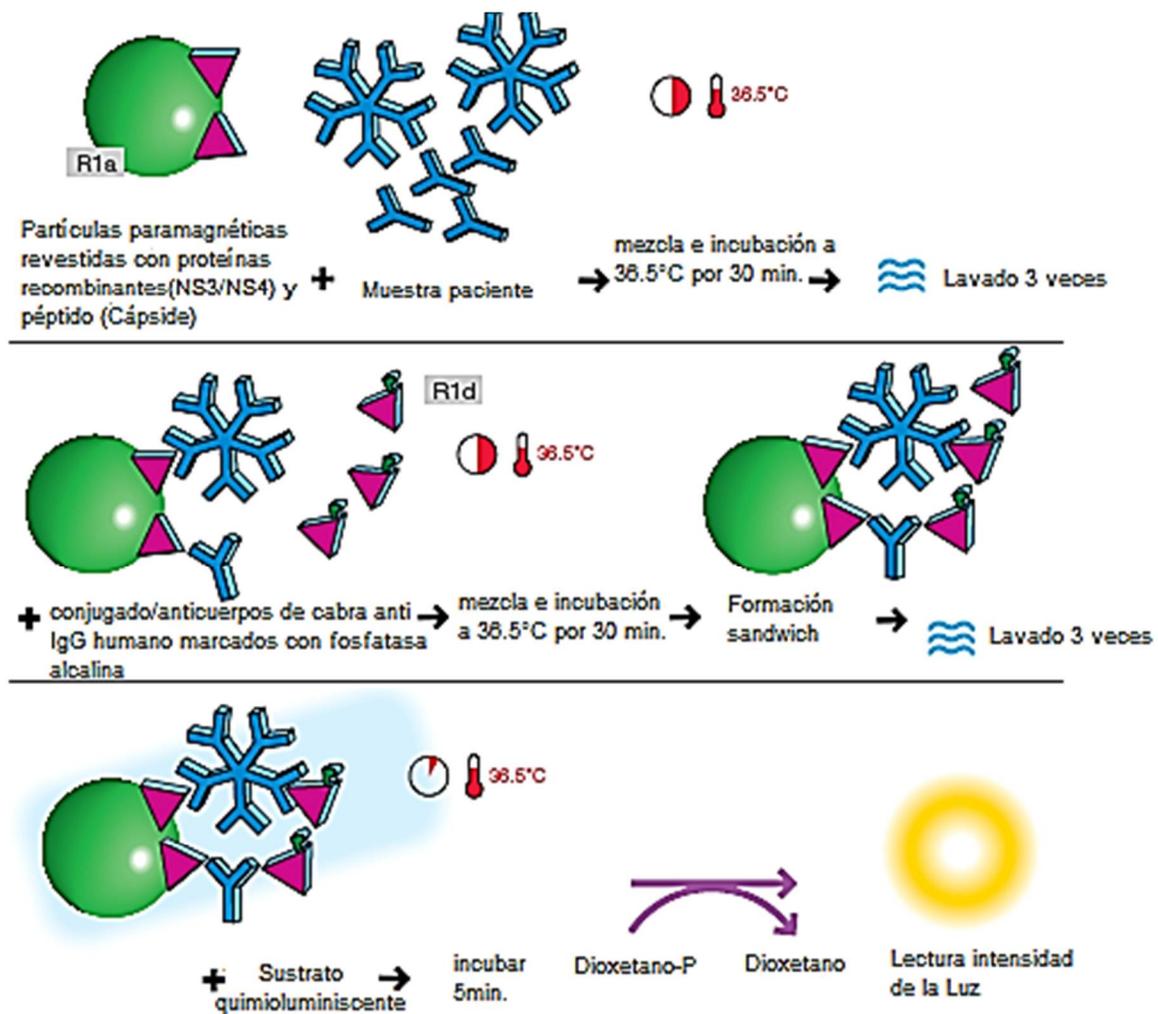
El análisis Access HCV Ab PLUS es un análisis inmunoenzimático indirecto. La muestra (suero, plasma o control) se introduce en una cubeta de reacción con partículas paramagnéticas revestidas con un péptido que imita los epítomos inmunodominantes de la región cápside, y proteínas recombinantes (NS3 y NS4).

Durante la incubación tanto la IgG como la IgM presentes en la muestra son capturados por la fase sólida. Tras la incubación, se recoge la fase sólida mediante un campo magnético y se retiran los materiales no unidos por medio de una serie de lavados.

En el segundo paso, el conjugado (suero de cabra anti IgG humano, marcados con fosfatasa alcalina) se añade a la cubeta de reacción. Tras la incubación, otra serie de lavados elimina el exceso de conjugado. Se añade un substrato

quimioluminiscente, Lumi-Phos\*\* 530, y se miden con un luminómetro los fotones generados por la reacción enzimática.

La intensidad de la señal emitida es proporcional a la cantidad de conjugado enzimático presente y, por tanto, al título de anticuerpos anti VHC presente en la muestra de prueba. Mediante la comparación del valor del punto de corte, establecido a través de la calibración del análisis, con la señal presente en la muestra, se determina la presencia de anticuerpos anti VHC.



La señal producida es comparada con el valor de corte para determinar el "status" serológico

Figura 10. Fundamento de la técnica basada en quimioluminiscencia. (Modificada de Bio-Rad Laboratories).

Siguiendo las indicaciones del fabricante se calibró el equipo automatizado "ACCESS2" de Beckman Coulter para la prueba "Access HCV Ab Plus", usando los controles de calibración C0 y C1 del "kit Access HCV Ab Plus" cada 28 días. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para realizar control de calidad al menos cada 24 horas y al poner en marcha el sistema antes del procesamiento de una muestra del paciente. Usando el producto Access HCV Ab PLUS QC, los reactivos se suministran listos para su uso y se conservaron a una temperatura de entre 2-10°C.

Los resultados de las pruebas de los pacientes fueron determinados automáticamente por el software del sistema utilizando el valor del punto de corte (valor del punto de corte = Unidades Relativas de Luz o RLU<sub>s</sub> C1 X 0.23) determinado mediante la calibración activa. Los resultados se expresan como reactivos o no reactivos en relación con el valor del punto de corte (mayor o igual que o menor que el valor del punto de corte).

1. Las muestras que presentaron una señal RLU inferior al valor del punto de corte se consideraron como **no reactivas** con la prueba Access HCV Ab Plus.
2. Las muestras con una señal (RLU) superior o igual al valor del punto de corte se consideraron como inicialmente **reactivas** con la prueba Access HCV Ab Plus, y se repitieron por duplicado antes de su interpretación final.

El equipo de Quimioluminiscencia se calibró como lo indica el manual de usuario, arrojando los resultados que se muestran en la Tabla 2 en RLU; unidades que son importantes para emitir un valor de corte de referencia para informar un resultado reactivo o no reactivo.

	<b>RLU</b>	<b>RESULTADO</b>	
<b>C0 NO REACTIVO</b>	367272	CAL. NO REACTIVO	
<b>C0 NO REACTIVO</b>	356444	CAL. NO REACTIVO	
<b>C0 NO REACTIVO</b>	332808	CAL. NO REACTIVO	
<b>MEDIA</b>	352174.67	<b>1 SD</b>	17624.19
<b>C1 REACTIVO</b>	11203600	CAL. REACTIVO	
<b>C1 REACTIVO</b>	11110800	CAL. REACTIVO	
<b>C1 REACTIVO</b>	10850000	CAL. REACTIVO	
<b>MEDIA</b>	11054800.00	<b>1SD</b>	183330.96

Tabla 2. Resultados de la calibración del equipo de quimioluminiscencia ACCES 2 de Beckman Coulter.

En la Tabla 3 se muestran las características del “kit” evaluado y la prueba usada como referencia, se muestran los antígenos presentes en cada una, la fase sólida, sustancia marcadora presente, el volumen mínimo requerido para realizar la prueba, el tiempo de reacción y el principio bajo el cual funcionan ambas pruebas.

	<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>ACCES 2</b>	<b>ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST</b>
	<b>Fabricante</b>	Biorad/BeckmanCoulter	Accutrack
<b>ANTÍGENO VHC</b>	<b>Núcleo</b>	P	P
	<b>NS3</b>	P	P
	<b>NS4</b>	P	P
	<b>NS5</b>	A	P
	<b>Fase sólida</b>	Partículas paramagnéticas	Tira
	<b>Sustancia marcadora</b>	Lumi-Phos 530	Conjugado Ag-oro
	<b>Muestra vol.(µL)</b>	25	10
	<b>Tiempo de reacción (min.)</b>	55	15
	<b>Principio</b>	QLIA	ICA

Tabla 3. Características de los ensayos utilizados de anticuerpos anti-VHC

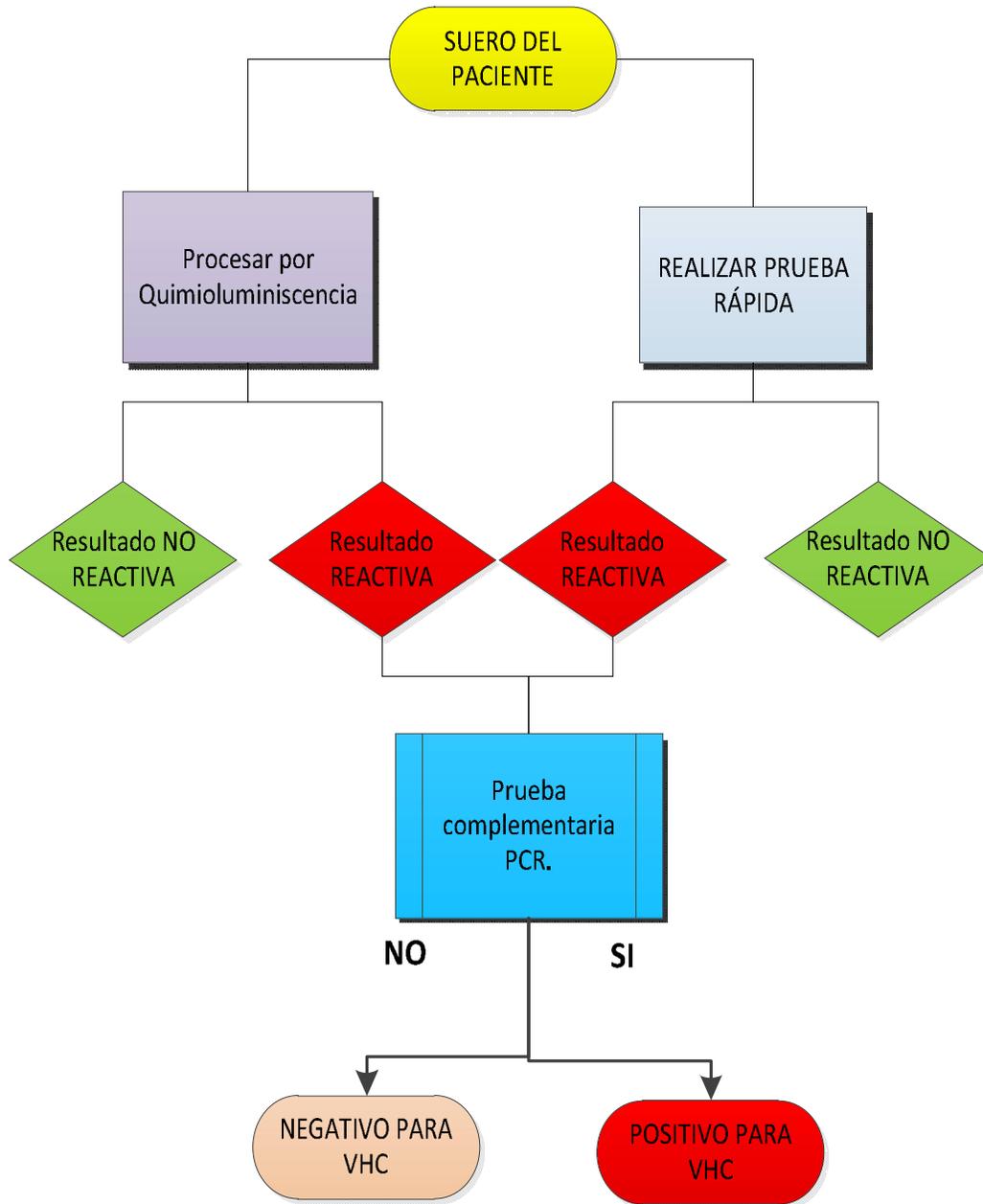
P=Presente

A=Ausente

QLIA=Quimioluminiscencia

ICA=Inmunocromatografía

## 6.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Las discrepancias fueron procesadas por PCR

## 6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos estadísticos fueron analizados con el programa IBM SPSS statistics versión 21; se utilizaron tablas de contingencia de 2x2 para establecer parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Para recabar datos demográficos y epidemiológicos se emplearon cuestionarios foliados (proporcionados por ROCHE) para conformar una base de datos, tales cuestionarios y el consentimiento informado necesario para realizar la prueba se muestran en la Figura 11 y Figura 12.

**Campaña de pruebas rápidas para detección de Hepatitis C  
Cuestionario de Factores de Riesgo**

Fecha: \_\_\_\_\_ Folio: **Nº 891107**

Resultado: Reactivo  Negativo

UMF: \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Turno: Matutino  Vespertino

Consultorio: \_\_\_\_\_

Médico de la UMF: \_\_\_\_\_

Num Afiliación: \_\_\_\_\_

Nombre (S): \_\_\_\_\_

Apellido Paterno: \_\_\_\_\_

Apellido Materno: \_\_\_\_\_

Calle: \_\_\_\_\_

Num Ext.: \_\_\_\_\_ Num Int: \_\_\_\_\_

Col: \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_

Delegación /municipio: \_\_\_\_\_

Tel. Casa: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Tel. Oficina: \_\_\_\_\_ Tel adicional: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: F  M

**Factores de Riesgo**

1. Transfusiones sanguíneas antes de 1995 Sí  No
2. Uso de drogas intravenosas Sí  No
3. Acupuntura, tatuajes o perforaciones corporales Sí  No
4. Antecedentes familiares directos con Hepatitis C o cirrosis (cónyuge, padres, hermanos e hijos) Sí  No
5. Prácticas sexuales de alto riesgo (que impliquen contacto con la sangre) Sí  No

Cortesía de: 

Productos Roche, S.A. de C.V., otorga este apoyo con la finalidad de fomentar el diagnóstico oportuno y certero de los pacientes. La decisión terapéutica es responsabilidad del médico tratante\*

81404307

Figura 11. Cuestionario utilizado para recabar información epidemiológica y datos del paciente

## Campaña de pruebas rápidas para detección de Hepatitis C Cuestionario de Factores de Riesgo

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### Consentimiento Informado para la toma de muestra:

- Estoy consciente y acepto de manera incondicional que se me realice una determinación necesaria para:
  - a) descartar o confirmar el diagnóstico clínico del padecimiento que se me está pronosticando, o
  - b) dar seguimiento a la evolución del padecimiento que se me ha diagnosticado anteriormente.
- Tanto el diagnóstico como el seguimiento del padecimiento, requieren determinaciones de laboratorio especiales, que en ocasiones no se encuentran disponibles en el hospital en el que habitualmente recibo atención médica, por tal motivo estoy consciente que tales determinaciones se podrán realizar en laboratorios externos del hospital sin costo alguno para mí.
- Se me informó que la determinación del laboratorio requiere la toma de pequeñas cantidades de sangre de la vena. La extracción de sangre puede causar dolor y existe un pequeño riesgo de hematoma y/o infección en el lugar en que se inserta la aguja. Algunas personas pueden experimentar mareo, malestar estomacal o desvanecimientos cuando se les extrae sangre.
- Al firmar este consentimiento informado, avalo que todas mis dudas con respecto a la determinación de laboratorio que se me realizará han sido expuestas a mi médico tratante y contestadas a mi entera satisfacción. Así mismo, acepto los riesgos implícitos en la toma de muestra para la determinación de laboratorio.

#### Confidencialidad:

- La prueba de laboratorio que será aplicada es cortesía de Productos Roche, S.A. de C.V. (en lo sucesivo "Roche"); sin embargo, Roche no tendrá acceso en forma alguna a mi información personal ni a los resultados de la prueba, ya que éstos tienen carácter confidencial.
- Todos mis datos personales y sensibles, serán tratados por los proveedores de los servicios según lo establecido en la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares. Entiendo que para hacer uso de mis derechos ARCO, debe consultar con cada uno de los proveedores de servicios directamente.
- Autorizo y me hago conocedor que los resultados de mi(s) exámen(es) de laboratorio me serán entregados a través de mi médico, siendo éste el único que tendrá acceso a dicho resultado y a la información contenida en esta solicitud, debiendo siempre conservar la confidencialidad de la misma.

#### Responsabilidad:

- En este acto reconozco que Roche es solamente el patrocinador de la prueba, por lo que libero expresamente a Roche de cualquier responsabilidad derivada de la realización de la misma y/o de los resultados que al efecto sean determinados por el tercero que corresponda.

---

Nombre y firma del Paciente

---

Nombre de y firma del testigo

Figura 12. Consentimiento informado para realizar la prueba

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un análisis epidemiológico con las muestras obtenidas de los pacientes que acudieron al servicio de laboratorio del HRAEBI que presentaban algún factor de riesgo y que pudieran estar infectados sin saberlo, los datos poblacionales obtenidos se organizaron en gráficas y tablas como se muestra a continuación. Fueron muestreados 380 pacientes, de los cuales sólo 246 cumplieron con los criterios de inclusión.

El estudio arrojó 13 pacientes positivos para anticuerpos anti-VHC con la prueba ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV, de los cuales 8 ya habían sido diagnosticados, por lo que sólo se encontraron 5 casos nuevos, todos los resultados tanto positivos como negativos fueron procesados con la técnica de quimioluminiscencia y adicionalmente sólo los resultados positivos fueron confirmados por PCR antes de emitir un resultado. De los pacientes confirmados positivos 12 se encontraban con infección activa y solo 1 se encontró en remoción con RNA no detectado debido a tratamiento previo completado a base de Interferón/ribavirina.

Se encontró una discrepancia en el resultado de una muestra por los dos métodos siendo positivo para la prueba ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV, pero No reactiva (S/CO de 0.079) en la prueba de quimioluminiscencia; por lo que se proceso por PCR encontrándose Negativo por lo cual, se consideró como falso positivo en la prueba ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV.

Dentro de la población del HRAEBI se encontraron los siguientes resultados en la detección de anticuerpos anti-VHC por la prueba ADVANCED y confirmados por Quimioluminiscencia (estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 13):

- 13 pacientes positivos
- 1 falso positivo
- 232 negativos

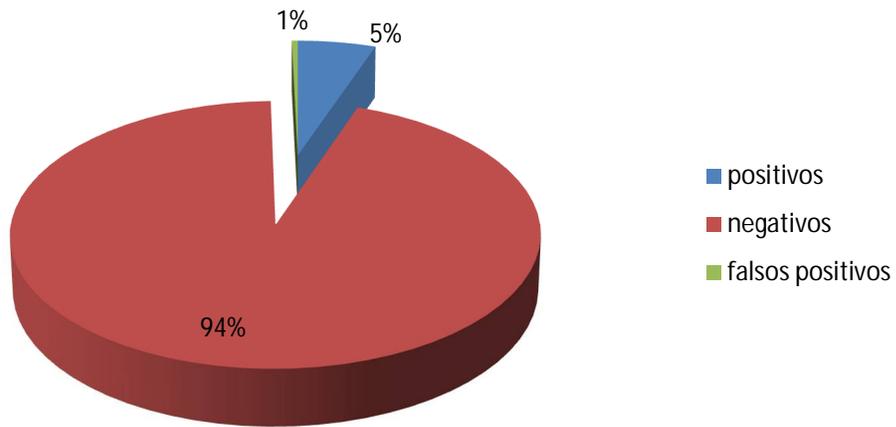


Figura 13. Resultados obtenidos de la prueba por Quimioluminiscencia

De los pacientes seropositivos se encontró que el 54% corresponde a mujeres y el 46% a hombres como se muestra a continuación en la Figura 14.

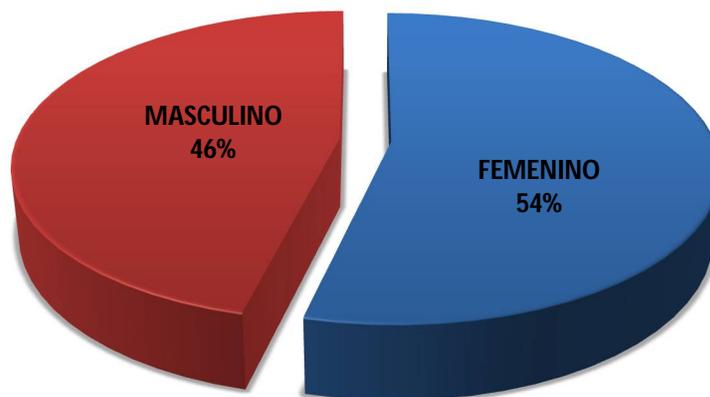


Figura 14. Distribución de la población seropositiva por género

En la Figura 15 se muestra que el mayor número de casos positivos se encuentra en pacientes mayores de 55 años, este comportamiento se observa en ambos sexos.

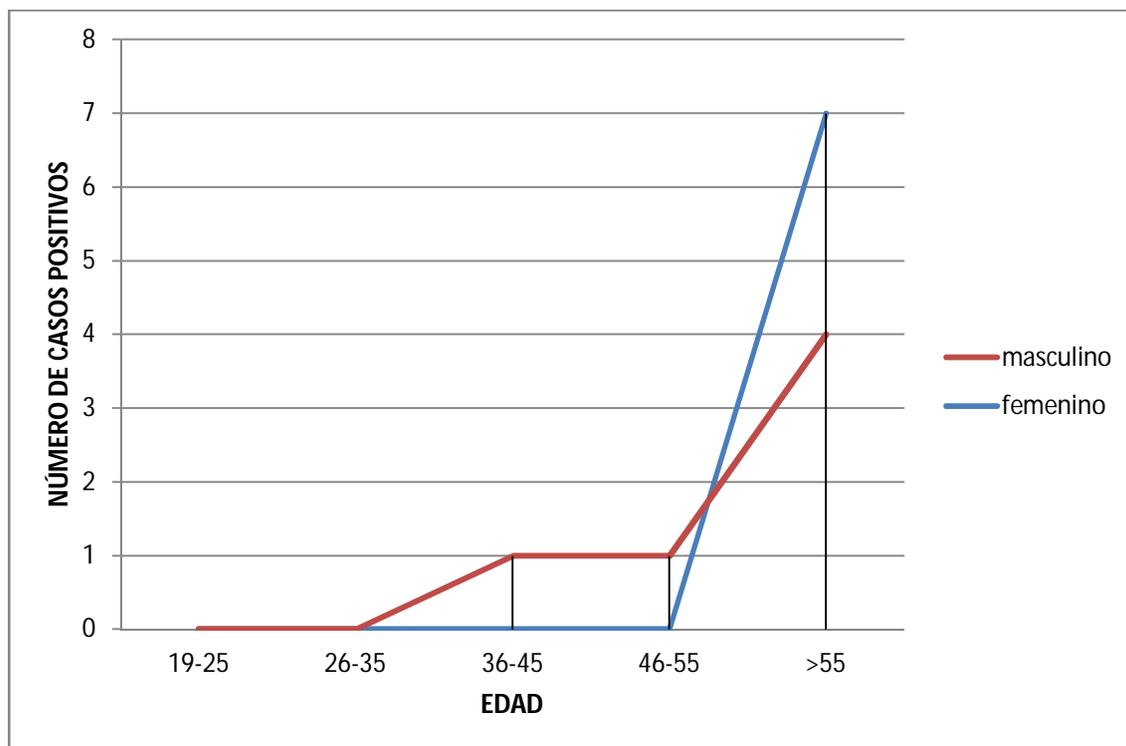


Figura 15. Seroprevalencia de anticuerpos contra VHC por edad y sexo

De los pacientes con resultado reactivo confirmado (por PCR), se encontró que la principal forma de contagio es por transfusión sanguínea (77%), el 8% corresponde a pacientes que reciben tratamiento de hemodiálisis, mientras; que el 15% desconoce la forma en la que contrajeron la enfermedad mostrado en la Figura16.

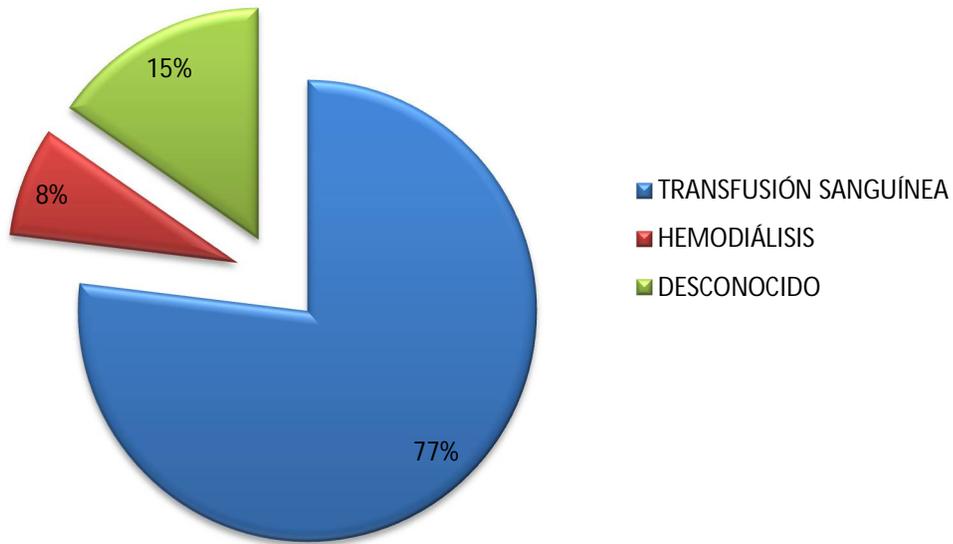


Figura16. Factores de riesgo en los sujetos seropositivos

Se encontró que el genotipo 1b es el predominante con un 37%, seguido del 1a en un 27%, también se detectaron los genotipos 2a/2c en un 18% de la población contagiada mientras que los genotipos 2a y 2b se observan en iguales proporciones en un 9% ver Figura 17.

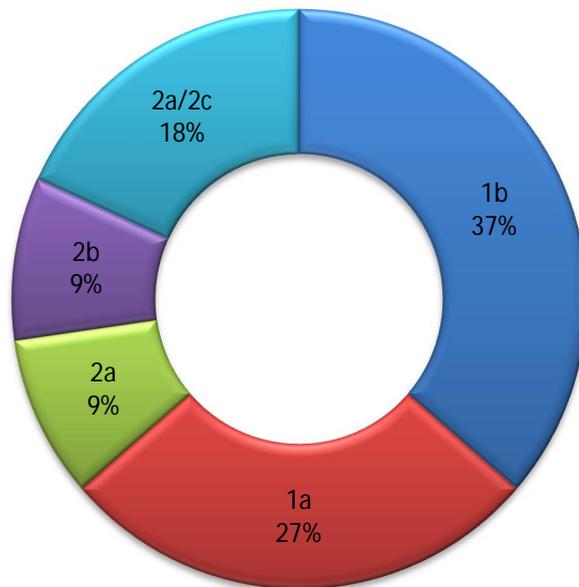


Figura 17. Distribución de genotipos encontrados en la población

Se calculó una **seroprevalencia** del 2.1% en la población derechohabiente del HRAEBI.

## **7.2 EVALUACIÓN DE LA PRUEBA RAPIDA ADVANCEDQUALITY™ RAPID ANTI-HCV**

Se realizó el análisis de la prueba rápida por inmunocromatografía, utilizando como referencia el equipo ACCESS2 de BeckmanCoulter para el cual se reporta una sensibilidad del 100% con una especificidad del 98.2% (Sinyoung, 2008).

Con los resultados antes obtenidos del análisis de la población del HRAEBI y las muestras proporcionadas por la UIM, se realizó la evaluación de la prueba “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV”, por medio de la obtención de los parámetros de sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN); utilizando 245 muestras de pacientes del HRAEBI y 66 muestras positivas proporcionadas por la UIM, las cuales quedaron distribuidas para el análisis en:

- 232 pruebas negativas
- 79 positivas
- 1 falso positivo

El “kit ADVANCED QUALITY” permitió obtener resultados en un tiempo muy corto (15 min.) en comparación con la prueba de inmunoquimioluminiscencia la cual arrojó resultados en un promedio de 55 min.

Utilizando el programa estadístico SPSS versión 21, se diseñó una tabla de contingencia de 2x2, ver Tabla 4.

			ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV		Total
			negativo	Positivo	
Quimioluminiscencia (QL)	Negativo	Núm. de pacientes	232	1	233
		% dentro de QL	99.6%	0.4%	100.0%
	Positivo	Núm. de pacientes	0	79	79
		% dentro de QL	0.0%	100.0%	100.0%
Total		Núm. de pacientes	232	80	312
		% dentro de QL	74.3%	25.7%	100.0%

Tabla 4. Tabla de contingencia para evaluación de la prueba ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV

De la interpretación de la tabla anterior se obtuvo una **sensibilidad diagnóstica** del **100%** y una **especificidad diagnóstica** del **99.6%** calculada para la prueba rápida “ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV” tomando como prueba de referencia la inmunoquimioluminiscencia (ACCESS 2 BeckmanCoulter).

Se calculó el VPP y VPN utilizando las siguientes formulas:

$$VPP = \frac{vP}{vP + fP} \quad VPN = \frac{vN}{fN + vN}$$

Siendo:

$vP$ = resultados positivos en sujetos enfermos

$vN$ = resultados negativos en sujetos sanos

$fP$ = resultados positivos en sujetos sanos

$fN$ = resultados negativos en sujetos enfermos.

Se obtuvo **VPP** de **0.987** siendo esta la probabilidad de que un individuo con resultado positivo en la prueba tenga la enfermedad.

El **VPN** calculado fue de **1** esta es la probabilidad de que un individuo con resultado negativo en la prueba no tenga la enfermedad.

## 8.0 DISCUSIÓN

La infección causada por el virus de la hepatitis C, representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, pues su evolución tiene consecuencias graves; motivo por el cual se realizó la evaluación de una prueba rápida que permita reducir el tiempo en el diagnóstico y ayude a conocer el estado serológico de los pacientes; de igual forma con los resultados obtenidos se realizó un análisis de la población que acude al HRAEBI, con el fin de obtener datos epidemiológicos relevantes.

De acuerdo a los datos obtenidos en la población del HRAEBI, se encontró que la principal forma de contagio sigue siendo la transfusión sanguínea realizada en pacientes antes de 1995, ya que la detección de anticuerpos del VHC en los bancos de sangre, se dio a conocer hasta el 18 de julio de 1994 por medio de la NOM-003-SSA2-1993; aunque todos los casos encontrados fueron infectados antes de la publicación de la norma, es importante la realización de estudios de prevalencia que sirvan como control de calidad a los bancos de sangre y para conocer el comportamiento real de la enfermedad.

La seroprevalencia se observó ligeramente mayor en las mujeres y se encontró que la mayoría fueron sometidas a procedimientos quirúrgicos ginecológicos, en donde fue necesario el uso de hemoderivados.

El aumento de la seroprevalencia en ambos géneros se observa en los mayores de 55 años, se presentaron casos de pacientes que negaron estar en contacto con el virus en las formas de transmisión más comunes; y se evidenció que los pacientes que son sometidos a hemodiálisis siguen representando un porcentaje significativo entre la población en riesgo de contagio.

Se calculó una seroprevalencia de 2.1% para este hospital regional, el cual presta servicios de asistencia médica a diferentes delegaciones del DF y municipios del estado de México, Querétaro e Hidalgo, la prevalencia encontrada en este estudio

es similar a la publicada para la región centro 1.9% (IC 95% 1.1-3.2) y para el D.F. 1.4% (IC 95% 0.8-2.4) (Valdespino, 2007).

Durante las pláticas impartidas a los pacientes, se observó que existe un gran desconocimiento de la enfermedad en la población general y es confundida con otras hepatitis virales; por lo que la información siempre será un factor importante en la prevención y disminución del impacto de la enfermedad, de aquí la importancia de establecer campañas permanentes de detección oportuna que permitan abarcar el mayor número de pacientes, para así reducir el contagio o bien iniciar el tratamiento cuanto antes.

Los accidentes con objetos punzocortantes infectados son muy comunes entre los profesionales de la salud, siendo un grupo de alto riesgo es importante establecer una vigilancia permanente, así como la continua capacitación del personal para establecer procedimientos seguros evitando prácticas como la reutilización de viales en procedimientos médicos, reutilización de jeringas, uso de protección y procurar la esterilización exitosa de materiales médicos.

Resulta muy importante, la puesta en marcha de campañas de información a la población general, con el fin de reducir el contagio a fin de evitar prácticas que los ponga en riesgo de contraer la enfermedad.

Existe evidencia de una mejor respuesta al tratamiento farmacológico, cuando se administra durante la fase aguda de la infección; de ahí la necesidad de una detección oportuna efectiva y de un diagnóstico más rápido para la detección del VHC.

Debido, a que se ha demostrado la confiabilidad de los ensayos ELISA de tercera generación, se utiliza esta técnica en las diferentes instituciones públicas del país para la evaluación de anticuerpos anti-VHC, pues presentan una buena sensibilidad y especificidad, se pueden procesar varias muestras en un tiempo estimado de 55 minutos, los equipos permiten un control de calidad interno por medio de la continua calibración y el uso de controles proporcionados por el

fabricante, sin embargo los equipos utilizados son muy costosos al igual que los insumos, se requiere personal capacitado, lo que eleva el costo de los ensayos; es por esta razón que no en todos los establecimientos públicos se puede tener acceso a la prueba y se realiza solamente en servicios de tercer nivel de atención médica. Actualmente se sigue el algoritmo mostrado en la Figura 18 para el diagnóstico de la Hepatitis C en el ISSSTE, institución donde se realizó el presente estudio.

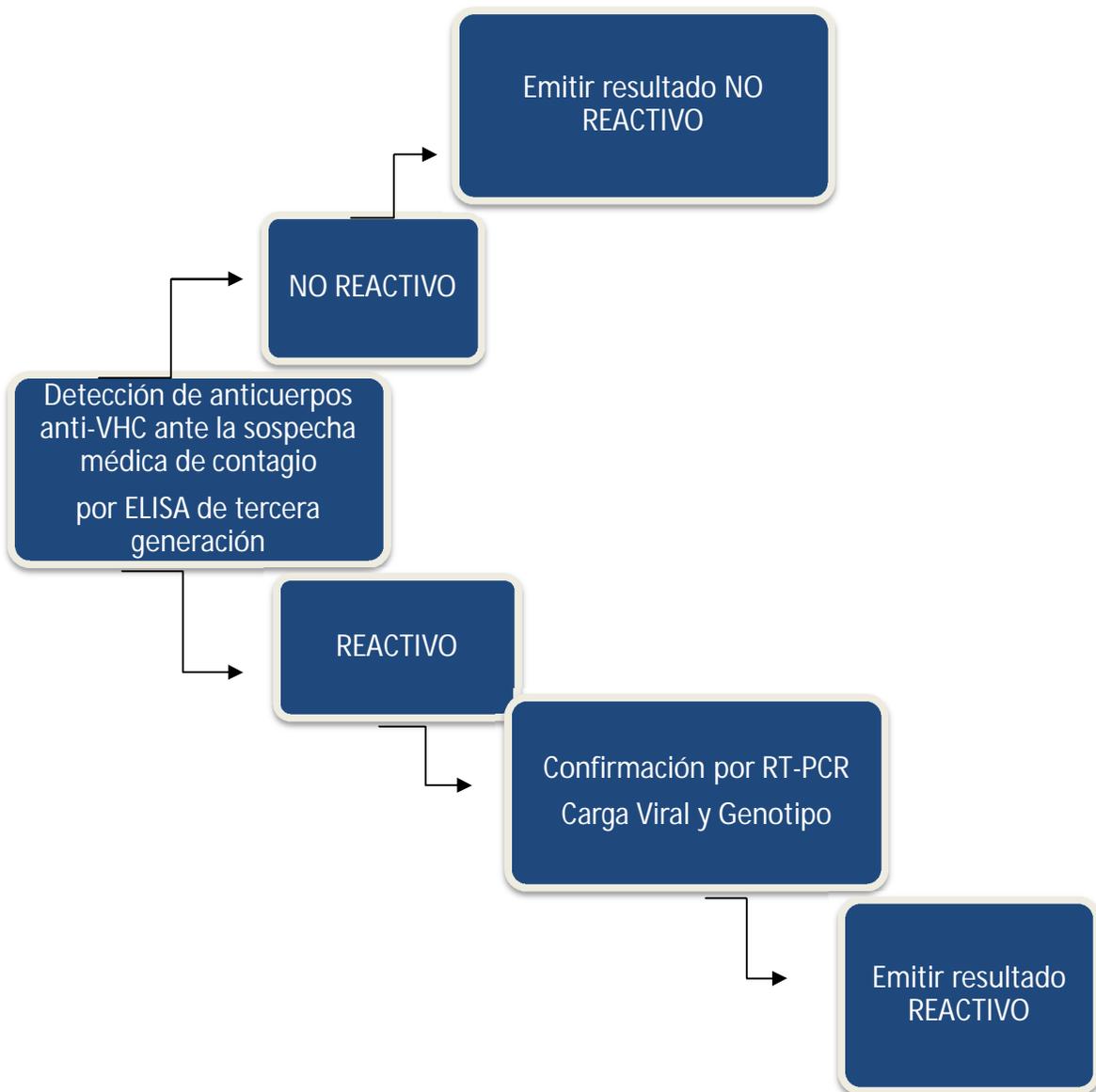


Figura 18. Algoritmo para el diagnóstico de Hepatitis C según el HRAEB

La necesidad de un diagnóstico rápido ante la toma de decisiones médicas es muy importante, por lo que el uso de las pruebas rápidas cada vez es más común.

Es por eso que el objetivo principal de este estudio fue evaluar las características operativas de la prueba rápida “AdvancedQuality™” y la comprobación de los parámetros de sensibilidad y especificidad cuando se usa en población mexicana con el fin de hacer posible el diagnóstico en centros de primer y segundo nivel de atención médica.

La prueba “ADVANCED QUALITY™” presenta características que la hacen muy sencilla de utilizar como:

1. No se necesita personal altamente capacitado.
2. El resultado se obtiene en un tiempo corto (15min.).
3. Fácil interpretación.
4. Requiere una cantidad muy pequeña de muestra.
5. Puede emplearse sangre total obtenida por una pequeña punción con ayuda de una lanceta o bien puede realizarse la prueba con suero o plasma.

La prueba también presentó desventajas, entre las que se mencionan:

1. Solo pueden usarse muestras claras (sueros no lipémicos o hemolizados).
2. El resultado obtenido es cualitativo.

Se establecieron los parámetros de sensibilidad y especificidad después de usar la prueba rápida en la población seleccionada. La prueba demostró buenos resultados ya que se obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 100%, esto nos indica que la prueba es capaz de detectar al 100% de enfermos que se les aplique la prueba. El parámetro de especificidad indica que el 99.6% de los pacientes sanos obtendrán un resultado de no reactivo en la prueba. VPN de 1 refleja la probabilidad de que un individuo no reactivo en la prueba anti-VHC no tenga la enfermedad y se calculó un VPP de 0.987 siendo esta la probabilidad de que los enfermos con prueba reactiva tengan la enfermedad.

De tal forma, que el 100% de los pacientes con anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (anti-VHC) son detectados por la prueba rápida y el 99.6% de los que no tienen anticuerpos anti-VHC presentan un resultado de no reactivo. El 98.7% de los pacientes con resultado reactivo en la prueba rápida son seropositivos y el 100% de las muestras analizadas con resultado de no reactivo son de pacientes seronegativos.

Existen en el mercado diferentes pruebas rápidas de las marcas Chembio, MedMira y OraSure las cuales en un estudio publicado presentaron una sensibilidad 96.2-98%, 86.8-88.3%, y 97.8-99.3%, respectivamente. Los 3 ensayos tenían una especificidad del 99.5% (Smith, 2011). La prueba OraQuick tiene una sensibilidad de 99.4%, la especificidad fue consistentemente alta del 99.7% (O'Connell, 2012).

La prueba "ADVANCED QUALITY™" presentó una mejor sensibilidad y especificidad que las pruebas antes mencionadas y se encontró una similitud con OraQuick, sin embargo, esta tiene la ventaja de detectar anticuerpos (IgA, IgG) en fluido oral evitando las punciones pero disminuye su sensibilidad y especificidad en 98.1% y 99.6%, respectivamente.

Si bien la prueba "ADVANCED QUALITY™" dio buenos resultados que sirven como parámetros para establecer la confiabilidad de la prueba al ser usada en población mexicana; es importante recordar que esta detecta la presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHC por lo que el resultado debe de corroborarse con una prueba complementaria para emitir un resultado.

Sin embargo, estas pruebas pueden utilizarse en programas de detección a nivel local, nacional, mundial dado que no se requiere de instalaciones propias de un laboratorio para realizarlas, pudiendo llegar a las personas que desconocen su situación y ampliar las pruebas en entornos no clínicos, también se elimina la necesidad de pedir al paciente que vuelva a acudir para la entrega de resultados.

Esto llevará a más gente a conocer su estado serológico y la búsqueda de tratamiento, ayudando a la detección de la infección en su etapa temprana y reducir así el depósito de la infección en las comunidades.

## 9.0 CONCLUSIONES

- El uso de ADVANCED QUALITY™ RAPID ANTI-HCV TEST reduce el tiempo de diagnóstico en la detección de anticuerpos anti-VHC con una buena sensibilidad diagnóstica (**100%**) y especificidad diagnóstica (**99.6%**) en la población estudiada.
- La prueba ADVANCED QUALITY™ presenta ventajas frente a las pruebas automatizadas, ya que permite el diagnóstico a una mayor cantidad de pacientes en lugares con recursos limitados pues no se requieren instalaciones especiales.
- Se recomienda su uso en los programas de “screening” o tamizaje, para hacer posible que los pacientes conozcan su situación clínica para dar tratamiento rápido, oportuno y que permita disminuir el contagio.
- Se encontró por referencia de los pacientes evaluados, que la transfusión sanguínea es la principal forma de contagio, además se encontró una prevalencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis C del **2.1%**.

## 10.0 REFERENCIAS

1. **Alter MJ**, (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. May 7;13(17): 2436-2441.
2. **Asselah T**, Estrabaud E, Biechel, Lapalus M, DeMuyne S, Vidaud M, Saadoun D, Soumelis V, and Marcellin P. (2010). Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver International*, 30: 1259–1269.
3. **Bartosch B**, Vitallia A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL, (2003). Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 41624-41630.
4. **Bryce DS**, Drobeniuc E, Jewett A, Branson BM, Garfein RS, Teshale E, Kamili S, Weinbaum CM; et al SM, (2011). Evaluation of Three Rapid Screening Assays for Detection of Antibodies to Hepatitis C Virus *J Infect Dis*. 204 (6): 825-831.
5. **Chakravarti A**, Chauhan MS, Dogra T, Banerjee S, (2013). Hepatitis c virus core antigen assay: can we think beyond convention in resource limited settings? *Braz J Infect Dis* 17(3).
6. **Chevaliez S**, Pawlotsky JM, (2006). Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. *International Journal of Medical Sciences*; 3(2): 35–40.

7. **Chevaliez S**, Pawlotsky JM, (2007). Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterology*, 13(17): 2461-2466.
8. **Chevaliez S**, (2011). Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(2): 116–121.
9. **Cisneros LE**, (2011). Nuevos avances en el manejo de la hepatitis C. *Salud Pública de México*;53( 1):S52-S60.
10. **Contreras-Navarro AM**, (2006). Anticuerpo a hepatitis C: ¿verdadero o falso positivo? Nuevas estrategias de diagnóstico. *Revista de investigación Clínica*. 58:153-160.
11. **Contreras-Navarro AM**, Tornero-Romo CM, Orozco-Hernández A, Hernández-Lugo MI, Romero-Flores P y Celis de la Rosa A (2007). Redescubriendo el anticuerpo a hepatitis C. Nuevas estrategias de escrutinio y diagnóstico. *Gac Méd Méx Vol.143 Supl 2*, 2007.
12. **Diago MM**, (2004). Manual de hepatitis C: Aspectos biológicos, clínicos y terapéuticos. Ed. Médica Panamericana.
13. **Dehesa-Violante M**, Bosques-Padilla F , Kershenobich, Stalnikowitz-D. (2007). Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Mexican patients. *Rev Gastroenterol Mex*, Vol. 72, Núm. 4.
14. **Fonseca-Coronado S**, Vaughan G, Cruz-Rivera MY, Carpio-Pedroza JC, Ruiz-Tovar K, Ruiz-Pacheco JA y Escobar-Gutiérrez A, (2011). Interleukin-28B Genotyping by Melt-Mismatch Amplification Mutation Assay PCR Analysis Using Single Nucleotide Polymorphisms rs12979860 and

rs8099917, a Useful Tool for Prediction of Therapy Response in Hepatitis C Patients, J. Clin. Microbiol. July 49: 7 2706-2710.

15. **Fonseca-Coronado S**, Escobar-Gutiérrez E, Ruiz-Tovar K, Cruz-Rivera MY, Rivera-Osorio P, Vázquez-Pichardo M, Carpio-Pedroza JC, Ruíz-Pacheco JA, Cazares F y Vaughan G, (2012). Specific detection of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. J. Clin. Microbiol. 50(2):281.
16. **Forns X**, Costa J, (2005). HCV virological assessment. Journal of Hepatology. S35-S39.
17. **Guarner C** (2008). Hepatitis C. Colección avances en patología digestiva. Marge medica.
18. **Gutiérrez G**, Kershenovich D, (2008). Inmunopatogénesis de la hepatitis C. Medicina Universitaria 2008;10(41):225-9.
19. **Halabe J**, (2010). Hepatitis viral. RevFacMed UNAM, 43(3) Mayo-Junio.
20. **I-García AB**, Conde-Gonzalez CJ, Madrid-Marina V, (2011). Hepatitis C seroprevalence and correlation between viral load and viral genotype among primary care clients in Mexico. SaludPublicaMex .53(1):S7-S12.
21. **Icardi G**; et al.(2001). Novel Approach to Reduce the Hepatitis C Virus (HCV) Window Period: Clinical Evaluation of a New Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for HCV Core Antigen. J. Clin. Microbiol. September vol. 39: 9 3110-3114.

22. **Ke P-Y; Chen, Steve SL, (2012).** "Hepatitis C Virus and Cellular Stress Response: Implications to Molecular Pathogenesis of Liver Diseases. *Viruses*; 4(10):2251-2290.
23. **Kershenobich D, (2011).** La hepatitis C como un problema de salud pública en México. *SaludPúblicaMéx.* 53(1):61-67.
24. **Kita M, M Deguchi, Kagita M, N Yoshioka, Kobayashi E, Watanabe M, S Asari, Yamanaka K, Iwatani Y, (2009).** Clinical utility and characteristics of nine anti-HCV antibody screening reagents used in Japan. *ClinLab.* 2009;55(1-2):9-22.
25. **Lange CM, Jacobson IM, Rice CM y Zeuzem S, (2013).** Las terapias emergentes para el tratamiento de la hepatitis C. *EMBO Mol Med.*doi:10.1002.
26. **Laperche S, Bouchardeau F, Garnier E, Thibault V, Roque-Afonso A, Trimoulet P, Colimon R, Duverlie G, Leguillou-Guillemette H, Lunel F, Bouvier M, Pawlotsky J-M, Henquell C, Schvoerer E, Stoll-Keller F, Chaix M-L, Branger M, Gaudy-Graffin C, Rosenberg A, Pozzetto B, Vallet S, Baazia Y, Izopet J y Lefrère J-J, (2011).** Interpretation of Real-Time PCR Results for Hepatitis C Virus RNA when viral load below the limits of quantification. *J ClinMicrobiol* 2011 marzo; 49 (3):1113-15.
27. **Lavanchy D. (2011).** Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *ClinMicrobiol Infect* 17:2 107–115.
28. **Lindebach BD, Heinz-Jurgen Thiel, (2007).** Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology, 5<sup>th</sup>Edition.*D.M. Knipe and P. M. Howley, Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

29. **Lloyd** RA; Jagger E, et al. (2007). Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary Hepatitis C virus infection. *Immunology and cellBiology* 85:24-32.
30. **Martínez-Rebollar** M, Larrousse M, Calvo M, Munoz A, González A, Loncà M, Martínez E, Blanco JL, Mallolas J y Laguno M(2011).Estado actual de la hepatitis aguda C; *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(3):210-215.
31. **Méndez-Sánchez** N, Gutiérrez-Grobe Y, Kobashi-Margáin. (2010). Epidemiology of HCV infection in Latin America *ANNALS OF HEPATOLOGY*, Latin American Association for the Study of the Liver Practice Guidelines. 9(1): SB- S26.
32. **Munier** A, D Marzouk, Abravanel F, El-Daly M, Taylor S, et al. (2013) Frequent transient hepatitis C viremia without seroconversion among Health Workers in Cairo, Egypt. *PLoS ONE* 8 (2): e57835.
33. **O'Connell** RJ, Gates RG, et al. (2012). Laboratory evaluation of rapid test kits to detect hepatitis C antibody for use in predonation screening in emergency settings. *Transfusion*. 30: 1537-2995.
34. **Panduro** A, Escobedo G, col. (2011). Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud pública de México*, 53(1):S37-S45.
35. **Pawlotsky** JM, (2002). Use and interpretation of virological tests for Hepatitis C. *Hepatology*. Nov;36:S65-73.
36. **Penin** F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*,39:5-19.

37. **Perrault M**, Pécheur EI, (2009).The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Biochem. J.* 423:303–314.
38. **Piñeiro D**; Martínez SE, (2012).RNA Structural Elements of Hepatitis C Virus Controlling Viral RNA Translation and the Implications for Viral Pathogenesis. *Viruses* , 4(10): 2233-2250.
39. **RALLÓN N**, (2007). Respuesta inmunitaria celular adaptativa frente a la infección por el virus de la hepatitis C, *Medicina Clínica (Barc)*.129(12):469-76.
40. **Rehermann B**, 2009.Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *JClin Invest*, 119(7):1745–1754.
41. **Romero-Brey I**, Merz A, Chiramel A, Lee J-Y, Chlanda P, et al. (2012). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoSPathog* 8(12): e1003056.
42. **Saleem K** , Drobeniuc E, Aufra C. Araujo y Tonya M. Hayden, (2012). Laboratory Diagnostics for Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis.* 55: S43-S48.
43. **Secretaría de Salud**, (2012) Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Hepatitis Virales. Septiembre.
44. **Selimovic D**, El-KhattoutiA, Ghozlan H, Haikel Y, Abdelkader O, Hassan M, (2012) .Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: An insight into

molecular mechanisms and therapeutic strategies. World Journal of hepatology, 4(12):342-355.

45. **Simmonds P**, Bukh J, Combet C, Del'age G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchausp'e G, Kuiken G, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky J-M, Penin F, Sablon E, Shin-IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ and Widell A.(2005). Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. Hepatology, Vol. 42, No. 4.
46. **Sinn DH**, Gwak G-Y, Shin J-U, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Yoo BC. (2012). Disease progression in chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase levels. World J Gastroenterol 2013 April 14; 19(14): 2256-2261.
47. **Sinyoung K**, Jeong-Ho Kim, et al, (2008).Clinical Performance Evaluation of Four Automated Chemiluminescence Immunoassays for Hepatitis C Virus Antibody Detection. J. Clin. Microbiol. December 46:12 3919-3923.
48. **Smith BD**, Drobeniuc E, Jewett A, Branson BM, Garfein RS , Teshale E, Kamili S y Weinbaum CM. Evaluation of Three Rapid Screening Assays for Detection of Antibodies to Hepatitis C Virus. Journal of Infectious Diseases 2011;204:825–31.
49. **Soriano V**, Peters MG and Zeuzem S, ( 2009).New Therapies for Hepatitis C Virus Infection. Clin Infect Dis. 48 (3): 313-320.
50. **Szabo S**, Bibby M, Yuan Y, Donato B, Jiménez-Mendez R, Castañeda-Hernández G, Rodríguez-Torres M, Levy A, (2012). The epidemiologic burden of hepatitis C virus infection in Latin America. Annals of hepatology, Vol. 11, No.5, 2012:623-635.

51. **Tulsiani S**, Choudhury N, Desai P, Shah R, Mathur A, Harimoorthy V, Shah J, (2012). True positivity of anti-Hepatitis C virus Enzyme-linked immunosorbent assay reactive blood donors: A prospective study done in western India. *Asian J TransfusSci*. 2012 Jul-Dec; 6(2): 165–168.
52. **Uribe M** , Méndez-Sánchez N (2002). Hepatitis C en México. *Rev Gastroenterol Mex*. 2002 Oct. 67 Suppl 2: S7-8.
53. **Valdespino JL**, Conde-González CJ, col. (2007). Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿Un problema de salud pública emergente?. *Salud pública de México* 49(3):s395-s403.
54. **Vences-Avilés MA**, González-Bravo F, (2005). Diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C. *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 52, Núm. 1: 6-12.
55. **Vera L**, Juárez J, et al. (2005). Panorama epidemiológico y situacional de la hepatitis C en México. *Rev Gastroenterol Mex*, Vol. 70, Núm. 1.
56. **Wook K C**, Kyong-Mi C, 2013. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical Molecular Hepatology*, 19:17-25.

#### URL's.

Roche Farma, S.A. (2009). Información Cobas Taqman 48 para PCR en tiempo real, recuperado de URL [http://www. Roche.es/portal/roche-spain/productos?siteUId=re7127001&paf\\_gear\\_id=33000033&pagelD=re7364116&synergyaction=show&paf\\_dm=full&nodelD=1415-fc7217414b9111deb763f1610df6c27a&categoryId=re7127001\\_ct23043](http://www. Roche.es/portal/roche-spain/productos?siteUId=re7127001&paf_gear_id=33000033&pagelD=re7364116&synergyaction=show&paf_dm=full&nodelD=1415-fc7217414b9111deb763f1610df6c27a&categoryId=re7127001_ct23043) consultada el 15/04/2013.

Accutrack (s.f.) Información de AdvancedQuality Rapid anti-HCV test.

Recuperado de URL

[http://www.accutrack.com.mx/productos/pruebas\\_rapidas/adv\\_quality\\_rapid\\_anti\\_hcv\\_test.html](http://www.accutrack.com.mx/productos/pruebas_rapidas/adv_quality_rapid_anti_hcv_test.html) consultada el 15/04/2013.

NIH Consensus Development program (2002). Manejo de la hepatitis C: 2002.

Recuperado de

<http://consensus.nih.gov/2002/2002HepatitisC2002116main.htm> consultada el 2/03/2013

OMS (2013). Hepatitis C, nota descriptiva N°164, julio de 2013. Recuperado de

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/es/>