



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

**“UTILIDAD DEL ANTÍGENO CORE DEL VIRUS DE HEPATITIS C EN EL
MONITOREO Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE
LOS PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA”**

TÉSIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

PATOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:

DRA. ALICIA BELEM LÓPEZ VICTORIA

ASESOR:

DR. JOSÉ CASIANO PÉREZ JAUREGUI

MÉXICO, D.F. 2012



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.

Dr. José Casiano Pérez Jáuregui
Profesor Titular del Curso de Patología Clínica
DIRECTOR DE TESIS
Fundación Clínica Médica Sur

Dr. Octavio González Chon
Director Académico
Fundación Clínica Médica Sur

AGRADECIMIENTOS

*Creo que las palabras se quedan cortas al intentar ponerlas en papel.
Detrás de cualquier proyecto siempre existe mucho por detrás.*

*Primero que nada a mis padres y mi hermana, por su amor y apoyarme en
cualquier momento haya sido bueno o malo.
A mi hermano ya que a pesar de no estés presente con nosotros, sabes que no
te olvidaremos.*

*A mis maestros por el conocimiento brindado y consejos.
El personal del laboratorio desde supervisores, químicos y técnicos por su
paciencia, experiencia.*

A todos aquellos que hicieron posible este proyecto.

*Por último gracias a la vida y a todas las personas portadoras de mi amor
por ser el motor de mi existencia*

ÍNDICE

Introducción	5
Marco teórico	6
Planteamiento del problema	15
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Variables	19
Tipo de estudio	20
Material y métodos	21
Análisis estadístico	24
Resultados	25
Conclusiones	28
Anexo	29
Bibliografía	30

INTRODUCCIÓN

La infección con VHC (virus de hepatitis C) representa una pandemia viral, se ha estimado que 200 millones de individuos se encuentran afectados en el mundo (alrededor de 130 países han reportado infección con VHC), los rangos de prevalencia en la población general del 1 al 14% (Estados Unidos 1.8%, México de 0.3 a 1.5%).¹

La mayor complicación de esta infección persistente es la hepatitis crónica, la cual conduce a desarrollo de fibrosis, cirrosis o carcinoma en uno de cada cinco pacientes en un periodo de 20 a 30 años.²

En México, hasta 1994 (norma oficial NOM-003-SSA2-1993, publicada el 18 de Julio de 1994) el principal mecanismo de transmisión se consideró la hemotransfusión, ya que no se realizaban pruebas para detectar anticuerpos contra el VHC (anti-VHC) en los hemocomponentes.

Con la nueva generación de pruebas de anticuerpos, el periodo de ventana promedio entre la infección por el VHC y la seroconversión es de aproximadamente 70 días.³ En la actualidad, para prevenir la transmisión sanguíneas, se han desarrollado pruebas de ácidos nucleicos (NAT nucleic acid testing, por sus siglas en inglés) las cuales son útiles en la detección y cuantificación de genomas virales. Dentro de estas se encuentra la determinación de la carga viral para el VHC, la cual permite detectar al virus durante el periodo de ventana mucho antes de la seroconversión.⁴

Recientemente se ha desarrollado un inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés) para la detección del antígeno *core* del VHC (Ag-VHC *core*), este método ha sido elegido como una alternativa a NAT para el diagnóstico precoz de la infección y de seguimiento.³⁻⁵

Hoy en día, el tratamiento en pacientes con infección crónica de VHC con genotipo 1 consiste en la administración de interferón pegilado alfa y rivabirina para lograr una respuesta virológica sostenida, la cual se considera ARN no detectado 24 semanas después del cese de tratamiento.⁵

El presente trabajo, además de realizar una breve revisión de la literatura mundial acerca de la infección por el VHC, tiene como propósito evaluar la correlación entre las pruebas de antígeno del VHC y la carga viral, durante el tratamiento en pacientes con infección por el VHC.

MARCO TEÓRICO

Epidemiología

En México la prevalencia de la infección por el VHC es de 0.3 a 1.5%. La infección se adquiere con mayor frecuencia entre los 30 a 40 años de edad, aproximadamente el 85% de las personas infectadas evolucionan a la cronicidad y permanecen asintomáticas durante décadas, dentro de este porcentaje, entre el 50 a 70% presentarán enfermedad hepática crónica y del 15 al 20% desarrollarán cirrosis hepática en los siguientes 20 años.^{1,7}

Entre el 2-4% evolucionan a carcinoma hepatocelular, el cual ocupa el cuarto lugar entre las neoplasias malignas gastrointestinales y es la séptima causa más común de muerte por cáncer en el mundo; esto en un periodo de 30 años post-exposición.^{1,4}

Las personas en riesgo de adquirir el virus son aquellas sometidas a transfusiones sanguíneas o a sus productos (hemofílicos), drogadictos intravenosos, pacientes nefrópatas en hemodiálisis, receptores de órganos, personal sanitario, personas VIH positivas.^{1,2} La vía de transmisión más importante en la pareja es percutánea de transferencia (compartir jeringas), y no a través de contacto sexual.¹ La transmisión sexual es probable cuando una persona tiene más de seis parejas (promiscuidad), mientras que la vía de transmisión ocupacional es baja (1-2%).⁸ En lo que refiere a la transmisión vertical, los hijos de padres drogadictos intravenosos (especialmente las madres) constituyen el grupo de riesgo más importante.^{4,8}

Características virales

El VHC pertenece a la familia de los Flavivirus, el cual está compuesto por una envoltura lipoproteínica que rodea una cápside icosaédrica de 30-60nm, posee una sola cadena de ARN.^{1,8}

El genoma tiene aproximadamente 9600 nucleótidos y las secuencias codificantes se encuentran dispuestas en forma polarizada en dirección 5'-3', estando más próximos al extremo 5' los genes que codifican para proteínas del *core* y envoltura (necesarias en gran número de copias), mientras que por el contrario, cercano al extremo 3' se encuentran los genes que codifican para proteínas no estructurales (NS, por sus siglas en inglés) (Figura 1).^{8,12,14}

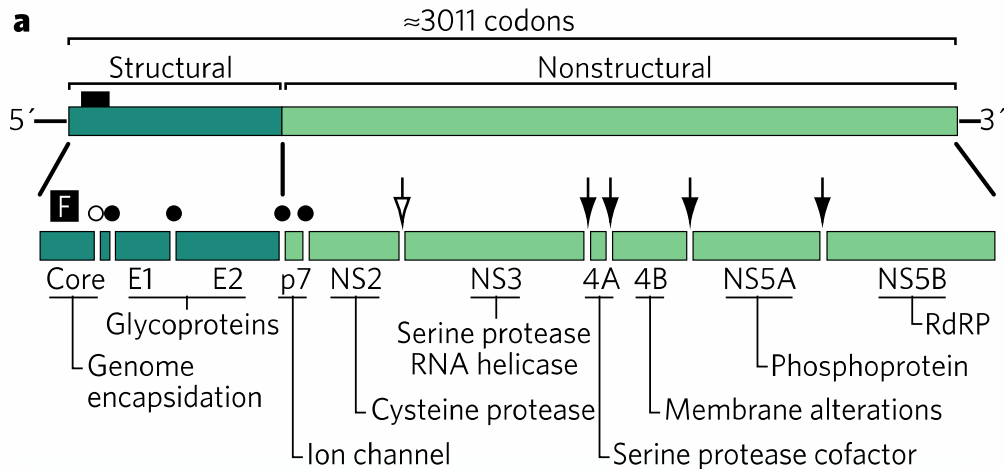


Figura 1. Organización genética del VHC. Del lado izquierdo la región estructural y del lado derecho la región no estructural. Además se indican los sitios de escisión de los precursores de las proteínas.

Tomado de Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 9th ed.

Cada gen codifica a determinadas proteínas, las cuales tienen actividades específicas (Tabla 1).^{8, 12}

Tabla 1. Proteínas codificadas y funciones

Gen	Función	Proteínas codificadas
C	Cápside	p22
E1	Glucoproteínas de envoltura	gp35
E2	Envoltura	gp70
NS2	Transmembrana	p23
NS3	ARN helicasa, serinproteasa	p70
NS4A	Cofactor de NS3	p8
NS4B	Cofactor	p27
NS5A	Represor-IFN	p56/p58
NS5B	Polimerasa dependiente de ARN	p68

Características del VHC. Tiene un genoma de 9,600 nucleótidos que codifica un polipéptido de 3,000 aa

Tomado y adaptado de Grakoui et al. 1993

El virus de la hepatitis C tiene una gran heterogeneidad genómica debido a la elevada replicación viral y la baja fidelidad de la enzima ARN polimerasa (la tasa de error es de 1 nucleótido por cada 200 incorporados en la replicación).¹ La heterogeneidad genética puede ser clasificada en tipo, subtipos, aislados y cuasiespecies (Tabla 2).^{9, 11}

Tabla 2. Terminología de acuerdo a la homología del genotipo.

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

Similitudes y diferencias entre los diferentes genotipos

Tomado de: Rev Mex Patol Clin, 2008; 55 (2).

El grado de homología da lugar al genotipo, en el cual, si existe homología del genoma entre 66-69% se le llama tipo y se designa con número arábigo; dentro de un mismo tipo, si la homología es de 77-80%, se clasifica en subtipo designándose con una letra después del genotipo, si dentro de un mismo subtipo existe homología de 81-90% se le denomina aislados.⁹

Existen 11 genotipos de VHC, varios subtipos; los subtipos 1a y 1b son los más comunes en Estados Unidos, Europa y Japón; los subtipos 2a y 2b son relativamente comunes en Estados Unidos, Europa y Japón; el genotipo 2c es frecuente en el Norte de Italia; el genotipo 3a tiene una relación con las drogas de abuso en Europa y Estados Unidos. El genotipo 4 es prevalente en África y Medio Oriente; los genotipos 5 y 6 se han observado en Sudáfrica y Hong Kong, respectivamente; los genotipos 7, 8 y 9 han sido identificados únicamente en pacientes vietnamitas; el 10 y 11 en pacientes de Indonesia.^{9, 10}

El genotipo más frecuente en nuestro país es el genotipo 1b, el cual esta relacionado con hepatitis crónica y hepatocarcinoma.^{4,9}

Aunque los genotipos del VHC pueden ser en parte un predictor independiente de la respuesta a la terapia con interferón, los sujetos con genotipos 2 y 3 tienden a presentar una respuesta favorable al tratamiento que aquéllos infectados por el genotipo 1a ó 1b.¹¹

Patogénesis

El VHC circula en diversas formas en el huésped infectado, puede estar asociado con lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), las cuales parecen representar la fracción infecciosa, también puede circular unido a inmunoglobulinas y de manera libre.^{13, 14}

La entrada del virus a las células se produce en una forma dependiente de pH y clatrina; la cual es una proteína cuya función es recubrir las vesículas intracelulares y es requerida en el proceso de endocitosis.^{10, 14} La entrada del VHC al hepatocito consiste en la unión inicial del VHC a glicosaminoglicanos (GAG, por sus siglas en inglés), CD81 y/o receptor de LDL, seguido de endocitosis y liberación de la cápside en el citoplasma. La infección por el VHC es un proceso muy dinámico, la producción viral se ha estimado en 1×10^{12} viriones por día en un individuo (Figura 2).^{14, 15}

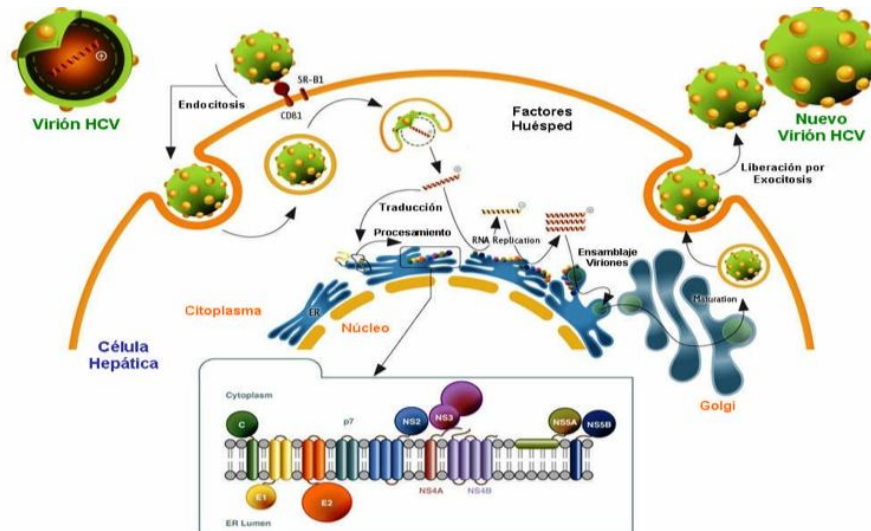


Figura 2. Ciclo replicativo. Entrada del VHC al hepatocito, su RNA es traducido, dando origen a las proteínas estructurales y no estructurales. El RNA interactúa con las proteínas de envoltura sufriendo encapsidación y liberación del aparato de Golgi.

Adaptado de: Anzola et al, 2003

El VHC tiene un impacto profundo en el sistema inmune del huésped, no solo a través de la evasión y la modificación de la respuesta inmune, sino también a través de un tropismo directo de las células inmunológicas como los Linfocitos B.¹⁴ Se ha observado que el virus bloquea el receptor tipo I de IFN- α/β y la señalización del IFN, también altera las funciones efectoras de las células Nk (Natural Killer, por sus siglas en inglés), las cuales consisten en apoptosis y citotoxicidad, por la interacción de la proteína E2 viral con el CD81 en la

superficie membranal, contrarrestando así la eliminación viral por el sistema innato.^{10,16}

Tras la infección existe una producción de anticuerpos contra varias proteínas virales, entre ellas se encuentra IgG subtipo 1, la cual va dirigida contra las proteínas E2, NS3, NS4 y NS5.¹⁵ Los anticuerpos producidos se pueden detectar a los 70 días después de la infección.^{1,4}

Un aspecto interesante de la infección crónica por el VHC es la disminución de la respuesta de las células T CD4 y CD8.¹⁵ Este fenómeno, puede ser debido al potencial teratogénico del hígado, o bien puede ser causado por una falla de estimulación de las células dendríticas sobre las células T específicas de antígeno, o por disminución de células T debido a la continua carga viral alta sostenida.^{15,16}

Cuadro clínico

Entre el 60-70% de los pacientes con infección aguda son por lo general asintomáticos; 20% presentan manifestaciones no específicas asociadas a un daño hepático moderado, como son fatiga, fiebre, diaforesis nocturna, anorexia, náusea, vómito, diarrea, ictericia, cefalea, luego de un periodo de incubación de 4-20 semanas.⁴

La infección aguda durante la fase inicial de replicación en el hígado es seguida luego de varios meses, por una declinación de la viremia, pudiendo resolverse la infección en un 15-20% de los enfermos. No obstante, en el 80% de los casos la infección aguda progresa a una infección crónica. Se ha visto que la resolución de la enfermedad va de la mano con una potente respuesta por parte de los Linfocitos T cooperadores tipo 1 (respuesta celular) frente a antígenos virales, este mecanismo no ocurre de la misma manera en todos los pacientes, pudiendo ser un factor que predispone a la cronicidad.⁸

La gran mayoría de los pacientes infectados por VHC desarrollan una infección crónica, haciéndose portadores del virus. Las manifestaciones clínicas son: fatiga, fiebre, anorexia, náusea, cefalea, mialgias, artralgias, dolor abdominal, alteraciones en el estado de mental. Los pacientes mantienen sus niveles de transaminasas normales y suelen estar libres de síntomas durante los primeros 10 años. Posteriormente la función normal del hígado se altera como resultado del daño hepatocelular acumulado, dando lugar a una enfermedad hepática grave, la cual se denomina Hepatitis C crónica cuya frecuencia es del 70% y promueve la progresión a cirrosis (25%) e incluso hepatocarcinoma (4%).^{4,8}

Las personas con enfermedad avanzada tiene fatiga, ictericia, edema de extremidades inferiores, ascitis, alteraciones del estado mental debido a la encefalopatía hepática y/o hemorragia digestiva por varices o gastropatía portal.

Pueden presentarse además con esplenomegalia, cabeza de medusa y ginecomastia.¹⁷

Diagnóstico

Las pruebas de función hepática convencionales carecen de especificidad en el diagnóstico de la infección por el VHC, mientras que otras pruebas de laboratorio se deben reservar para los pacientes con evidencia de manifestaciones extrahepáticas de la cirrosis o la infección por el VHC.¹⁷

En 1989 se desarrolló la primera prueba para determinar la presencia de los anticuerpos anti-VHC, mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) que empleaba un único antígeno derivado de la región NS4 fusionado a la enzima superóxido dismutasa (SODh). Sin embargo dicha prueba poseía una sensibilidad de 80% y especificidad de 58%, con un diagnóstico serológico de la infección de 150 días aproximadamente post-exposición.^{1,12}

La prueba de anti-VHC de segunda generación (ELISA II) fue creada en 1991 y detectaba los antígenos constituyentes de las regiones *core*, NS3 y NS4, con una sensibilidad de 95% y una optimización de la especificidad de un 66%, reduciendo el periodo de ventana a 80 días aproximadamente.¹ Desde 1993 se emplean pruebas de ELISA de tercera generación, constituidas por antígenos de las regiones *core*, NS3, NS4 y NS5. La sensibilidad del ELISA de tercera generación es de 94 al 100%, atribuyéndose principalmente a la reconfiguración de los antígenos *core* y NS3, más que a la incorporación de NS5, con una especificidad de 97 a 98%.¹²

La especificidad de los inmunoensayos enzimáticos (EIA, por sus siglas en inglés) actuales es mayor del 99%, de tal forma que más del 99% de los pacientes inmunocompetentes con ARN detectable del VHC resultarán positivos a estas pruebas. Los EIA pueden ser falsos negativos en pacientes con hemodiálisis y en inmunodeficientes a pesar de la replicación del VHC en curso, aunque esto es poco frecuente con las pruebas de detección y cuantificación de ARN.¹⁸

La prueba más utilizada para confirmar una prueba EIA positiva para VHC es el ensayo inmunoblot recombinante (RIBA, por sus siglas en inglés), que utiliza antígenos recombinantes del VHC, así como péptidos sintéticos que han sido inmovilizados en bandas individuales en tiras del ensayo. Los dos antígenos recombinantes (c33c y NS5) y dos de los péptidos sintéticos (c100p y 5-1-1p) proceden de regiones no estructurales del virus, mientras que el tercer péptido (c22p) corresponde a la proteína de la nucleocápside (núcleo viral). Los antígenos recombinantes c33c y NS5 del VHC se producen como proteínas individuales de fusión con la enzima superóxido dismutasa humana (SODh), la

cual es necesaria para la detección de estos anticuerpos. Una reacción positiva se caracteriza por la aparición de bandas coloreadas de posición específica, requiriéndose por lo menos la presencia de dos bandas reactivas. La interpretación puede ser visual o automatizada. **(Figura 3)**^{1, 19}

La sensibilidad y especificidad del inmunoensayo dependen del nivel del índice S/CO (punto de corte) que se elige para definir el resultado positivo del anticuerpo; el cual puede ser modificado para definir la positividad del anticuerpo dependiendo el escenario clínico, es decir, según el uso que se pretenda (escrutinio o diagnóstico), teniendo una sensibilidad del 79% y especificidad del 98-99% como prueba confirmatoria.^{7, 22}

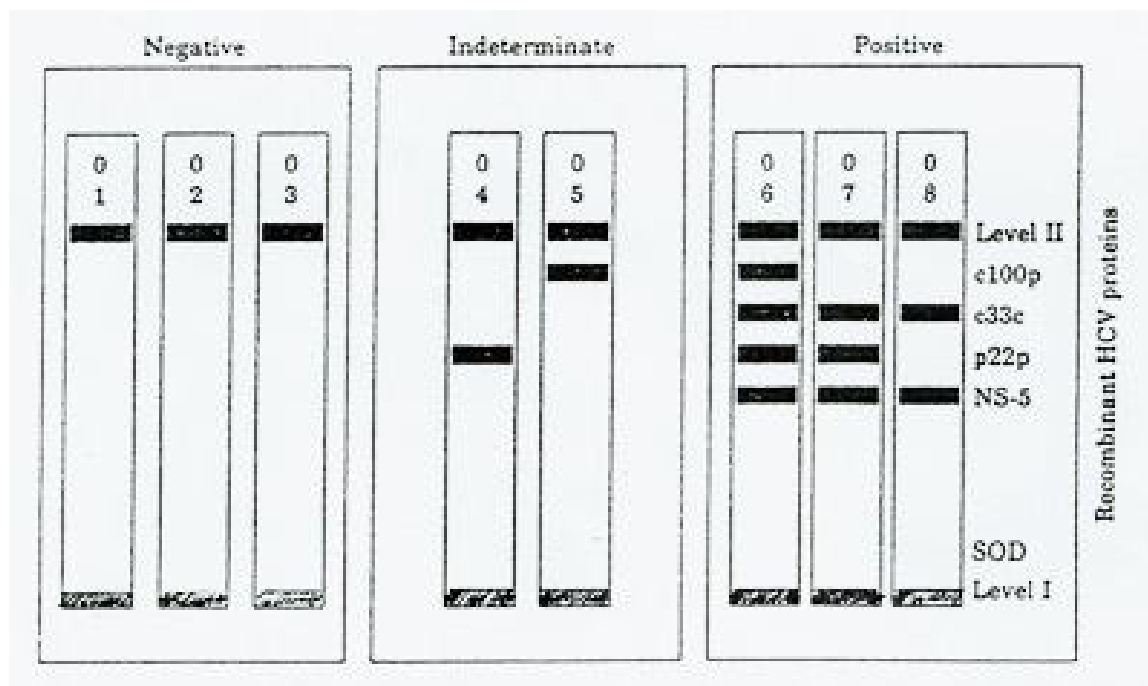


Figura 3. Interpretación de prueba de RIBA. Del lado izquierdo se observa una prueba negativa, del lado derecho una prueba positiva determinada por la serie de bandas con posición específica de acuerdo a las diferentes proteínas.

Tomado y adaptado de: *Ordi-Ros J et al. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 2000; 7: 241-244*

Las pruebas de biología molecular o NAT son útiles en la detección y cuantificación de genomas virales, emplean diversos métodos entre los que se encuentran los de amplificación, tales como la amplificación de diana y amplificación de señal. El genoma también puede ser analizado para propósito de genotipado, con mayor frecuencia por medio de secuenciación directa o hibridación inversa.¹⁹

Con este tipo de técnicas es posible identificar el virus en muestras en las cuales se consideran niveles no detectables de anticuerpos, detectándose el ARN entre los 15 a 20 días post-exposición. Sin embargo, la limitante es que las pruebas NAT requieren personal calificado, infraestructura adecuada, reactivos costosos

y un tiempo de ejecución largo. Teniendo en cuenta la relación costo-eficacia, el costo de NAT es demasiado alto para ser utilizado en la mayoría de los países en vías de desarrollo en todo el mundo.^{4,5}

Sin embargo, se ha desarrollado una prueba la cual es capaz de detectar el antígeno *core* del VHC (Ag-VHC *core*) y correlaciona con los niveles de ARN viral en sangre. Antes de la seroconversión, el antígeno se detecta 1 o 2 después que aparece el ARN-VHC en la sangre. Además, los niveles del Ag-VHC *core* coinciden con la cinética de ARN, por lo que el título del antígeno *core* puede ser utilizado como un marcador indirecto de la replicación del VHC.¹⁸

En base a los estudios de laboratorio descritos, se diseñó una tabla comparativa de los mismos (Tabla 3).²²

Tabla 3. Estudios de laboratorio en infección crónica de Hepatitis C.

Estudio	Ventajas	Desventajas
AST y ALT	Menor costo y mayor rapidez en entrega de resultados. ²¹	Pueden estar normales entre el 10 a 40% con infección crónica. ²²
Anti-VHC	Prueba de escrutinio. Sensibilidad de 94%, especificidad 97%. ²²	No puede diferenciar entre infección aguda, crónica o en resolución. ²²
RIBA	Detecta anticuerpos a antígenos individuales de VHC, con especificidad de 99%. ²²	Frecuentemente se reportan indeterminados, obligando a realizar pruebas moleculares, lo que aumenta el costo del estudio. ⁷
ARN-VHC	Sensibilidad de 96%, especificidad 100%. ²²	Pobre correlación entre carga viral y daño histológico. ¹⁷
Genotipo	Útil en determinación de respuesta a tratamiento y duración. ¹⁷	Personal capacitado, reactivos costosos. ^{1, 12}

Tratamiento

El tratamiento actual para la infección crónica es la terapia combinada de interferón pegilado alfa (pegIFN-alfa) y ribavirina (RBV). Se pueden producir varios tipos de respuestas virológicas de acuerdo con la respuesta que se presente en el tiempo determinado. Una respuesta virológica rápida (RVR) se presenta cuando el ARN es negativo a la 4ª semana de tratamiento por un PCR sensible. La respuesta virológica temprana (EVR) se define como la reducción ≥ 2 logaritmos en el nivel de ARN-VHC en comparación con el valor basal de

ARN-VHC (EVR parcial) o el ARN-VHC negativo a las 12 semanas de tratamiento (EVR completo). El término de la respuesta al tratamiento (ETR), se define como ARN-VHC negativo al final de las 24 o 48 semanas de tratamiento, mientras que la respuesta viral sostenida (SVR) es la no detección de ARN viral en suero 24 semanas después del final de tratamiento, la cual se ha considerado el mejor predictor de la respuesta a largo plazo para el tratamiento.^{20, 21, 22}

Como conclusión a esta breve revisión, las pruebas virológicas son muy valiosas en el tratamiento de la infección por el VHC. Se pueden utilizar para diagnosticar la infección activa, para guiar las decisiones de tratamiento y para evaluar la respuesta virológica a la terapia. Es necesario seguir trabajando para estandarizar plenamente estas pruebas, para mejorar la automatización y para establecer recomendaciones universales para el cuidado del paciente. Es además necesario el desarrollo de ensayos cada vez más sensibles y precisos para la detección y la cuantificación del ARN-VHC, además de la cuantificación es necesario para mejorar no solo la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral, sino también nuestra comprensión de los mecanismos subyacentes a la resistencia antiviral. Junto con el desarrollo de nuevos medicamentos antivirales y nuevos enfoques terapéuticos, estas mejoras nos permiten optimizar el tratamiento de la infección de la VHC y mejorar los resultados globales^{18, 19}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección del VHC continúa siendo una entidad frecuente en la población; siendo la segunda causa de cirrosis hepática en nuestro país.² Aproximadamente del 75 al 85% de los pacientes infectados por el VHC desarrollan una infección “crónica”.^{1,7}

La adquisición de la infección por transfusión ocurre entre el 2.5 al 3% de los pacientes que reciben algún hemocomponente, mientras que la transmisión vía parenteral (consumo de drogas) y sexual ha ido en aumento; considerándose un problema de salud pública.³

El tamizaje de esta infección se ha modificado con el paso de los años; en la actualidad la prueba de escrutinio es la detección de anti-VHC, obteniéndose una sensibilidad de 94% y especificidad de 97% con optimización de tiempo de proceso reduciendo la obtención de falsos positivos.^{5, 12}

El estándar de oro para el diagnóstico y monitoreo de tratamiento es la cuantificación por PCR en tiempo real (carga viral).^{5, 22}

Las técnicas que emplean PCR en tiempo real tienen una sensibilidad del 96% y especificidad de 99%, logrando identificar la viremia entre los 15 a 20 días post-exposición.²² Sin embargo, esta tecnología requiere de personal calificado, equipos específicos y reactivos costosos, así como un tiempo mayor de desarrollo de ejecución, en comparación a las pruebas de escrutinio.^{4, 5}

Hace aproximadamente 10 años se desarrollo la prueba de antígeno *core* del VHC (Ag-VHC *core*) como complemento a las pruebas de anti-VHC o los análisis de PCR, estos ensayos cuantitativos podrían ser utilizados para el diagnóstico de infección ya que se puede detectar a partir de los 21 días post-exposición; además en el seguimiento de la terapia antiviral.⁵ Esto nos indica que podría ser útil en la práctica clínica para predecir con un alto grado de certeza la probabilidad de respuesta virológica temprana durante el tratamiento, con concordancia con el PCR en tiempo real hasta los 3 meses de tratamiento.²³ Ya que esta prueba se realiza en un equipo automatizado, el resultado del ensayo se puede obtener a los 37 minutos después de la aspiración inicial de la muestra; existiendo una disminución del trabajo.²⁴

JUSTIFICACIÓN

Evaluar la prueba Ag-VHC *core* como una alternativa en el seguimiento de los pacientes con infección crónica en tratamiento con interferón pegilado alfa y ribavirina, ya que el Laboratorio de Patología Clínica de Médica Sur cuenta con la tecnología necesaria para su realización; además por ser una prueba inmunológica el tiempo requerido para su realización es menor en comparación al PCR en tiempo real.

HIPÓTESIS

La prueba de Ag-VHC *core* correlaciona con la PCR en tiempo real hasta la semana 12 de tratamiento con interferón pegilado alfa y rivabirina, por lo que puede ser utilizada como una alternativa en el seguimiento.

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar la prueba de Ag-VHC *core* como una alternativa en el seguimiento en los pacientes con infección crónica en tratamiento con interferón pegilado alfa y ribavirina.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Validar la prueba de Ag-VHC *core* en el equipo Architect *i2000_{SR}* de Abbott.
2. Establecer la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de Ag-VHC *core*.
3. Correlacionar el Ag-VHC *core* a las 0, 48 horas, 7 días, 4, 12, 24, 48 y 72 semanas en comparación con PCR en tiempo real.

VARIABLES

Variables independientes

Edad

Tipo de variable: cuantitativa discreta.

Definición conceptual: tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha del ingreso al estudio.

Unidades de medición: años cumplidos.

Género

Tipo de variable: nominal dicotómica.

Definición conceptual: características biológicas que definen a un ser humano como hombre o mujer.

Unidades de medición: hombre, mujer.

Genotipo

Tipo de variable: cualitativa nominal.

Definición conceptual: heterogeneidad genómica debido a la elevada replicación viral y la baja fidelidad de la enzima (la tasa de error es de 1 nucleótido por cada 200 incorporados en la replicación).

Unidades de medición: 1a, 1b genotipos.

Carga viral Hepatitis C

Tipo de variable: cuantitativa continua.

Definición conceptual: cuantificación de ARN para hepatitis con el fin de medir el número de copias de virus en sangre.

Unidades de medición: Log copias/mL.

Variables dependientes

Antígeno de Hepatitis C

Tipo de variable: cuantitativa continua.

Definición conceptual: cantidad de antígeno detectable en sangre en un determinado momento.

Unidades de medición: fmol/L.

TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio propuesto es observacional, descriptivo y transversal.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes con infección crónica de Hepatitis C, los cuales fueron diagnosticados por anti-VHC, además de carga viral.
2. Edad de 18 años en adelante.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Cantidad de muestra insuficiente.
2. Muestras que no se preservaron bajo requerimientos.
3. Genotipo diferente a 1, 1a y 1b.

MATERIAL Y MÉTODOS

Características de rendimiento de ensayo de Ag-VHC core de Abbott

Las concentraciones del antígeno *core*, se analizaron en el equipo Architect *i2000_{SR}* de Abbott para el antígeno de Hepatitis C.

Es un de inmunoensayo de dos pasos, el cual utiliza tecnología de Inmunoanálisis Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA), con protocolos de ensayo flexibles conocidos como Chemiflex, para la determinación cuantitativa del antígeno del *core* del virus de la hepatitis C.

En la etapa de Pre-Tratamiento, se combina la muestra, reactivo de Pre-tratamiento 1 y Pre-tratamiento 2. Una parte alícuota de la muestra pretratada se aspira y se dispensan en un recipiente de reacción nuevo. La muestra de pre-tratado, se combina con micropartículas recubiertas de diluyente y anti-VHC.

El antígeno *core* del VHC presente en la muestra pretratada se une a las micropartículas revestidas anti-VHC en el primer paso. Después del lavado, el acridinio marcado anti-VHC se añade en el segundo paso.

Después de otro ciclo de lavado, soluciones pre-trigger y trigger se añaden a la mezcla de reacción. La reacción resultante quimioluminiscente se mide como unidades de luz relativas (RLU). Existe una relación directa entre la cantidad de VHC Ag en la muestra y los RLU detectados por el sistema óptico del Architect *i2000_{SR}*. La cuantificación de las concentraciones del antígeno de VHC (fmol/L) es posible por el uso de una curva estándar que se genera mediante la ejecución de seis calibradores por duplicado. Si la concentración de la muestra es mayor o igual a 3.00 fmol/L, la muestra se considera reactiva para antígeno de VHC.

Validación de la prueba

Se procedió la validación del reactivo de Ag-VHC *core*, para lo cual se realizó la precisión intracorrida, en donde se evaluaron 20 veces los controles de cada nivel (nivel negativo, nivel positivo bajo y nivel positivo alto) en un mismo turno y por un mismo operador. Se calculó la media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) de los resultados obtenidos para cada nivel de control.

Con la precisión intercorrida se analizaron los controles de cada nivel (negativo, positivo bajo y positivo alto) en turnos diferentes hasta obtener 20 valores diferentes. Se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados obtenidos para cada nivel de control.

La linealidad se determinó con una muestra positiva anti-VHC cercano al límite superior de linealidad de la prueba (20,000 fmol/L), a la cual se le realizaron 6 diluciones (1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024, 1:2048) con agua destilada; se analizaron por duplicado, obteniéndose la media.

El arrastre se midió con una muestra reactiva a anti-VHC (A) y una muestra no reactiva a anti-VHC (B). La secuencia a procesar en el equipo Architect *i2000_{SR}* fue A1A2B1B2, las cuales se analizaron por duplicado. Se calculó la media, desviación estándar y el intervalo de confianza (± 2 DE).

La sensibilidad, especificidad, VPP, VPN se determinó con 22 muestras provenientes de la seroteca del Laboratorio de Patología Clínica a las cuales les fue solicitada la carga viral de Hepatitis C.

La carga viral se realizó en el analizador COBAS Taqman 48 Test de ROCHE en tiempo real.

La prueba COBAS® Taqman® VHC está basada en tres procesos principales:

1. Preparación manual de las muestras para obtener ARN-VHC.
2. Transcripción reversa automática del ARN del objetivo para generar un ADN complementario (ADNc).
3. PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos y la detección simultánea de fluorocromos que permiten la cuantificación del producto objetivo amplificado (amplicon).

Se siguieron las especificaciones de los fabricantes para la realización de las pruebas.

Tamaño de muestra:

Se obtuvieron 71 muestras del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán de pacientes con tratamiento con interferón pegilado alfa y ribavirina en las semanas 0, 48 horas, 7 días, 4, 12, 24, 48 y 72 semanas; 40 muestras corresponden a 5 pacientes respondedores al tratamiento; mientras las 31 muestras restantes corresponden a 5 pacientes del grupo no respondedores. Se excluyeron 3 muestras del grupo de no respondedores ya que no se cuenta con la carga viral de los pacientes en ese momento.

Las cargas virales fueron realizadas en el analizador COBAS Taqman 48 de ROCHE en tiempo real.

Se utilizó una fórmula de tamaño de la muestra sobre la base de los coeficientes de correlación en un estudio transversal.²⁵ Al considerar $r= 0.70$, $\alpha= 0.05$, $\beta= 0.20$ y una hipótesis de dos colas, siendo la $n= 14$ muestras. El análisis estadístico se llevó a cabo en 68 muestras.

Por el diseño de estudio, se recopilaron los expedientes clínicos de los pacientes correspondientes a las muestras. Mediante la utilización de una hoja de cédula de recolección de datos, se obtuvo la información de manera retrospectiva, valorando de manera simultánea los criterios de inclusión y exclusión para la posterior tabulación de datos. (ANEXO 1)

Durante el estudio no se conocían las cargas virales de los pacientes con infección crónica.

Las actividades arriba mencionadas se distribuyeron en el tiempo de la siguiente forma:

Actividad	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago
Revisión bibliográfica	X	X					
Elaboración de protocolo			X	X			
Revisión de protocolo por Comité					X	X	
Captura de datos						X	
Resultados y análisis estadístico							X
Presentación trabajo final							X

PRESUPUESTO

En cuanto a los recursos materiales, estos fueron los utilizados:

1. Reactivo Ag-VHC *core*, con controles y calibradores: 4 kits, los cuales fueron proporcionados por Abbott Diagnostics.
2. Pipeta serológica marca Rainin de 100 a 1000 microlitros: ya se cuenta con ella en el Laboratorio de Patología Clínica Médica Sur.
3. Puntas de micropipetas con filtro de 1000 microlitros, marca Neptune: 3 cajas con 60 unidades cada una. Se cuenta con el material.

El estudio no cuenta con implicaciones éticas. La información obtenida de los expedientes es confidencial y anónima.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa SPSS para Windows (versión 20.0 Inc., Chicago, IL). Los coeficientes de correlación se calcularon utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Características del desempeño analítico de Ag-VHC core.

Se analizaron 22 muestras correspondientes de la seroteca del Laboratorio de Patología Clínica a las cuales les fue solicitada la carga viral de Hepatitis C, donde se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 100%. Con un VPP y VPN del 100% en cada caso. No se puede realizar el cálculo de likelihood ratio, ya que se presenta un valor predictivo positivo y negativo del 100%.

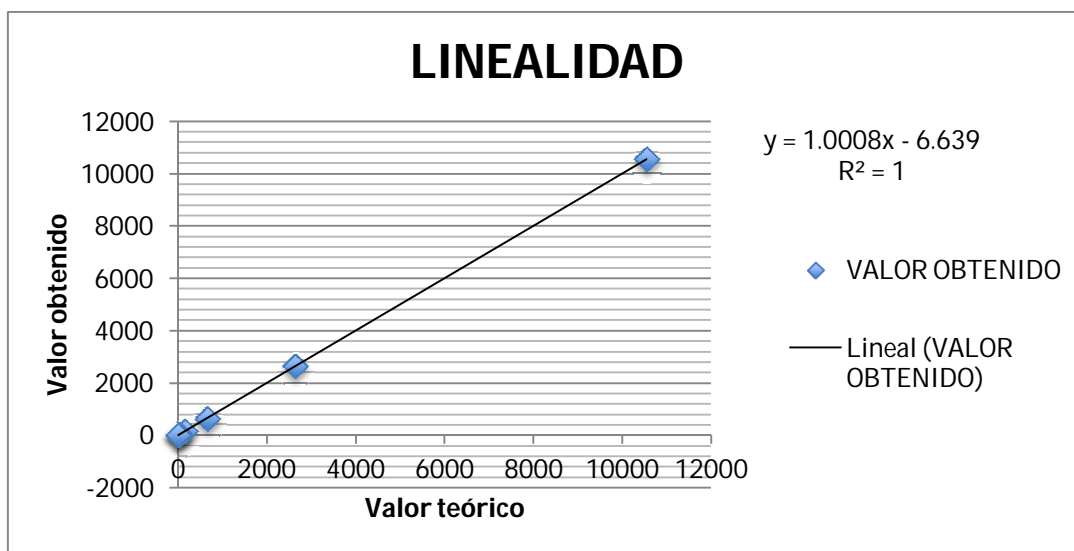
La evaluación de la precisión intracorrida con los controles positivo bajo y positivo alto dio como coeficientes de variación (CV) de 4.6% en ambos niveles; en el caso del control negativo se obtuvieron valores de 0.0 en las 20 mediciones.

En la precisión intercorrida en los niveles positivo bajo y positivo alto los CV fueron de 7.0 y 7.3% respectivamente. Para el control negativo este fue de 146.3%, lo cual es esperado debido a los valores tan bajos de los controles.

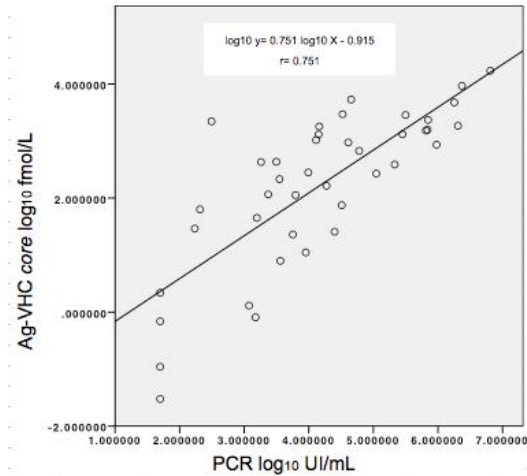
En la Gráfica 1 se observan los resultados de la linealidad de la prueba.

El arrastre se midió con una muestra reactiva a anti-VHC (A) y una muestra no reactiva a anti-VHC (B). Las muestras A1, A2 mostraron concentraciones altas de Ag-VHC core, las muestras B1B2 fueron negativas; llegando a la conclusión que no existe acarreo cuando se procesa una muestra reactiva y posteriormente una negativa.

Los resultados de las 68 muestras para Ag-VHC core y las concentraciones de RNA-VHC se observan en la Tabla 1, mientras que en la Gráfica 2 la correlación entre los resultados obtenidos; siendo la correlación observada es de 0.751



Gráfica 1. Linealidad de Ag-VHC core, con seis diluciones. Lo valores medios fueron graficados contra los valores esperados



Gráfica 2. Gráfico de dispersión de \log_{10} entre ARN-VHC y Ag-VHC core en 68 muestras por el equipo COBAS® Taqman® y Architect i2000_{SR}.

Los 5 pacientes correspondientes al grupo de respondedores presentaron una respuesta viral temprana completa (EVR) y continuaron con cargas virales no detectables hasta las 72 semanas de seguimiento por PCR en tiempo real. Se realizaron correlaciones parciales en base a las variables de género, genotipo y periodo, las cuales se encuentran en la Tabla 1. Presentando mayor correlación en género femenino, genotipo 1b y a las 4 y 48 semanas.

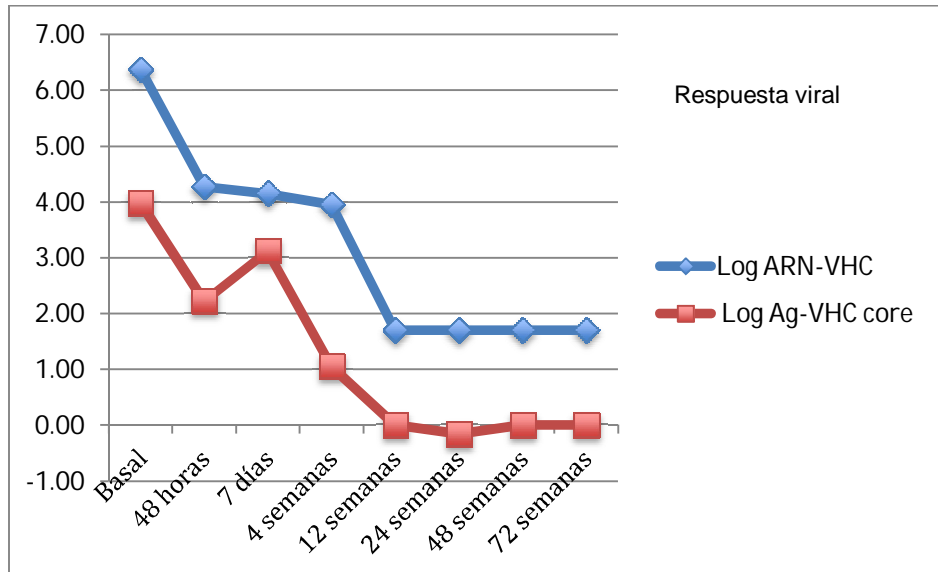
Tabla 1. Correlación parcial entre el Ag-VHC core y PCR en tiempo real

Variable	Correlación	Valor p
Género		
Femenino	0.784	0.0001
Masculino	0.730	0.0001
Genotipo		
1	0.200	0.747
1a	0.274	0.304
1b	0.773	0.000
Periodos tratamiento		
Basal	0.782	0.008
48 Horas	0.399	0.254
7 días	0.778	0.008
4 semanas	0.867	0.002
12 semanas	0.594	0.121
24 semanas*		
48 semanas	0.875	0.004
72 semanas*		

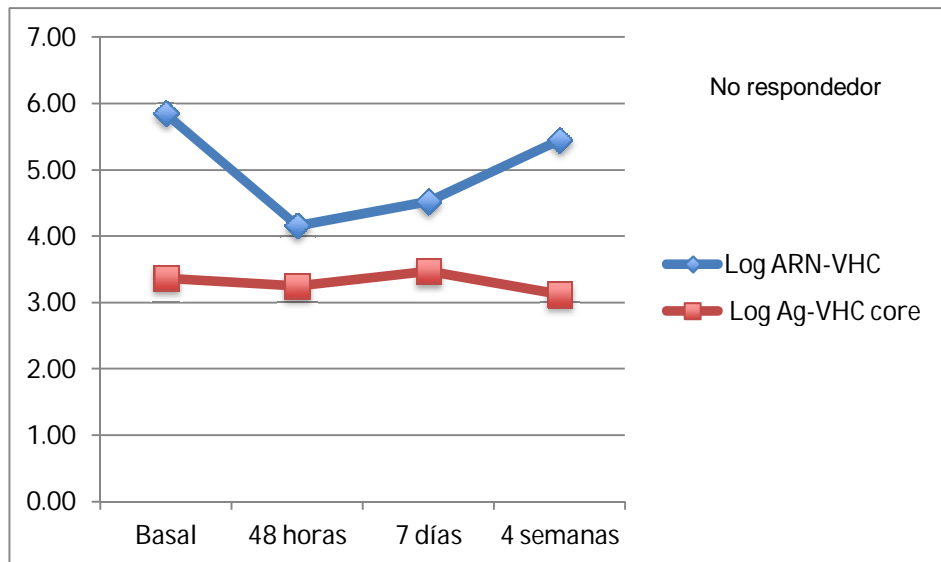
Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$

* Sin datos suficientes para realizar análisis.

En la Gráfica 3 se ilustra, el seguimiento de la cinética viral por determinación de ARN-VHC y el Ag-VHC *core* muy forma similar. Se observa la respuesta virológica temprana a las 12 semanas en el grupo de respondedores. Mientras en el grupo de no respondedores no se observa la disminución esperada a las 12 semanas de tratamiento (Gráfica 4).



Gráfica 3. Cinética viral de ARN-VHC y Ag-VHC *core* en un paciente que recibió terapia con interferón alfa pegilado y ribavirina.



Gráfica 4. Cinética viral de ARN-VHC y Ag-VHC *core* en un paciente que recibió terapia con interferón alfa pegilado y ribavirina, sin responder al tratamiento.

CONCLUSIONES

Se evaluaron las características intrínsecas de rendimiento analítico en un laboratorio clínico de rutina y se determinó su utilidad potencial en el manejo clínico de los pacientes infectados por VHC.

Se encontró que el ensayo es específico, reproducible, lineal sobre un amplio rango dinámico y sensible analíticamente.

El ensayo reunió las afirmaciones del fabricante en términos de linealidad desde 3 a 20,000 fmol/L. De todas las variantes genotípicas que existen a nivel mundial, solo se cuantificó el 1a y 1b, en donde el ensayo no es afectado por la variabilidad genotípica VHC.²⁶

Aunque la detección de ARN-VHC representa el método más sensible para determinar la infección por VHC persistente, el ensayo requiere de mucho tiempo, costo y técnicamente exigente.²⁷ Se observa una adecuada correlación a la semana 12 de tratamiento (EVR), siendo un buen método alternativo para el seguimiento en el tratamiento.

El Ag-VHC *core* es más fácil de realizar en comparación de PCR en tiempo real y es menos costoso, proporciona información fiable acerca de la carga viral y puede ayudar a asegurar un exacto seguimiento médico. El Ag-VHC *core* es una herramienta apropiada para el escrutinio y además se puede distinguir con eficacia la respuesta al tratamiento.²⁸

ANEXO 1

CÉDULA DE RECOLECCIÓN DE DATOS HEPATITIS C



FECHA: _____

NO: _____

DATOS GENERALES EPIDEMIOLÓGICOS

Iniciales: _____

Edad: _____

Género: _____

No. Registro: _____

SEGUIMIENTO

1ª vez _____

Control _____

Tratamiento: _____

Semanas: _____

DATOS BIOQUÍMICOS

Genotipo : _____

BIBLIOGRAFÍA

1. Barba JR. La hepatitis C y el laboratorio clínico. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55 (4): 187-200.
2. Nash KL, Bentley I, Hirschfield GM. Managing hepatitis C virus infection. *BMJ* 2009; 339 (7711): 37-42.
3. Shah DO, Chang CD, Jiang LX. Combination HCV core antigen and antibody assay on a fully automated chemiluminescence analyzer. *Transfusion* 2003; 43 (8): 1067-1074.
4. Méndez SM. National Consensus of Hepatitis C. *Annals of hepatology* 2002; 1 (3): 148-154.
5. Laperche S, Marrec NL, Girault A. Simultaneous Detection of Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen and Anti-HCV Antibodies Improves the Early Detection of HCV Infection. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (8): 3877-3883.
6. Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH. Response-Guided Telaprevir Combination Treatment for Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 2011; 365 (11): 1014-1024.
7. Contreras AM, Tornero CM, Orozco A. Redescubriendo el anticuerpo a hepatitis C. Nuevas estrategias de escrutinio y diagnóstico. *Gac Méd Méx* 2007; 143 Supl 2: 3-12.
8. Cordeiro N, Taroco R, Chiparelli H. Virus de las hepatitis. *Temas de bacteriología y virología médica*: 477-513.
9. Márquez MG, Santoscoy FA, Montoya H. Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C en población mexicana seleccionada. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55 (2): 79-87.
10. Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. *Microb Infect* 2010; 12 (4): 263-271.
11. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13 (2): 223-235.
12. Terrés AM. Hepatitis C. Historia natural y estado actual de su manejo. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50 (4): 179-189.
13. André P, Perlemuter G. Hepatitis C Virus Particles and Lipoprotein Metabolism. *Seminars in Liver Disease* 2005; 25 (1): 93-104.
14. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of the hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5 (6): 453-463.
15. Germi R, Crance JM, Garin D. Cellular Glycosaminoglycans and Low Density Lipoprotein Receptor Are Involved in Hepatitis C Virus Adsorption. *Journal of Medical Virology* 2002; 68 (2): 206-215.
16. Myrmel H, Ulvestad E. The hepatitis C virus enigma. *Journal Compilation* 2009; 117: 427-439.
17. Hepatitis C. *Ann Intern Med* 2008; 148: ITC6-1.
18. Pawlotsky JM. Clinical Virology of Hepatitis C. Management of Patients with Viral Hepatitis 2004: 21-34.
19. Pawlotsky JM. Use and Interpretation of Virological Tests for Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (5), Suppl. 1: S65-S73.

20. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS. Interleukin-28B Polymorphism Improves Viral Kinetics and Is the Strongest Pretreatment Predictor of Sustained Virologic Response in Genotype 1 Hepatitis C Virus. *Gastroenterology* 2010 (1); 139: 120-129.
21. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update. *AASLD PRACTICE GUIDELINES. Hepatology* 2009; 49 (4): 1335-1374.
22. Wilkins T, Malcolm J. Hepatitis C: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician* 2010 (81); 11; 1351-1357.
23. Maynard M, Pradat P. Clinical relevance of total HCV Core antigen testing for hepatitis C monitoring and for predicting patients' response to therapy. *Journal of Viral Hepatitis* 2003; 10: 318–323.
24. Morota K, Fujinami R. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *Journal of Virological Methods* 2009; 157: 8-14.
25. Chan YH. *Biostatistics 104: Correlational analysis*. Singapore Med J 2003; 44 (12): 614-619.
26. Ross R.S, Viazov S. Analytical Performance Characteristics and Clinical Utility of a Novel Assay for Total Hepatitis C Virus Core Antigen Quantification. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48 (4): 1161–1168.
27. Hayashi K, Hasuike S. Usefulness of a new immuno-radiometric assay to detect hepatitis C core antigen in a community-based population. *Journal of Viral Hepatitis* 2005; 12: 106–110.
28. Gaudy C, Thevenas C. Usefulness of the Hepatitis C Virus Core Antigen Assay for Screening of a Population Undergoing Routine Medical Checkup. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (4): 1722–1726.