



**Universidad
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**“UTILIDAD DIAGNÓSTICA DEL MÉTODO DE
ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA FRENTE AL PCR EN TIEMPO
REAL, PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS C EN UN CENTRO
DE DIÁLISIS DE LIMA, 2018”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA
EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Presentado por:

Bachiller HERRERA CRISPÍN, DIANA IRMA

Bachiller PEÑA SANTA CRUZ, ELMA

LIMA – PERÚ

2019

DEDICATORIA

Dedicamos este logro a nuestros hijos y a nuestras parejas por habernos apoyado continuamente en a lo largo de nuestra carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios por habernos permitido estudiar en esta universidad, a los docentes que nos formaron en nuestra carrera profesional, a nuestro asesor por su valioso aporte en cada etapa de la elaboración de nuestra tesis para lograr la licenciatura

ASESOR DE TESIS

Dr. NAVARRETE MEJÍA, PEDRO JAVIER

JURADO

PRESIDENTE

Dr. Sandoval Vegas, Miguel

VOCAL

Dra. Arispe Alburqueque, Claudia

SECRETARIA

Mg. Huamán Cárdenas, Víctor

ÍNDICE

Pág.

1. CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema.....	13
1.2. Formulación del problema.....	14
1.2.1. Pregunta general.....	14
1.2.1. Preguntas específicas.....	15
1.3. Justificación.....	15
1.4. Objetivos.....	17
1.4.1. Objetivo general.....	17
1.4.2. Objetivos específicos.....	17

2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.....	18
2.2. Base teórica.....	25
2.3. Terminología básica.....	64
2.4. Hipótesis.....	65
2.5. Variables.....	65

3. CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y nivel de investigación.....	66
3.2. Población y muestra.....	66
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	67
3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	68
3.5. Aspectos éticos.....	68

4. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.....	69
4.2. Discusión.....	72

5. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.....	75
------------------------	----

5.2. Recomendaciones.....	76
REFERENCIAS	77
ANEXOS	
Anexo 01. Instrumento de recolección de datos.....	84

ÍNDICE TABLAS

	Pág.
Tabla N°1. Tabla de contingencia resultados por ECLIA frente a PCR-RT	69
Tabla N°2. Resultados de sensibilidad y especificidad de ECLIA frente a PCR-RT para muestras de estudio	70
Tabla N°3. Resultados de VPP y VPN de la enfermedad dado resultado ECLIA	71
Tabla N°4. Indicadores de concordancia entre ECLIA y PCR-RT para diagnóstico del VHC muestras de estudio de pacientes con hemodiálisis.....	71

RESUMEN

Introducción: La infección por virus de hepatitis C es un problema de salud pública a nivel mundial, la OMS calcula en más de 170 millones las personas infectadas por esta enfermedad. Por tanto, es importante poder determinar un método alternativo al Gold estándar que sea confiable, sensible y de utilidad diagnóstica aceptable sobre todo en la etapa de diagnóstico temprano de la enfermedad.

El objetivo del presente estudio es identificar la utilidad diagnóstica del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR-RT para el diagnóstico de Hepatitis C en un centro de diálisis de Lima año 2018.

Instrumentos y Métodos: El estudio es de tipo observacional, transversal y retrospectivo en el que se analizaron los resultados de muestras de suero de pacientes hemodializados de un centro de salud renal de Lima en el año 2018, incluyéndose resultados de pruebas inmunológicas con el método ECLIA y a la vez con pruebas moleculares mediante el método PCR en tiempo real de pacientes dializados con etiología determinada de insuficiencia renal crónica terminal en terapia dializante y excluyendo resultados de pruebas inmunoserológicas dudosas o indeterminadas, sueros de neonatos y pacientes menores de 18 años. Se empleó como primer método de detección de VHC la tecnología Electroquimioluminiscencia y como prueba Gold Estándar al método PCR en tiempo real. Para determinar el grado de validez diagnóstica del método ECLIA frente al PCR-RT se hizo uso de los índices de sensibilidad y especificidad, Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Resultados: De 123 muestras de suero y plasma con resultados en ambas pruebas entre enero y diciembre 2018 mostraron 45% de sueros Reactivos por ECLIA (55/123) y 17% de sueros detectables por PCR-RT (21/123), sensibilidad de 90% (19 reactivos por ECLIA de 21 muestras detectables por PCR-RT), especificidad de 65% (66 no reactivos por ECLIA de 102 muestras no detectables por PCR-RT), VPP de 93% y VPN de 57%. También se encontró un índice Kappa de Cohen del 0.3359 y un nivel de concordancia entre ambas pruebas del 69.1% sin excluir coincidencias debido al azar. Conclusiones: La prueba ECLIA es altamente sensible y medianamente específica para VHC en pacientes dializados, con un alto y mediano grado de seguridad diagnóstica para confirmación de pacientes enfermos y sanos respectivamente. El grado de coincidencias en el diagnóstico entre la prueba

ECLIA y la Gold estándar es de nivel moderado. Palabras Clave: HCV, ECLIA, PCR-RT, Sensibilidad, Especificidad, Índice de Concordancia.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C virus infection is a public health problem worldwide, WHO estimates more than 170 million people infected by this disease. Therefore, it is important to be able to determine an alternative method to the Gold standard that is reliable, sensitive and of acceptable diagnostic utility, especially at the stage of early diagnosis of the disease.

The objective of this study is to identify the diagnostic utility of the electrochemiluminescence test method against the PCR-RT method for the diagnosis of Hepatitis C in a dialysis center in Lima year 2018.

Instruments and Methods: The study is observational, cross-sectional and retrospective in which the results of serum samples of hemodialysis patients from a renal health center in Lima in 2018 were analyzed, including results of immunological tests with the ECLIA method and at the same time with molecular tests by means of the real-time PCR method of dialyzed patients with a determined etiology of terminal chronic renal failure in dialysate therapy and excluding results of doubtful or indeterminate immunoserological tests, sera of neonates and patients under 18 years. Electrochemiluminescence technology was used as the first HCV detection method and as a Gold Standard test to the real-time PCR method. To determine the degree of diagnostic validity of the ECLIA method against PCR-RT, the sensitivity and specificity indices, positive predictive value and negative predictive value were used. Results: Of 123 serum and plasma samples with results in both tests between January and December 2018, they showed 45% of reactive sera by ECLIA (55/123) and 17% of sera detectable by PCR-RT (21/123), sensitivity of 90% (19 reagents per ECLIA of 21 samples detectable by PCR-RT), specificity of 65% (66 non-reactive per ECLIA of 102 samples not detectable by PCR-RT), VPP of 93% and NPV of 57%. A Cohen Kappa index of 0.3359 and a concordance level between both tests of 69.1% were also found without excluding coincidences due to chance. Conclusions: The ECLIA test is highly sensitive and moderately specific for HCV in dialysis patients, with a high and medium degree of diagnostic safety for confirmation of sick and healthy patients respectively. The degree of coincidences in the diagnosis between the ECLIA test and the standard Gold is of moderate level. Keywords: HCV, ECLIA, PCR-RT, Sensitivity, Specificity, Concordance Index.

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La acreditación del SGC según especificación de la norma ISO 15189 tiene como requisito necesario el proceso de verificación. En este contexto, evaluar métodos cualitativos es fundamental para lograr la mejora continua en los servicios de laboratorio, los cuales deben cumplir con requisitos internacionales del SGC (sistema de gestión de calidad) que permita mejorar la confiabilidad de los resultados brindados por laboratorios (1).

Desarrollar protocolos normalizados de evaluación, como CLSI ha contribuido en definir, protocolizar el proceso de recolección de datos, el proceso estadístico de los mismos y la interpretación de todos los reportes obtenidos; sin embargo, al aplicar estas guías integramos criterios, aun presentando algunas diferencias en cuanto a la interpretación que cada profesional o usuario puede realizar con los resultados obtenidos. Los protocolos o procedimientos de evaluación hacen uso de las significancias estadísticas para la aceptación o rechazo de datos, sin tomar en cuenta el impacto clínico (2,3).

En el caso particular del virus de la VHC, patógeno que prevalece en todas partes de países del mundo y siendo principal causas de morbimortalidad, determinar los atributos de validez diagnóstica y seguridad en términos de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN)

de las pruebas diagnósticas, en especial en diagnóstico temprano, tendría un gran impacto sobre los indicadores sanitarios (4,5).

Realizar la evaluación diagnóstica, comparando los resultados obtenidos de una prueba que utiliza el método electroquimioluminiscente (ECLIA) con los de una prueba estándar de referencia en un mismo grupo de pacientes, permitirá conocer la relevancia de su uso y el impacto positivo sobre el diagnóstico temprano de la enfermedad, sin desmerecer los costos del diagnóstico (5). El ensayo por electroquimioluminiscencia (ECLIA) y el método de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en tiempo real son dos de los procesamientos diagnósticos más usados. El PCR es una prueba con una sensibilidad y especificidad del 81.2% y 96.15% respectivamente, siendo de alta especificidad (6). Además, que se caracteriza por la capacidad de amplificar y detectar la secuencia de ARN viral.

La presente investigación pretende conocer la utilidad diagnóstica de la ECLIA frente al PCR en tiempo real para el diagnóstico temprano de hepatitis C, para ellos se hace necesario conocer su S, E, VPP y VPN; especialmente, en un grupo de pacientes que, por características propias de la enfermedad, están expuestos a la infección por el virus.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Pregunta general

¿Cuál es la utilidad diagnóstica del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de Hepatitis C en un centro de diálisis de Lima, 2018?

1.2.2. Preguntas específicas

- ¿Cuál es el grado de validez diagnóstica en términos de sensibilidad y especificidad del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de Hepatitis C en un centro de diálisis de Lima, 2018?
- ¿Cuál es el grado de seguridad diagnóstica en términos de Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de hepatitis C en un centro de diálisis de Lima?
- ¿Cuál es el Índice Kappa del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de hepatitis C un centro de diálisis de Lima, 2018?

1.3. Justificación

La hepatitis C es el principal causante de enfermedad hepática crónica a nivel mundial y una de las principales causas de trasplante de hígado en países occidentales, hoy es definida como un problema de salud pública (4,5). Conocer la utilidad diagnóstica de los diversos métodos de laboratorio frente al virus de la hepatitis C (HCV) permitiría una mejor evaluación de los procesos y de la oportunidad diagnóstico con la finalidad de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Conocer el valor diagnóstico del ECLIA frente al PCR, determinando la S, E, VPP y VPN, sumado a los costos de ambas pruebas, podríamos estar frente a la posibilidad de no solo diagnóstico oportuno, sino también más barato.

La Hepatitis C no es exclusivo, como agente de enfermedad, de un determinado grupo poblacional, pero sin duda uno de los más expuestos son los pacientes que se dializan; es muy necesario que los profesionales que participan en el diagnóstico de laboratorio, tecnólogos médicos, tengan la certeza de los resultados que se reportan, no solo en aspectos de oportunidad sino también de precisión. Un buen diagnóstico permitirá al médico tratante un adecuado seguimiento y tratamiento.

Teniendo en consideración las prioridades nacionales de investigación en salud en Perú 2019-2023 indicado en el anexo de la Resolución Ministerial N° 658-2019/MINSA, que se fundamenta en la Ley N° 26842, la cual establece que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica en el campo de la salud individual y colectiva toda vez que es condición indispensable para el bienestar y medio fundamental para alcanzar el desarrollo humano.

Por tanto, motivadas por lo antes expuesto y siendo de interés público la transmisión de la hepatitis C a través de la hemodiálisis, buscando determinar el valor diagnóstico de un método de laboratorio de esta enfermedad es que realizamos el presente trabajo de investigación y con el fin de ser aplicado en los diferentes centros asistenciales de nuestro país (7).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

➤ Identificar la utilidad diagnóstica del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de Hepatitis C en un centro de diálisis de Lima, 2018.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el grado de validez diagnóstica en términos de sensibilidad y especificidad del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de Hepatitis C.
2. Determinar el grado de seguridad diagnóstica en términos de Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de hepatitis C.
3. Establecer el Índice Kappa del método de ensayo electroquimioluminiscencia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de hepatitis C.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Moorman A et al. (8) el año 2017 en EE.UU., realizaron un estudio, cuyo objetivo fue determinar el porcentaje de resultados de prueba de anticuerpos contra el VHC verdaderos y falsos positivos (anti-VHC) entre los participantes de 2007-2012 en el Estudio Nacional de Examen de Salud y Nutrición (NHANES), un estudio representativo a nivel nacional con una prevalencia de infección por VHC de aproximadamente 1%, mucho menor que en grupos típicamente recomendados para la detección del VHC, estudio de corte transversal, observacional, experimental. La investigación se desarrolló con 22,359 muestras de sangre de participantes de NHANES. Los resultados reactivos e indeterminados con el ensayo luminiscente (CIA) fueron confirmados utilizando una prueba de inmunotransferencia recombinante (RIBA) y una prueba de seguimiento de ARN de VHC. Los Resultados, de 22,359 participantes de NHANES evaluados, 479 (2%) fueron reactivos de detección anti-VHC y 477 fueron evaluados para RIBA; de estos 323 (68%) confirmados como verdaderos positivos y 105 (22%) eran falsos positivos. Muchos otros (49, 10%) eran RIBA indeterminados y probablemente falsos positivos. Debido a estas pruebas positivas falsas, la prevalencia general de infección crónica entre los que probaron el reactivo de detección anti-VHC fue mucho más baja (218, 51%) de lo que se esperaría debido al aclaramiento de la enfermedad solo (aproximadamente 80%). En conclusión, todas las pruebas positivas de detección de anti-VHC deben ser

seguidas por una prueba de ARN de VHC, para confirmar si el paciente tiene infección actual, de modo que las personas infectadas puedan ser derivadas a atención y tratamiento para evitar la morbilidad y mortalidad significativas asociadas con la infección crónica por VHC.

Doğan M et al. (9) el año 2016 en Turquía, realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar comparativamente el desempeño de dos pruebas automatizadas, quimioluminiscencia y ensayo RIBA, para el diagnóstico de VHC. Se trató de un estudio comparativo de corte longitudinal, observacional, experimental. La investigación se desarrolló con 54,178 muestras de sangre de pacientes pertenecientes al Konya Numune Hospital. Los resultados límite y reactivos con CLIA se confirmaron mediante un ensayo de inmunotransferencia recombinante (RIBA). Los sujetos, con una prueba de RIBA positiva, se consideraron como verdaderos anti-VHC positivos. Del total de muestras, 649 sueros fueron reactivos con el método de quimioluminiscencia; 374 fueron confirmados por RIBA. Los resultados de RIBA mostraron 171 (45.7%) negativos, 163 (43.5%) positivos y 40 (10.7%) resultados indeterminados. Mediante el uso de la nueva versión de la prueba, la tasa de resultados de pruebas anti-VHC falsos positivos e indeterminados disminuyó de 75.1% a 35.5%. El estudio determinó una disminución de las tasas de falsos positivos en las pruebas, la reducción proporciona mayor confianza, en el RIBA, como método diagnóstico frente al VHC.

Salvatierra K et al. (10) en su estudio Análisis del VHC en pacientes en hemodializados tuvo como objetivo determinar la prevalencia y descubrir las

características de la infección en un grupo de pacientes hemodializados. El tipo de estudio fue de corte longitudinal, observacional, experimental. Por enzimoimmunoanálisis se evaluó la presencia del VHC en 113 muestras de sangre de pacientes con insuficiencia renal crónica. “En los casos positivos se confirmó la presencia de genoma viral por medio de una RT-PCR anidada de la región 5 no codificante del VHC y se determinó el genotipo y subtipo viral mediante análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción” (10). “El 89,4% (n = 101) de los casos fueron no reactivos para anticuerpos contra el VHC mediante enzimoimmunoanálisis, mientras que el 10,6% (n = 12) de los casos fueron reactivos. Se confirmó el resultado reactivo en los 12 casos por RT-PCR, y se determinó la infección por genotipo 1a (7/12) y genotipo 2a (5/12)” (10). La prevalencia de pacientes hemodializados infectados con el VHC fue 10,6%, además los genotipos virales del VHC (1a y 2a) coinciden con los genotipos prevalentes en la población de Argentina.

Chevaliez S et al. (11), el año 2013 en EE.UU., realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar el desempeño de dos versiones diferentes del ensayo Cobas AmpliPrep / Cobas TaqMan HCV, versión 2.0 (CAP / CTM HCV v2.0) (PCR tiempo real), para cuantificar con precisión el ARN del VHC de diferentes subtipos del genotipo del VHC 4. Se trata de un estudio comparativo de corte transversal, observacional, experimental. El estudio se desarrolló con 126 muestras de sangre de pacientes infectados con el genotipo 4 del VHC, divididos en dos grupos: “El grupo A, formado por 122 pacientes con infección crónica por el genotipo 4 del VHC, y el grupo B constituido por 4 pacientes con el genotipo 4 del VHC, en los cuales el ARN del VHC no era detectable utilizando el CAP / CTM” (11). Los

resultados de cada muestra se comprobaron con el ensayo de ADN ramificado (bDNA) de tercera generación, CAP / CTM HCV y CAP / CTM HCV v2.0. El nivel de ARN del VHC fue más bajo en CAP / CTM VHC que en bDNA en el 76.2% de los casos, independientemente del subtipo de genotipo 4 del VHC. En contraste, la correlación entre los valores de bDNA y CAP / CTM HCV v2.0 fue excelente. CAP / CTM HCV v2.0 cuantificó con precisión los niveles de ARN del VHC. La versión CAP / CTM HCV v2.0 se puede usar con confianza como técnica de PCR tiempo real, para detectar y cuantificar el ARN del genotipo 4 del HCV en la práctica clínica.

Emerson J. et al. (12) el año 2013 en EE.UU., realizaron un estudio cuyo objetivo fue investigar las posibles causas de interferencias que se presentan en los inmunoensayos en el laboratorio, interferencias que no son fácilmente detectables antes del análisis, pero el obtener resultados erróneos pueden causar un impacto potencial en el tratamiento médico inadecuado. Se trata de un estudio retrospectivo de corte longitudinal, descriptivo. En la investigación se describieron tipos de interferencia específicos de los inmunoensayos, anticuerpos endógenos que pueden ser de tres tipos: heterófilos (tienen baja avidéz), antianimales (mayor avidéz) y autoanticuerpos (pueden producir títulos elevados de anticuerpos). La prevalencia de anticuerpos interferentes varía de una población de pacientes a otra; la incidencia de interferencia también varía según el tipo de inmunoensayo. Describieron enfoques retroactivos (casos en que se cuestiona el resultado de laboratorio porque es inconsistente con los hallazgos clínicos o excede los límites extremos), proactivos (implementaría un mecanismo o procedimiento que detectaría la presencia de anticuerpos interferentes antes de obtener o informar el

resultado) para detectar anticuerpos interferentes. Ante una sospecha la interferencia, la mayoría de los laboratorios clínicos tienen la capacidad de investigar utilizando varias técnicas. El conocimiento de la incidencia, los mecanismos de las interferencias de inmunoensayo y los métodos recomendados para la solución de problemas es crucial para garantizar la calidad general de los resultados del inmunoensayo.

Cabezas M. et al. (13) el año 2012 en España, elaboraron un estudio cuyo objetivo fue dar a conocer sobre un sistema automatizado para el diagnóstico y cuantificación de los virus de la (HBSag y VHC), considerada infecciones importantes de salud pública debido a su prevalencia en todo el mundo. El diagnóstico oportuno de estas infecciones es una parte importante de la actividad de laboratorio de rutina. Los marcadores serológicos y moleculares son elementos clave en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del tratamiento para las infecciones por VHB y VHC; mencionaron a los analizadores automáticos de inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) que se utilizan ampliamente para el diagnóstico virológico. Las técnicas de biología molecular se utilizan para detectar y cuantificar genomas virales, así como para analizar su secuencia, con el fin de determinar su genotipo y detectar resistencia a fármacos antivirales. La PCR en tiempo real, que proporciona una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico, tiene como objetivo la cuantificación y detección de ácido nucleico; mencionaron las técnicas de secuenciación de ADN próxima generación. Los marcadores serológicos y moleculares disponibles para el VHB y el VHC se analizaron en el artículo, junto con su utilidad y limitaciones para su uso en el diagnóstico y monitoreo de la hepatitis C crónica (VHC). Los PCR en tiempo real, actualmente,

disponibles son fáciles de realizar y tienen un tiempo de respuesta corto; sin embargo, son costosas.

Kesli R. et al. (14) el año 2011 en Turquía, realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar comparativamente el desempeño de las pruebas automatizadas EIA o CLIA (antígeno del núcleo del VHC) PCR tiempo real (prueba del ARN del VHC para confirmar los resultados anti-VHC), así determinar si la prueba del antígeno del núcleo del VHC se puede utilizar como una prueba de confirmación alternativa a la prueba del ARN del VHC y evaluar el diagnóstico valores de la prueba de antígeno de núcleo de VHC total mediante la determinación de la especificidad de diagnóstico y las tasas de sensibilidad en comparación con la prueba de ARN de VHC. Se realizó un estudio comparativo de corte longitudinal, observacional, experimental. La investigación se desarrolló con 212 muestras de suero en el Departamento de Microbiología del Hospital de Educación e Investigación Konya. Los resultados positivos se confirmaron con un método PCR de transcripción inversa prueba del ARN del VHC. Resultados: 154 muestras (VP) ,38muestras (FP) ,6 muestras (FN) y14muestras (VN) tanto para ARN del VHC como para VHC Ag; La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos de la prueba Ac del VHC en comparación con la prueba del Ag del VHC fueron 96.3%, 26.9%, 80.2% y 70% respectivamente. Los niveles de antígeno central del VHC mostraron una buena correlación con los de la cuantificación del ARN del VHC ($r = 0,907$). El estudio determinó que el ensayo de antígeno HCV es altamente específico, sensible, confiable, fácil de realizar, reproducible, rentable y aplicable como prueba de detección, complementaria y pre confirmativa para los análisis anti-VHC.

Mota et al. (15) el año 2010 en Brasil, realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar comparativamente el desempeño de tres pruebas automatizadas, quimioluminiscencia (CLIA), electroquimioluminiscencia (ECLIA), para detectar anti-VHC (ensayos ARCHITECT de Abbott, Elecsys de Roche) y ensayo inmunoblot con tiras (RIBA). Se trata de un estudio comparativo de corte longitudinal, observacional, experimental. La investigación se llevó a cabo con 67 muestras de suero del Laboratorio Central de Salud Pública del Estado de Bahía. Los resultados indeterminados y positivos fueron confirmados mediante un ensayo de inmunotransferencia recombinante (RIBA). El resultado fue con el ensayo Architect anti-VHC: 18 muestras positivas, 39 negativas y 10 muestras no determinadas, mientras que con el ensayo anti-VHC Elecsys: 47 muestras negativas y 20 positivas. No hubo muestras indeterminadas con esta prueba. De las diez muestras indeterminadas en el ensayo Architect anti-HCV, cinco fueron negativas por la prueba RIBA y cinco fueron indeterminadas. El estudio determinó que las dos pruebas, cuando se compararon (62 muestras) entre sí, tuvieron una concordancia de 91.9%. El ensayo anti-HCV de Elecsys parece ser menos sensible que el ensayo anti-HCV de Architect, confirmado por RIBA. Por otro lado, el ensayo Architect anti-HCV presentó un mayor número de resultados en muestras negativas confirmadas por RIBA, lo que sugiere una menor especificidad en comparación con la otra prueba evaluada.

Rivero R, et al. (16) el año 2009 en Cuba, realizaron un estudio sobre la eficacia diagnóstica de sistemas de Inmunoensayos para VHC en pacientes multitransfundidos, paralelo al Inmunoensayo (UBI® HCV EIA 4.0) frente al

sistema PCR COBAS (AmpliScreen HCV Test, v2.) Para el diagnóstico de VHC. Fue un estudio comparativo correlacional de corte longitudinal, observacional, experimental. El estudio lo realizaron con 335 sueros de pacientes hematológicos (con hemofilia, anemia drepanocítica, leucemias, linfomas) y no hematológicos (con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis), multitransfundidos de sangre alogénica o el equivalente en componentes, al menos en 2 eventos transfusionales diferentes, 14 o más días antes de la investigación pertenecientes al Instituto de Hematología e Inmunología, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch López", Hospital Clínico quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", Hospitales Universitarios Provinciales (clínico quirúrgicos o generales) y pediátricos de las provincias de Pinar del Río y Villa Clara. "Se procesaron en paralelo los 335 sueros de pacientes por los sistemas UBI® HCV EIA 4.0 y UMELISA HCV 3er Gen. Los resultados incongruentes se confirmaron por el sistema de PCR COBAS (AmpliScreen HCV Test, v2)" (16). "Cuando se comparó el sistema UMELISA HCV 3er Gen. con el UBI® HCV EIA 4.0 se obtuvo una sensibilidad de 96,99%, especificidad de 94 %, VPP de 100%, VPN 97.13%, Índice de k: 0,97%, alto grado de concordancia. Se concluyó que ambos sistemas de inmunoensayos fueron satisfactorios para el inmunodiagnóstico de pacientes multitransfundidos" (16).

2.2. Base teórica

2.2.1. Hepatitis C (HCV)

La palabra hepatitis proviene del griego hepar que significa hígado por ende las hepatitis son un grupo de patologías cuya característica es producir inflamación del hígado. Pueden ser debidas a múltiples causas tales como infecciones (virus, hongos, parásitos o bacterias), alcohol, drogas, medicamentos, enfermedades

autoinmunes o enfermedades metabólicas (fibrosis quística y enfermedad de Wilson), dando origen a las hepatitis infecciosas no infecciosas (17).

La hepatitis infecciosa producida por el virus trio: A, B, C: Actualmente, el virus de la hepatitis C se ha convertido en una de las enfermedades infecciosas emergentes (18). Generalmente, la infección por el virus de la hepatitis C presenta un cuadro que evoluciona lentamente durante un amplio periodo. La hepatitis aguda refiere a una inflamación que ocurre en el parénquima hepático, presenta algunos síntomas inespecíficos como: anorexia, ictericia, náuseas, vómitos, malestar general y dolor en el hipocondrio derecho, con un periodo de incubación de 3-10 días. Sin embargo, ya establecida puede progresar a la etapa crónica. La hepatitis crónica, generalmente los pacientes son asintomáticos, la sintomatología frecuente en esta fase es la fatiga, seguida de anorexia, mialgias, artralgias, debilidad y pérdida de peso. Aproximadamente el 85% de los casos de hepatitis C pasaran a formar parte de una infección crónica, entre el 5 y 15% de pacientes con hepatitis C crónica presenta un cuadro que tiende a convertirse en cirrosis hepática en un periodo de 20 a 25 años, dependiendo de factores como: factores relacionados con el virus, con el huésped, del 1-4% presentan el riesgo de producir carcinoma hepatocelular (CHC) (19).

La infección por el VHC es un estado usual en pacientes con insuficiencia renal crónica en centro de hemodiálisis y por ende una causa principal de patología hepática.

2.2.2. Antecedentes históricos del virus de la hepatitis c

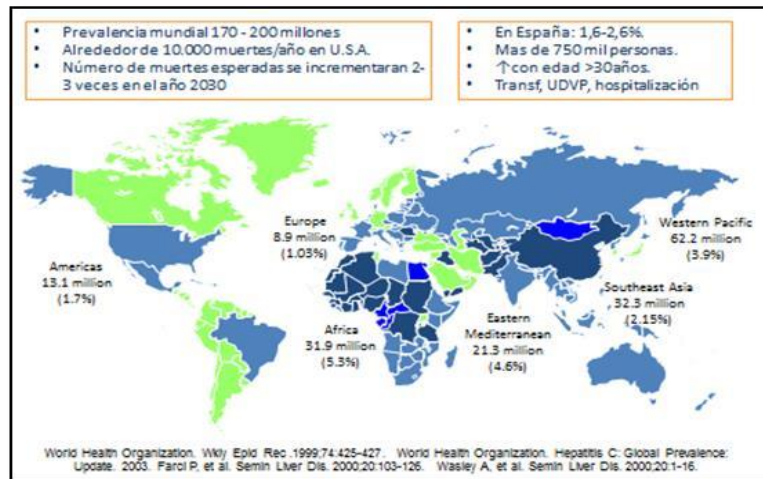
A inicios de 1970, varios casos de hepatitis asociadas a transfusiones no eran causadas por el virus de la hepatitis A ni por el virus de la hepatitis B; llamándose así la enfermedad de la hepatitis No A-No B(HNAHNB), desconociendo el tipo y número de agentes etiológicos. En New York Blood Center, 1974, Princl, et al. informaron de hepatitis post-transfuncional, 18% de pacientes (total de 25%) resultaron negativo para marcadores de hepatitis A y B. En 1989 en California, Michael Houghton junto a un grupo de investigadores de la corporación Chiron, por biología molecular y procedimientos inmunológicos, lograron identificar el agente causante de hepatitis (18).

2.2.3. Epidemiología

La Infección por el VHC es la segunda infección viral endémica más importante en el mundo después del VIH en el mundo. Se calcula que hay 170 millones de personas infectadas por el VHC, según la Organización Mundial de Salud, representa el 2.5% de la población a nivel mundial (20).

En América del norte el 1.6% (4.1 millones personas infectados por el VHC) el 1,3% tienen una infección crónica (3,2 millones). (ILUSTRACIÓN 1) muestra la distribución estimada a nivel mundial de la población infectada por el VHC. En América del norte la enfermedad del VHC, generalmente se transmite por transfusión sanguínea y drogas por vía intravenosa (21).

Ilustración N°1. Epidemiología y prevalencia mundial de la Hepatitis C.



Fuente: Micheloud D, El virus de la Hepatitis C. EMEI (Internet). 2008 (citado 10 dic 2008); disponible en: <https://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc/> (22).

Existe mayor prevalencia en África y Asia. En Egipto, existe mayor prevalencia VHC, 13% de la población se encuentra infectado, como resultado del uso de jeringas no esterilizadas para combatir enfermedades infecciosas como la esquistosomiasis, sin embargo, menor prevalencia en países de Alemania, Canadá, Francia y Australia (23). En Europa, según datos epidemiológicos, la alta prevalencia está en donantes de sangre, personal de salud y en grupos de riesgo (pacientes hemofílicos y pacientes sometidos a diálisis) (21).

Las personas que son atendidas en las unidades de hemodiálisis se encuentran a exposiciones vasculares prolongadas transmitiéndose así de una manera eficiente el VHC. Los pacientes con infección crónica por el VHC, juegan un papel fundamental en la epidemiología ya que el contacto en las unidades de diálisis con dichos pacientes y equipos e instrumentos contaminados representan vías importantes de contaminación. La administración de eritropoyetina en el

tratamiento de anemia en pacientes con enfermedad renal terminal, se eliminó la infección por transfusión del VHC. Sin embargo, la prevalencia continúa alrededor de 5 a 10 veces más que la población general (24).

En EE.UU. según el Center for Disease Control (CDC), la prevalencia de infección por el VHC depende del tiempo de permanencia que recibieron hemodialisis los pacientes, aumenta en promedio del 12% para pacientes que recibieron hemodiálisis por menos de 5 años, 37% para los que recibieron durante 5 años o más (10).

En el Perú, el VHC es un patógeno importante en salud pública en paciente hemodializados y trasplantados; estos grupos son los más estudiados con respecto a la prevalencia y otras características.

Un primer reporte, en 1997, indica un porcentaje alto en pacientes en hemodiálisis crónica con un valor de 83,9%; pacientes que estuvieron en tratamiento por más de 24 meses tenían 18 veces más probabilidad de dar positivo a la prueba contra anticuerpo. Los donantes de sangre conforman un grupo poblacional importante, en el cual acuden personas de distinto perfil social y siempre están sujeto a la vigilancia de enfermedades infecciosas. Farfán y Cabezas obtuvieron los datos de resultados de las pruebas de rutina que se hacen en bancos de sangre de todos los departamentos del Perú, donde hallaron prevalencias que varían de un año a otro en todos los departamentos, que se incrementa en todos en la población general (Cuadro N°1) (25).

Cuadro N°1. Prevalencia de HCV en población General

Autores	Prevalencia	Lugar	Años
Hyams <i>et al.</i>	3,2%	Iquitos	1986-1988
Farfán y Cabezas	0,42%	Nivel nacional	2000-2001
Mora y Julcamanyan	0,73%	Lima	2008-2013
Pinto <i>et al.</i>	0,81%	Lima	1998-2002
Alvarez <i>et al.</i>	1,25%	Callao	2010-2012
Morales <i>et al.</i>	0,8%	Lima	2012-2015

Los años indicados son aquellos de cuando se realizaron los estudios o de sueros almacenados correspondientes a esos años. Los valores de prevalencia son los promedios de los valores obtenidos por años.

Fuente: Florián - Carrillo C. Revisión Epidemiológica del Virus de la Hepatitis C en el Perú. Revista Peruana de Salud Pública y comunitaria. Publicado agosto 2018 (25).

La prevalencia reportadas en los centros de hemodiálisis de Lima y provincias estarían incrementándose sin posibilidad de control, según reportes recientes con tasas altas reportadas en el mundo, fluctuando entre 60% y 90%. Este incremento constituye un serio problema originando un impacto futuro en la sobre vida, mortalidad, morbilidad y posibilidad de trasplante de hígado (25).

Se conoce 6 genotipos: el genotipo 1 es el más común y representa 83.4 millones (46.2%) con amplia distribución geográfica en Europa del Norte y Occidental, Asia, América del Norte y del Sur y Australia; el genotipo 2 del VHC está distribuido en África Occidental y Central; el genotipo 3 del VHC es el genotipo más común, después del genotipo 1, y representa 54,3 millones (30,10%) aproximadamente el 75% de este número ocurre en el sur de Asia; el genotipo 4 es frecuente en Oriente Medio (Egipto). Estudios recientes demostraron otros genotipos y subtipos: 1a, 1b y 4^a; el genotipo 5 solo está presente en Sudáfrica; el genotipo 6 es endémico en el sudeste asiático (Hong Kong y China del Sur). Los

genotipos 2, 4, 6 son responsables de los casos restantes de VHC en el mundo, después de los casos causados por los genotipos 1 y 3 (25).

2.2.4. Factores de riesgo

El VHC se transmite por la exposición percutánea directa a sangre infecciosa; la persona con infección crónica es fundamental para la epidemiología de la transmisión del VHC. Los factores de riesgo asociados con la infección por VHC entre los pacientes en hemodiálisis incluyen antecedentes de transfusiones de sangre, el volumen de sangre transfundida y años en diálisis. El número de años en diálisis es el principal factor de riesgo asociado de manera independiente con tasas más altas de infección por VHC. A medida que aumenta el tiempo los pacientes en diálisis, su prevalencia de infección por VHC aumenta de un promedio del 12% para los pacientes que recibieron diálisis <5 años, 37% para los pacientes que recibieron diálisis > 5 años (26). Problema de salud pública para las personas que trabajan en salud. La prevalencia de VHC está relacionada por punción accidental con material contaminado, se considera un riesgo del 1%. Para evitar la hepatitis nosocomial tener en cuenta las medidas de precaución universal.

2.2.5. Taxonomía del virus

El virus de la hepatitis C pertenece a la familia Flavivirus, género hepacivirus. Circula vía sanguínea en dos formas: una con el virión intacto y otra formada por la cápside nuclear con pérdida de la envoltura de lípidos (18). Las formas

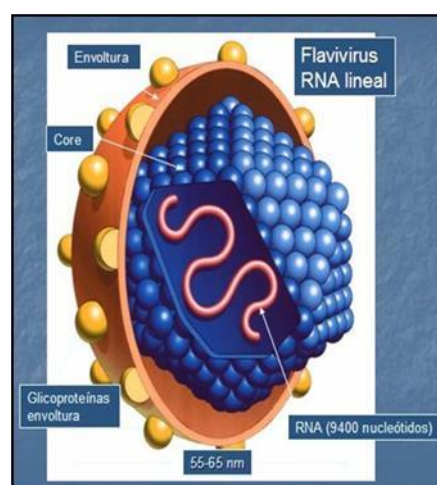
genómicas, la cadena positiva y replicativa de la cadena negativa del virus, pueden ser detectadas en el tejido del hígado mediante las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (18).

La partícula viral aislada de plasma presenta diferentes densidades se cree que se debe a la asociación con complejo de inmunoglobulinas o lipoproteínas celulares de baja densidad (27).

2.2.6. Estructura del virus

Estructuralmente es un virus de forma esférica, la partícula del virus mide 30-70nm, en su parte más externa una envuelta lipídica. En su interior encontramos el genoma viral formado por una cadena de ARN lineal simple de polaridad positiva y con un tamaño de aproximadamente 9,6Kb (28).

Ilustración N°2. Estructura del virus de la Hepatitis C



Fuente: Muñoz G. Diagnostico serologico y virologico del Hepatitis C y B. Medwave año VII.2007;N°4 (29).

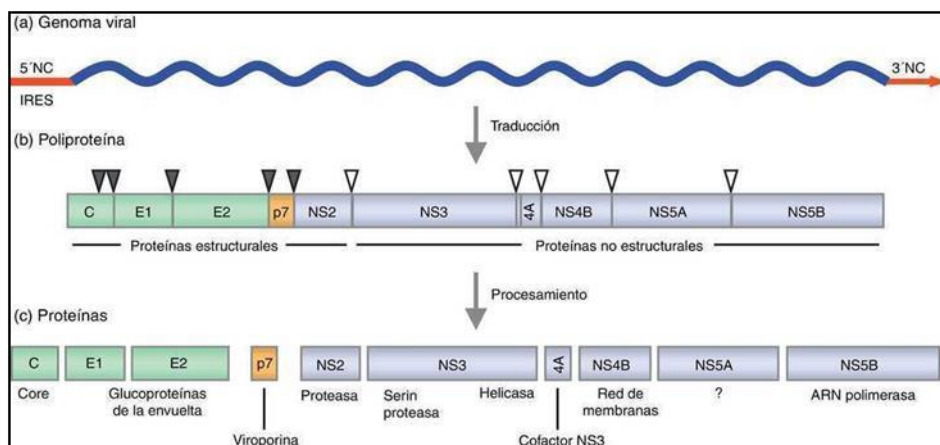
2.2.6.1. Propiedades Generales del ARN y Proteínas del VHC

El virus de la hepatitis C presenta un genoma este posee una única pauta de lectura (ORF), de 9.6 Kb, codifica una poliproteína de 3,010 aminoácidos, la región ORF, flanqueada a los extremos 5' y 3' dos regiones no traducidas llamadas 5' URT y 3' URT. Dichas regiones son importantes para: regulación y replicación del ARN del virus. El ARN genómico del VHC tiene tres regiones distintas:

- Un 5' URT sin codificación, es la región mejor conservada del genoma, contiene 342 nt. ubicados hacia arriba del codón de iniciación ORF, esta región dirige la unión o ensamblaje de la subunidad 40s (entrada ribosomal formando un complejo de pre iniciación) subunidad ribosomal para la traducción de la poliproteína del VHC.
- Un marco de lectura abierto largo (ORF) conformado por más de 9000 nucleótidos. Inicia por un codón de AUG, el largo codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que serán procesados posteriormente por hospesasas y proteasas virales.
- Un corto 3': la región 3'UTR, presenta dos zonas una zona variable formado por 40 nucleótidos, uracilos, una secuencia de polipirimidinica, citosina intercalas y zona conservada de 98 nucleótidos. Relacionado con la replicación, estabilización y el empaquetamiento del ARN viral a la vez esta región diana para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y fármacos antivirales.

La variabilidad de la secuencia de nucleótidos se distribuye a lo largo de todo en genoma viral. El 5' UTR es la región mejor conservada en el genoma, es el objetivo elegido para la detección del genoma del VHC a través de los genotipos, mientras que las proteínas de la envoltura codificante (E1, E2) son las más variables. La región 5' UTR por ser una zona altamente conservada es objetivo de elección para la detección del genoma (ilustración N°3) (30).

Ilustración N°3. Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas Virales.



Fuente: Koutsoudakis G, Forns X, Pérez del Pulgar S. Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas virales. Biología molecular aplicada del VHC. España 2013 (27).

El ARN del genoma viral codifica poliproteínas estructurales y no estructurales.

Las únicas proteínas presentes en la partícula viral, son las estructurales:

- Proteína de la nucleocapside o core (C): De 16-22 KDa, polipéptidos de 19aa, proteína básica, contiene “aa” Arginina y Lisina, conservada que envuelve el genoma del ARN viral. La cápside se une a la región 5' no traducida del VHC. Implicada en la hepatocarcinogenesis y esteatosis.

- Dos glicoproteínas de envoltura (E1, E2/p7). E1: presenta 192aa, PM.33-35 KDa, presenta un péptido, secuencia de separación en el extremo amino terminal. El extremo carboxilo es hidrofóbico con secuencias homologas a segmentos transmembránicos, implicados en el reconocimiento de los receptores específicos e ingreso del virus en la célula. E2 (gp72): Conocida como E2/NS1, PM.70-72 KDa, posiblemente actué en la unión inicial del virus con la célula del huésped, región hipervariable.
- P7, proviene de la glicoproteína E2, polipéptido de 63 aa hidrofóbicos, PM.7 KDa, forma canales iónicos, cumple un papel esencial en la infección por el virus (replicación viral).

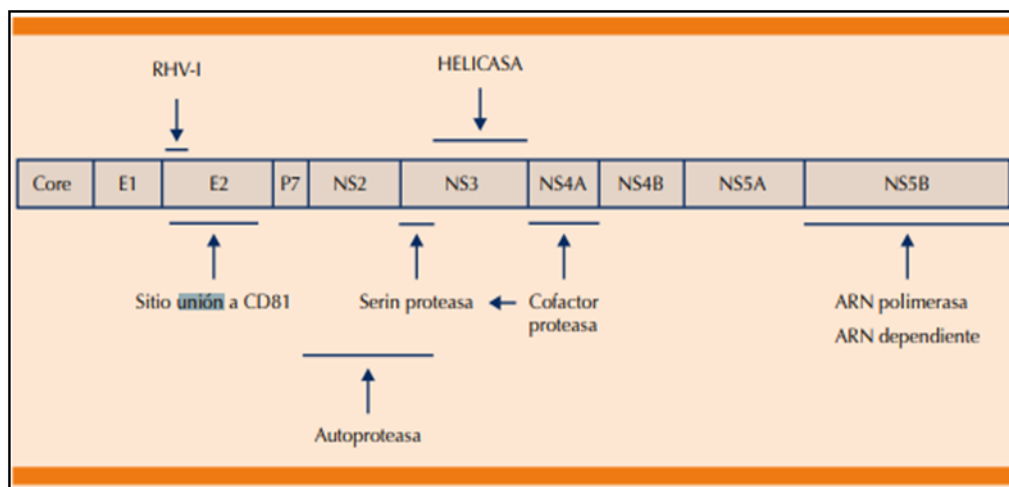
Proteínas No estructurales (NS): Formada por las siguientes proteasas virales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, las cuales deben sintetizarse antes de iniciar la replicación del genoma viral en la célula huésped:

- NS2, tiene un PM.23 KDa, dependiente de Zinc.
- NS3, tiene una actividad enzimática (proteasa, ATPasa y helicasa), proteína multifuncional, la helicasa es capaz desarrollar un molde de ARN durante la replicación del genoma viral. Presenta un extremo carboxilo (retículo endoplasmático) y un extremo amino (citoplasma).
- NS4A, tiene un peso 8 KDa, es útil en el corte por parte de NS3, función mediadora entre NS3 y NS4A con la membrana del retículo endoplasmático, importante para la función de la proteasa.
- NS4B, tiene un peso de 27 KDa, participa en la replicación viral, tiene como función formar microvesículas membranosas provenientes de la membrana

externa del retículo endoplásmico interiormente se localizan: la proteína del core y las proteínas no estructurales NS3-NS4A-NS4b-NS5A-NS5B.

- NS5A, fosfoproteína hidrofílica, PM, 56-58kDa. Se encuentra presente la región ISRD (Interferón sensitivity determining región) la cual posiblemente puede predecir la respuesta viral a la terapia con interferón. Posiblemente algunas mutaciones puntuales en esta proteína no estructural puede aumentar la replicación viral, a la vez que esta donde fosforilación influye en la eficacia de replicación.
- NS5B, proteína no estructural, tiene un peso molecular 65 KDa, es un ARN, dependiente de polimerasa, encargado de la replicación del genoma viral, forma típica de la polimerasa. Es de gran importancia para la terapia antiviral. (ILUSTRACION N°4) (31).

Ilustración N° 4. Esquema de la Poliproteína del VHC.



Fuente: Dueñas S, Acosta N, Morales J, García W. Biología Molecular del Virus de la Hepatitis C. Med int Mex. Mayo 2018 (31).

Proteínas virales, ubicadas a lo largo, codifica una poliproteína el cual es procesado en al menos 10 diferentes proteínas que están dispuesta en el orden

NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. La peptidasa de la señal del huésped es necesaria para las divisiones en las uniones C-E1, E1-E2, E2-p7 y p7-NS2. Las proteínas virales permanecen asociadas a las membranas intracelulares después de procesar (FIGURA N°4) (30).

Región terminal del VHC, el genoma termina en una en 3' región terminal no codificante, compuesta por alrededor de 200 nucleótido, está compuesto por uridina, altamente conservada, comprometida en la replicación genómica del virus. Conformada por 4 elementos (de cadena positiva 5' a 3'):

- Una secuencia corta con significativa variabilidad entre genotipos.
- Una zona poli (U).
- Una región de polipirimidinas, rica en uracilo con algunas citosinas.
- Una secuencia de 98 bases, que forma una estructura de tallo y anilla en el extremo (18).

Para diferenciar entre las especies, subespecies y cadenas del virus de la hepatitis C, se considera a las regiones posibles de ser empleadas: E2, NS2, NS5b, E1, NS4A, NS4B y NS5A. Sin embargo las regiones poco efectivas para diferenciar son: 5' no codifica, núcleo y NS3.

2.2.7. Genotipos y Subtipos del Virus de la Hepatitis C.

Los ensayos filogenéticos de diversos aislamientos del virus de la hepatitis C, refiere los diversos niveles de variabilidad genética en: genotipos (material genético del virus), subtipo y cuasiespecies. Simmonds, en el año de 1993 estableció un sistema de clasificación, describiendo 6 genotipos (1 al 6)

presentado de un 60 a 70% de homología, dentro de cada uno de los genotipos se encuentran los subtipos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j y k, los cuales presentan una homología del 60-70%, probablemente están descubriéndose nuevos subtipos. Debido a la falta de capacidad de corregir errores de la RNA polimerasa viral, en cualquier huésped infectado el RNA viral no está presente como una secuencia única, sino como un conjunto de secuencias muy parecidas, agrupadas alrededor de una secuencia mayoritaria, lo que se conoce como cuasiespecie. El genotipo 1, predictor de posible desarrollo de enfermedad hepática severa, a vez el genotipo 1b presenta mayor resistencia al tratamiento de interferón alfa (IFN alfa) los genotipos 1a y 1b ya que pueden evolucionar a cirrosis o hepatocarcinoma en respuesta al tratamiento, es por tal motivo se consideran como de peor pronóstico, los genotipos 2 y 3 tienen una mejor respuesta de eficacia al tratamiento combinado de IFN / ribavirina en comparación al 1 y 4 (18).

La frecuencia de los diversos genotipos varía de un país a otro, la literatura indica que la distribución y prevalencia de los genotipos se presenta en forma diferencial dependiendo de la región geográfica. Los genotipos también han sido asociados a la diferente respuesta al interferón (IFN) y a la combinación IFN / ribavirina. Existen secuencias específicas del núcleo: E1 y NS5 y subtipos de los genotipos 1 y 2, considerados útiles para el diagnóstico y aumento de sensibilidad en pruebas de detección molecular del virus. Los pacientes con hemofilia y los que reciben transfusiones frecuentemente es común la infección por más de dos genotipos. La identificación del genotipo viral se considera útil:

- En estudios de transmisión del VHC.
- Estudio de la epidemiología molecular.
- Estudio de la patogénesis.
- En el diagnóstico serológico y molecular.
- La historia natural y
- El tratamiento de la infección por el VHC.

La diversidad geográfica del genotipo en su distribución, como también la combinación de algunos genotipos con algunos factores de riesgo específicos, han originado estudios epidemiológicos en gran escala.

2.2.8. Ciclo del VHC

El virus de la hepatitis, tienen como principal célula diana de infección y replicación a los hepatocitos, también son capaces de infectar células sanguíneas como los mononucleares y polimorfonucleares.

- Adherencia del virus a la hepatocito poco descrita pero puede involucrar entre las proteínas superficiales del virus con el receptor de la célula del hepatocito
- Ingreso del virus a los hepatocitos, el virus ingresa a la célula previa unión de la glucoproteína E2, teniendo como receptor a las lipoproteínas baja densidad y el receptor CD81 membrana del hepatocito. Posteriormente el genoma es liberado en el citoplasma de la célula por endocitosis y eliminación de la cápside.

- Replicación. Para poder replicarse el virus, tiene que formar sus enzimas ya que los hepatocitos solo permiten la replicación del ADN; de esta manera se logra leer en forma directa en los ribosomas celulares, posteriormente el genoma viral se traduce parecido a un RNAm (genoma viral en sentido positivo). Luego de ser liberado inicia su traducción en la poliproteína de 3000 aa, proceso independiente de estructura luego necesita el ensamblaje de la subunidad 40s del ribosoma en el sitio IRES de la región 5' UTR, reconociendo el codón de inicio de la traducción. Conforme la proteína es traducida inicia el procesamiento de la misma catalizada por las proteasas codificadas por el virus (NS2 y NS3). Posteriormente dan lugar a las proteínas estructurales y no estructurales en su forma original (poliproteína larga) de acuerdo al siguiente orden: NH₂-C-E₂-E₂-p7-NS1-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COO. La replicación del RNA viral es catalizada por la enzima RNA polimerasa dependiente de RNA (es codificada por NS5b) originándose una hebra de polaridad negativa quedando como una copia madre, la cual servirá como molde para la copia de múltiples hebras de ARN de polaridad positiva (31). Los cortes iniciales de una poliproteína es catalizada por una proteasa del huésped originando a la única proteína de la cápside o core (c), las dos glicoproteínas (E1, E2) y la proteína p7. Sin embargo las proteínas no estructurales son sintetizadas por proteasas virales (NS2/3, NS3/4 A). Las proteínas virales, el ARN viral y factores celulares poco estudiados, todos incluidos en microvesículas dan origen al complejo de replicación del virus.

- Salida del virus de la hepatitis C, comprende la fijación de la patogenia viral a la membrana plasmática de la célula hospedera, proceso que provee al virus una envoltura lipídica. Las partículas maduras del virus migran de la célula a través de un proceso de exocitosis. Posteriormente las partículas virales se adhieren a las células del hepatocito, dando inicio otra vez al proceso. La heterogeneidad del virus se debe a una elevada tasa de replicación (10 a la 12 viriones producidas en un día) y a la tasa de error de la polimerasa.

2.2.9. Diagnóstico del virus de la Hepatitis C

El propósito del diagnóstico de infección viral es permitir que las personas infectadas sean identificadas y tratadas. Por lo tanto, el diagnóstico de infección viral es importante para prevenir la progresión de la enfermedad y la propagación viral. La mayoría de los pacientes infectados por el VHC primario son asintomáticos, por lo que los síntomas no se pueden utilizar como indicadores específicos para la infección por VHC. A todos los pacientes que son hemodializados se les realiza la determinación del nivel de aminotransferasas (ALT) en muestras de suero antes del inicio de la diálisis y mensualmente, y la detección de la respuesta inmunológica humoral contra proteínas virales (anticuerpos anti-VHC) mediante enzimoimmunoanálisis, antes del inicio de la diálisis y después, cada 6 meses para detectar la infección en forma precoz según las recomendaciones del CDC.

Para detectar la infección por VHC se realizan varios análisis de sangre, que incluye pruebas de detección de anticuerpos contra el VHC (anti-VHC) (10).

2.2.10. Inmunoensayo enzimático (EIA)

Chun et al. (30) menciona que se emplean enzimas como método de detección; las más utilizadas son FAL, peroxidasa de rábano picante y galactosidasa B. En la última fase de estas técnicas, se agrega un sustrato que reacciona con la enzima del reactivo para producir una señal detectable; se requiere un equipo específico para detecta la señal, la cual puede ser un cambio de color o emisión de luz; la intensidad de la señal indica la concentración de enzimas presentes e indirectamente del analito detectado. La generación de inmunoensayos, desde su diseño inicial, los IEA han experimentado un considerable desarrollo técnico. La sensibilidad y especificidad de las técnicas de detección del anticuerpo a VHC se incrementaron, debido al perfeccionamiento de los reactivos, específicamente de los antígenos empleados.

2.2.11. Analizador Cobas e411

El analizador e411 de la casa comercial Roche Diagnostic (31) procesa más de 50 pruebas, trabaja con varios fluidos como: suero, plasma y orina. Este equipo realiza: perfiles hormonales, marcadores tumorales, óseos, cardiacos, artríticos así como la detección de ACs de enfermedades infecciosas ocasionadas por virus o parásitos. Capacidad de trabajar realizando 15 diferentes ensayos, tiene un rotor con 18 cartuchos de diferentes reactivos. La carga de trabajo para el cobas411 consta en procesar 75 test en cada carga de trabajo y esto

aproximadamente 85 test por hora. Tecnología Electroquimiolumiscencia, basándose en el principio de la técnica Elisa para los test como: el principio sándwich 1 0 2 pasos (Analitos grandes), principio competitivo (Analitos muy pequeños). Y principio de formación de puentes para hallar ACs en cada muestra procesada. Cobas 411 nos ayuda a la detección de enfermedades, trastornos del metabolismo, marcadores tumorales, endocrinológicos, enfermedades infecciosas usando solamente 50 ul de muestra.

Ilustración N°5. Equipo Automatizado Cobas e411



Fuente: Roche Diagnostics GmbH D-68298 Mannheim. Germany: Roche Diagnostics; 2009. Disponible en: www.roche.com (32).

2.2.11.1. Eficiencia e411

Packs cobas e411:

- La presentación de los reactantes (Rvos.) es líquida, fácil de utilizar.
- Cada reactante viene con su calibrador, por cada parámetro, sirviendo de apoyo para el área de logística.
- Programación - carga tiene la función de realizar una gestión homogénea y segura de los datos.

- La pantalla para verificar los datos y hacer seguimiento es de fácil acceso para el usuario, dando resultados de búsqueda verídicos y confiables.
- Presenta una pantalla mejorada para revisión de datos.
- “Tecnología ECLIA, de Alta sensibilidad analítica que permite rangos de medición y volúmenes mínimos de muestra, presenta activación mediante voltaje para una reacción controlada que permite una alta precisión evitando repeticiones innecesarias, tiene tiempos cortos de incubación” (31).

2.2.11.2 Características de los reactivos del e411

“Los reactivos vienen preparados listos para utilizar, cada kit contiene entre 100 y 200 determinaciones, cada reactivo tiene un código de barra bidimensional, presenta kit para stat en 9 minutos y resultados de kit de rutina en 20 minutos, la estabilidad del reactivo a bordo es de 30 días” (31).

2.2.11.3. Mantenimiento del equipo e411

“Limpiezas diarias del sistema al terminar el trabajo o pedidas por el operador. Limpieza de LFC cada 15 días solicitado por el sistema Mantenimientos generales de Ingeniería cada tres meses y anual” (31).

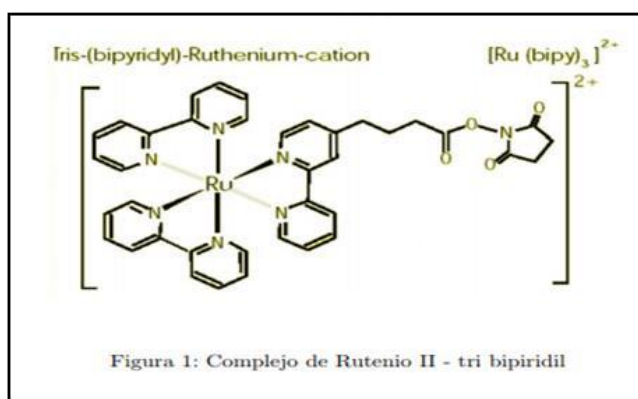
2.2.12. Electroquimioluminiscencia (ECLIA)

Según la casa comercial Roche (32) los procesos de la ECLIA presentan numerosas moléculas (rutenio, osmio, renio entre otros elementos). La Electroquimioluminiscencia es un proceso en el que se generan especies muy reactivas a partir de precursores estables en la superficie de un electrodo; estas especies sumamente reactivas reaccionan entre sí, y así producen luz. El desarrollo de los inmunoensayos ECL de origen se basa en el uso del complejo de rutenio (II) - tris (bipyridyl) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) y tripopilamida (TPA). El producto quimioluminiscente final se formará durante el paso de detección. Las reacciones quimioluminiscente que producen emisión de luz del complejo de rutenio se inicia por un proceso eléctrico en vez de químico, esto con la ayuda de voltajes a los complejos inmunológicos que están unidos a micropartículas recubiertas de estreptavidina. La gran ventaja de la iniciación eléctrica de la reacción quimioluminiscente es que se puede controlar de forma precisa toda reacción.

2.2.12.1. Complejo de rutenio

Reyes (34) señala que la electroquimioluminiscencia usa un quelato de rutenio como complejo para el desarrollo de la luz. Las sales de rutenio-tris (bipyridyl) son compuestos estables y solubles en agua. Los ligandos de bipyridyl se pueden modificar fácilmente con grupos reactivos para formar compuestos quimioluminiscente activados. Para el desarrollo de los inmunoensayos ECL usa un ester de Nhidroxisuccinimida (NHS) de un complejo modificado $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ porque se puede acoplar fácilmente con los grupos aminos de proteínas, haptenos y ácido nucleicos; esto permite aplicar tecnología de detección para los analitos.

Ilustración N°6. Complejo de Rutenio

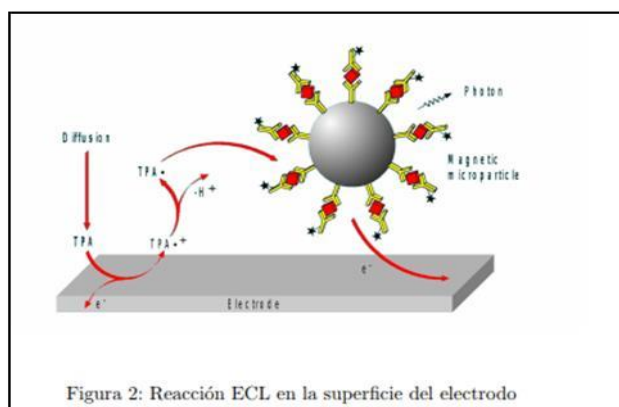


Fuente: Reyes González S. cámara de Fluorescencia, principios y oferta comparada. 2009 (citado 26 de may 2009); 8 (1): 3. Disponible en: http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario%202009/Monografias%20seminario%202009/REYES-monografia_camaras_ECL2009.p (34).

2.2.12.2. Reacción de ECLIA en la superficie del electrodo

“Las sustancias que están electroquímicamente activadas son el complejo de rutenio y la tripropilamina, las cuales forman parte de las reacciones que llevan a la emisión de luz. Ambas sustancias están estables mientras no se aplica un voltaje. La reacción ECL, del rutenio tris (bipyridyl) $2+$ y la TPA se producen en la superficie del electrodo de platino” (34).

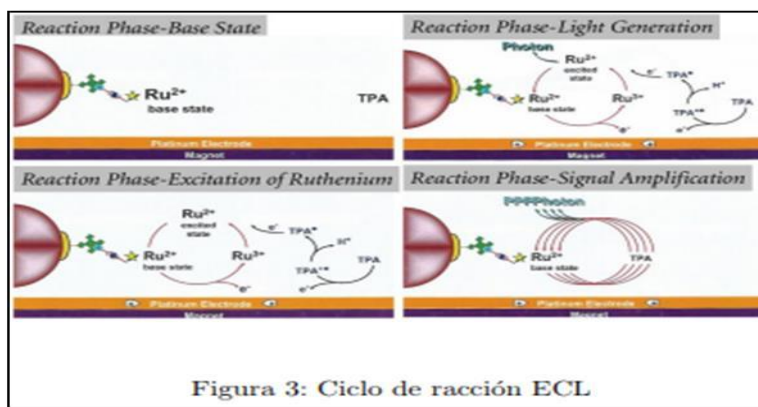
Ilustración N°7: Reacción ECL en la superficie del electrodo.



Fuente: Reyes González S. cámara de Fluorescencia, principios y oferta comparada. 2009 (citado 26 de may 2009); 8 (1): 4. Disponible en: http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario%202009/Monografias%20seminario%202009/REYES-monografia_camaras_ECL2009.p (34).

Reyes (34) informa cuando se aplica tensión en el electrodo de trabajo respecto al líquido que se desea medir se genera un campo eléctrico, que activa la reacción entre las sustancias. La TPA es oxidada en la reacción química perdiendo un electrón, en la que se convierte en un catión radical intermedio liberando un protón para formar un radical TPA, a la vez el complejo de rutenio libera un electrón en la superficie del electrodo pasando a ser catión ($Ru(bpy)_3^{3+}$) dicho catión va a reaccionar con radical TPA generando reacción quimioluminiscente se reduce nuevamente a $Ru(bpy)_2^{3+}$ pasando a su estado no excitado emitiendo un fotón a 620 nm. El TPA es consumido durante la reacción y no se regenera por lo cual debe ser inyectado nuevamente en la reacción. La reacción quimioluminiscente es controlada por difusión de TPA y cantidad de rutenio presente en la sustancia, para que el TPA se vaya agotando y así la luz emitida baja su intensidad.

Ilustración N°8. Ciclo de Reacción ECL



Fuente: Reyes González S. cámara de Fluorescencia, principios y oferta comparada. 2009 (citado 26 de may 2009); 8 (1): 4. Disponible en: http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario%202009/Monografias%20seminario%202009/REYES-monografia_camaras_ECL2009.p (34).

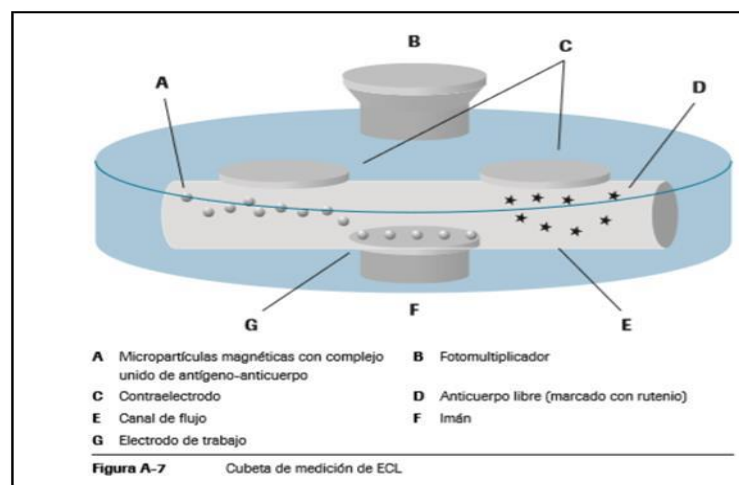
2.2.12.3. Componentes de la Electroquimioluminiscencia (ECLIA)

2.2.12.3.1 Cubetas de medición

La cubeta posee un sistema de detección de la ECLIA, fabricada como una cubeta de paso de flujo.

Aquí se realiza tres pasos:

Ilustración N°9. Cubeta de Medición ECL



Fuente: Reyes González S. cámara de Fluorescencia, principios y oferta comparada. 2009 (citado 26 de may 2009); 8 (1): 4. Disponible en: http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario%202009/Monografias%20seminario%202009/REYES-monografia_camaras_ECL2009.p (34).

2.2.12.3.2 Separación unida/libre

Con la ayuda de un imán, las micropartículas de estreptavidina recubiertas con complejos de Antígeno – anticuerpo se depositan uniformemente en el electrodo de trabajo.

Se utiliza un búfer de sistema (pro Cell) para lavar las partículas en el electrodo de trabajo y para expulsar el exceso de reactivo y materiales de muestra de la cubeta de medición (34).

2.2.12.3.3 Reacción ECL

El imán se retira y se aplica a continuación voltaje al electrodo, que están depositadas las micropartículas recubiertas de complejo de Ag-Ac para iniciar la reacción ECL; la emisión de la luz se mide con un fotomultiplicador. El sistema utiliza a continuación las señales correspondientes para el cálculo de los resultados.

2.2.12.3.4 Liberación de micropartículas y limpieza de la cubeta

Cuando se ha completado la medición, las micropartículas paramagnéticas se lavan y separan de la superficie del electrodo con una solución especial (clean cell). La superficie de la cubeta de medición se regenera variando el potencial en el electrodo. A continuación, la cubeta queda lista para otra medición. La superficie de la cubeta de medición se regenera variando el potencial en el electrodo.

2.2.12.4. Ventajas de la Tecnología ECL

- Una marca no isotópica extremadamente estable permite la comodidad de poder utilizar reactivo líquido.

- La mejorada sensibilidad junto con el breve período de incubación se traduce en ensayos de elevada calidad y en una obtención rápida de resultados.
- El gran intervalo de medición de cinco pedidos de magnitud minimiza las diluciones y repeticiones, en el que reduce el tiempo de gestión y el gasto en reactivos.
- Es una técnica aplicable para la detección de todos los analitos, lo que ofrece una plataforma sólida para la ampliación de posibilidades.

2.2.13. Pruebas Cualitativas para detectar la presencia o ausencia del Virus VHC por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Salvatierra et al. (10) en un análisis del virus de hepatitis C en pacientes hemodializados menciona que la confirmación de la replicación viral en pacientes con anticuerpos anti-VHC positivos por EIA, se realiza por ARN viral en suero o plasma, por medio de la retro transcripción de la región 5 no codificante del virus (5'NC), seguida de una amplificación génica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-PCR anidada). Además, la detección de genoma viral se aplica también para definir infección por VHC en hepatitis agudas durante el período ventana cuando aún no son positivos los anticuerpos anti-VHC.

“Las pruebas cualitativas de amplificación del ácido nucleico del VHC se consideran las pruebas más sensibles para el diagnóstico de la infección por el VHC. Estas pruebas pueden detectar el ARN del VHC en la sangre de un paciente de 1 a 3 semanas después de la infección inicial” (35).

2.2.13.1 PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

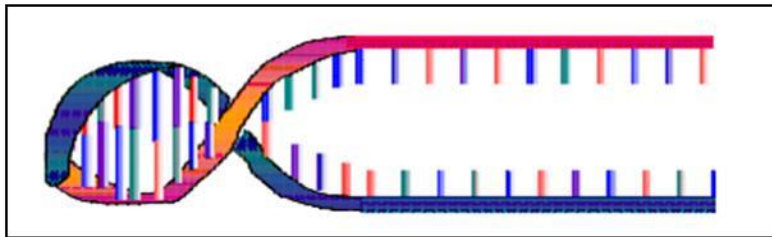
Fue descubierta en el año 1983 por Kary Mullis y la compañía llamada Cetus Corporation; realizaron por primera vez esta técnica basada en el proceso de replicación explicado en el año 1971 por Gobind Khorana. Mullis y compañía utilizaron dos cebadores o iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, al cual le añadieron ADN polimerasa 1 de la *E. coli* y nucleótidos trifosfatados. Mediante cambios de temperaturas cíclicas, esto dio como resultado el proceso de la replicación exponencial del fragmento de ADN que fue flaqueado por los cebadores.

La PCR se fundamenta en la replicación celular del ADN y la acción de las diferentes enzimas, dentro de las que destacan el ADN polimerasas las cuales, replican las hebras del mismo al incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN. Al lograr esta reacción, se multiplicará el número de copias de un solo fragmento específico de ADN, lo que se conoce como amplificaciones. Hoy en día es considerada por expertos y científicos como la tecnología científica más importante que ha existido en los últimos 100 años y una técnica común e indispensable usada en laboratorios para investigaciones médicas y biológicas para diversas aplicaciones. Mediante esta técnica el material genético único y propio de cada especie es posible de rastrear y ser identificado con precisión, que indica como mínimo de que especie de microorganismo se trata e inclusive en algunas ocasiones identificar el miembro de esa especie (36).

2.2.13.2. Fases o etapas de la PCR

- **Desnaturalización:** Temperatura muy elevada, 94-96 °C, lo cual provoca que los puentes de hidrogeno del ADN se separen y dejen sus bases nitrogenadas visibles, con la facilidad de acceder a ellas. Como consecuencia, cada cadena separada queda como molde para la síntesis de una nueva cadena de ADN complementario (36).

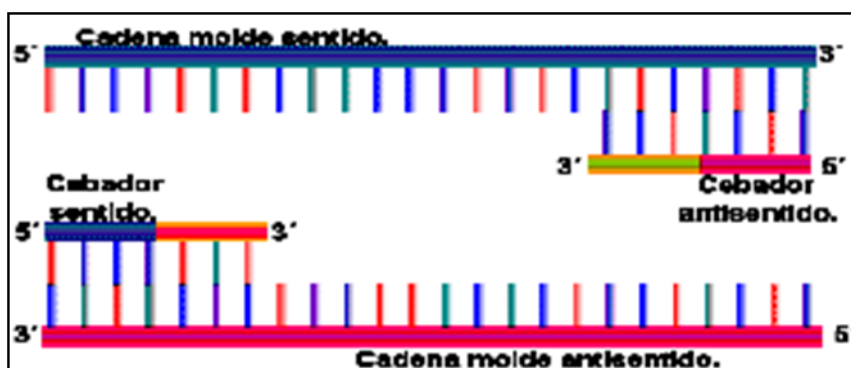
Ilustración N°10. Fase de Desnaturalización



Fuente: Rodriguez S, Barrera S. Reacción en cadena a la polimerasa a dos décadas de su invención (las etapas de un ciclo de reacción). (publicado set 2004) (37).

- **Deshibridación o Apareamiento:** En esta fase la temperatura baja aproximadamente a 45-55°C en la que permite que los cebadores o primers puedan unirse (alineamiento de cebadores o iniciadores) de forma específica a su secuencia complementaria. Especificidad de la reacción (36).

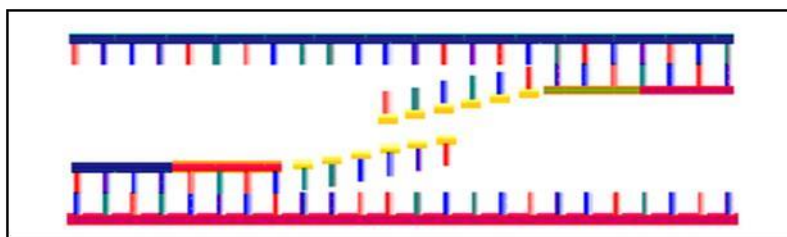
Ilustración N°11: Fase de Deshibridación o Apareamiento



Fuente: Rodriguez S, Barrera S.Reaccion en cadena a la polimerasa a dos decadas de su invencion (las etapas de un ciclo de reaccion). (publicado set 2004) (36).

- **Extensión o Elongación:** La temperatura media (alrededor de 72°C) en la cual el cebador se une a su cadena complementaria de ADN, la enzima polimerasa añadirá nuevos nucleótidos complementarios a la cadena molde y así creará una molécula de ADN de doble cadena o replicación.

Ilustración N°12. Fase de Extensión o Elongación



Fuente: Rodriguez I, Barrera S.Reaccion en cadena a la polimerasa a dos decadas de su invencion (las etapas de un ciclo de reaccion). (publicado set 2004) (37).

Todas las fases descritas se repiten satisfactoriamente, en las que se amplifica en cada ciclo la región de interés de ambas cadenas complementarias. Así cada nueva copia servirá de molde en los ciclos subsiguientes, por lo cual estas copias generadas aumentan de forma exponencial creándose millones de copias de un solo fragmento seleccionado Taq (bacteria termófila), vive entre 50 y 80 °C en

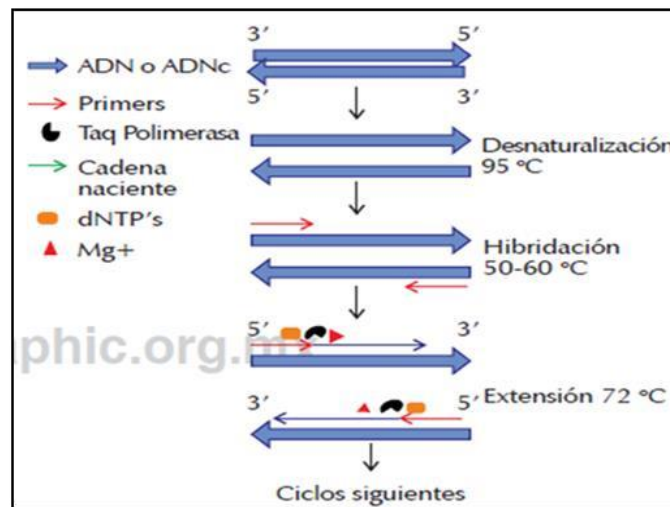
manantiales de agua caliente y posee alta resistencia utiliza una enzima especial para replicar su ADN (ADN polimerasa Taq) y es esta la que se vá a utilizar con frecuencia en los diferentes métodos de PCR (36).

2.2.13.3. Elementos para la realización de PCR convencional

- Inicia con la toma de muestra de ADN a partir del cual queremos obtener una copia del fragmento.
- Los dos cebadores o iniciadores de la reacción (cadenas de aproximadamente 15 a 30 desoxirribonucleotidos, los cuales son complementarios a una cadena distinta del ADN y colocan un límite al fragmento que se desea ampliar): los desoxinucleótidos (dNTPs conformado por los cuatro dexocirribonucleotidos: dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Una Enzima ADN polimerasa termoestable.
- Un cofactor de la polimerasa (magnesio).

La reacción en si consta de varios ciclos (entre 25 y 40) presentan temperaturas características e importantes en su realización. La temperatura indicada puede variar según la longitud de los fragmentos que se deseen estudiar o amplificar y dependiendo de la secuencia de los cebadores (cada blanco molecular tiene diferentes programas para el ciclaje de temperatura). El cebador y su estructura son importantes para la técnica de PCR pueda realizarse satisfactoriamente (36).

Ilustración N°13. Ciclos de la PCR Convencional

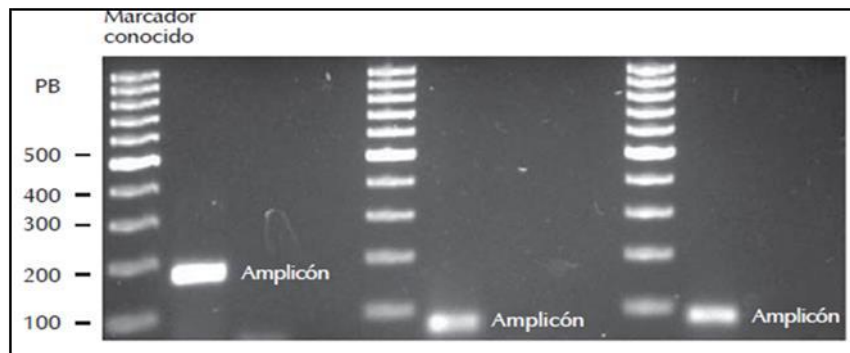


Fuente: Lamay de Dios L, et al. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, volumen 2 N°2, México 2013 (38).

Luego de realizar la PCR, el producto obtenido de amplificación (amplicón), servirá posteriormente para la técnica de análisis.

Luego serán visualizadas a través de una electroforesis (separación de grandes moléculas a través de una matriz sólida que va a funcionar como filtro y las separa en un campo eléctrico, según su tamaño y carga eléctrica) en geles de agarosa. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa brindada por el grupo fosfato, por lo que al realizar la electroforesis van a migrar hacia el polo positivo (36).

Ilustración N°14. Gel de Agarosa



Fuente: Lamay de Dios L, et al. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, volumen 2 N°2, México 2013 (38).

Hoy en día solo es necesario colocar el material necesario en microtubos y la reacción se realizará en equipos llamados termocicladores, los cuales automáticamente programan los ciclos de temperatura y así se produce la amplificación.

2.2.13.4. PCR en tiempo real

Lamay (38) menciona en su publicación de “fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa y de la PCR en tiempo real”. Que la PCR en tiempo real fue reportada por primera vez en un artículo de Higuchi y colaboradores (1993). Utilizaron una cámara de video para grabar en tiempo real la incorporación de BROMURO DE ETIDIO al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo la luz UV. En el que concluye el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de los ácidos nucleídos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.

La técnica tiene como principio principal a la PCR de punto final, la forma de detectar y analizar los productos de amplificación es diferente, la PCR en tiempo real se refiere a la detección de los productos amplificados, que sucede en cada ciclo de la reacción y es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final (no detecta el tiempo real ni cuantifica la secuencia en blanco) en la PCR de tiempo real el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. Si usamos ADN genómico entonces usamos PCR cuantitativa. La PCR-RT, se logra cuando se obtiene al ADNc y luego realizando PCR. La PCR-RT en tiempo real garantiza sensibilidad, especificidad y eficiencia aun teniendo una pequeña cantidad de ADN. PCR-RT cuantifica pequeños cambios de la expresión genética por niveles de ARNm de células. El ARNm para su detección utiliza bajas concentraciones mientras que PCR punto final trabaja a más concentración (38).

PCR-RT y PCR en tiempo real están utilizando los mismos componentes químicos: dNTP's, Mg⁺, Buffer, reportero de fluorescencia para detección de productos amplificados. Comercialmente conocida como master mix, utiliza agua libre de nucleasas, los primers vienen preparados para generar amplicones de 100 150 pb. Se recomienda no superar el tamaño de los amplicones disminuiría la eficiencia de la reacción; una alternativa para evitar error sería comprar primers de las casas comerciales que estén validadas y garantizadas (38).

2.2.13.5. Químicas utilizadas en PCR tiempo real

La fluorescencia mide la cinética del PCR y lo clasifica:

2.2.13.5.1 Agentes Intercalantes

Lamay (38) escribe que los agentes Intercalantes usan moléculas fluorescentes para el aumento de emisión, al unirse el ADN doble cadena (SYBR Green y Bromuro de etidio). La desventaja es que es inespecífico, no se puede usar para reacciones múltiples ya que se unen a cualquier producto resultante de una reacción que se desea medir.

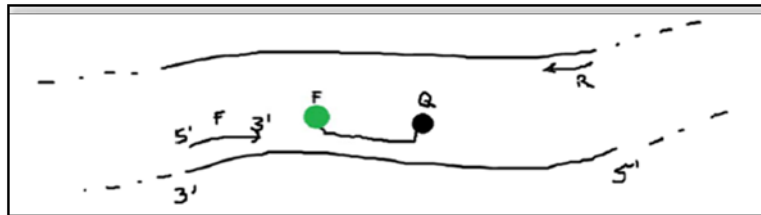
Para cuantificar se necesita realizar curvas de desnaturalización para evidenciar presencia de dímeros de cebadores, en la cuantificación no se podrá eliminar la señal del ruido en los procesos. Para mejorar la sensibilidad del método se usa sonda de hidrolisis como Taqman y sondas de hibridación como FRET.

2.2.13.5.2 Sonda de hidrolisis TAQMAN

Greif (39) expresa que las sondas están diseñadas para aumentar la especificidad en la secuencia de un producto amplificando uno de sus extremos 5' y al fluorocromo reportero, el cual se hibridan de manera específica, mientras la sonda permanece intacta la emisión es apagada por una segunda molécula unida al extremo opuesto de la sonda 3', esta molécula absorbe la emisión del fluorocromo reportero pero no la emite, entonces cuando la sonda está intacta no hay emisión del fluorocromo. "Se muestra la sonda intacta, antes de producirse la

amplificación, con el fluorocromo unido al extremo 5'(F) y el quencher en el 3'(Q). Se muestra el sitio de unión de los cebadores forward(F) y reverso(R)" (39).

Ilustración N°15. Estrategia de Sondas Taqman

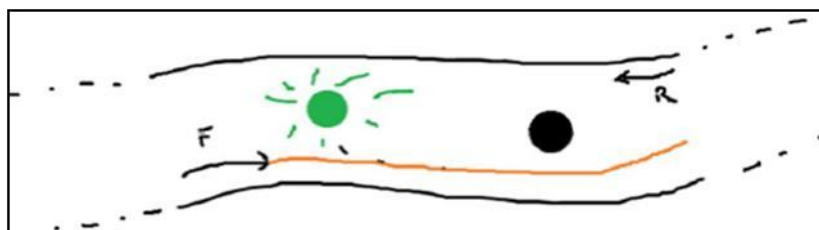


Fuente: Greif G, Reacción en cadena de la polimerasa, unidad de Biología Molecular Institut Pasteur Montevideo. Institut Pasteur Montevideo [Internet].2004 [citado 2004]; 1-19.Disponible en http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf (39).

“Cuando se produce la amplificación, comenzando desde uno de los cebadores, la actividad 5' 3' exonucleasa de la enzima ADN polimerasa degrada la sonda, separando físicamente el fluorocromo y el quencher, permitiendo la emisión de fluorescencia. A mayor cantidad de producto, mayor sonda degradada y esto da mayor emisión de luz” (39).

Ilustración N°16. Estrategia de Sondas Taqman

”Se muestra la sonda degradada, luego de la amplificación la enzima a partir del cebador forward (F) y el fluorocromo separada del quencher. Hebra de ADN recién sintetizada”³⁹.



Fuente: Greif G, Reacción en cadena de la polimerasa, unidad de Biología Molecular Institut Pasteur Montevideo. Institut Pasteur Montevideo [Internet].2004 [citado 2004]; 1-19.Disponible en http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf (39).

2.2.13.5.3 Sondas de hibridación FRET

Sondas FRET son hibridadas de manera específica dentro del producto de amplificación; en la primera sonda es adicionado un fluorocromo en extremo 3' y la segunda sonda que debe hibridar cerca de la interior se agrega un fluorocromo en extremo 5' tales que la longitud de onda de emisión del fluorocromo de la primera sonda coincidan con la longitud de onda de excitación del segundo fluorocromo. Existe un intercambio de energía cuando hay aproximación de las sondas, se excita el primer fluorocromo y se evidencia la segunda (38).

2.2.14 Reacción en cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

Por Lamay et al. (38) PCR-RT utiliza el RNA como molde, detecta, amplifica el RNA, se transcribe inversamente a DNA complementario (cDNA), con el uso de la transcriptasa inversa. La PCR-RT realiza en primer lugar la síntesis de un híbrido DNA/RNA, la transcriptasa inversa tiene función Rnasa H, que ayuda a la degradación del RNA híbrido, la cadena restante de la molécula DNA simple sirve para la formación del cDNA. Para la actividad DNA polimerasa dependiente del DNA en la transcriptasa inversa la eficiencia de la reacción de la primera cadena podría afectar el proceso de amplificación. A partir de este procedimiento se usa PCR convencional para amplificar cDNA, la opción de revertir RNA en cDNA por PCR-RT. El RNA es monocatenario, inestable y es dificultoso para su proceso, solo sirviendo como primera opción en qPCR, para la cuantificación de la cantidad de RNA que ha sido transcrito en un analito.

2.2.15 Utilidad Diagnóstica de las pruebas en laboratorio

2.2.15.1. Sensibilidad (S)

Pita et al. (40) expresan en su publicación sobre las pruebas diagnósticas a la sensibilidad como probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba diagnóstica un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad. Cuando los datos obtenidos a partir de una muestra de pacientes se clasifican en una tabla de 2x2, es fácil estimar a partir de ella la sensibilidad simplemente como la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

2.2.15.2. Especificidad (E)

“La probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. También definimos la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos” (40). La especificidad se estimaría de la siguiente manera:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

2.2.15.3. Valor predictivo positivo (VPP)

“Es la probabilidad de padecer la enfermedad dado que antes se ha obtenido un resultado positivo en el test o prueba diagnóstica. El VPP puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos de la siguiente manera” (40).

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

2.2.15.4. Valor predictivo negativo (VPN)

“El valor predictivo negativo se define como la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba diagnóstica esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba” (40).

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}}$$

2.2.15.5. Índice Kappa de Cohen (K)

López et al. (41) hace referencia que el índice Kappa es una medida de concordancia la cual tiene por finalidad evaluar la variabilidad inter observador. El índice compara los resultados reportados por dos o más observadores (métodos)

y que calcula como parte de su construcción la probabilidad de que estos hayan concordado solo por el azar para poder eliminarla. Como idea general podemos decir que el índice es:

$$\text{Kappa} = \frac{(\% \text{ de concordancia observada}) - (\% \text{ de concordancia esperada debido al azar})}{(100\% - (\% \text{ de concordancia esperada debido al azar}))}$$

“El Índice kappa utiliza en su fórmula el cálculo de una concordancia absoluta y una concordancia relativa, en el que incorpora en su fórmula una corrección que excluye la concordancia debida exclusivamente al azar, corrección que como veremos está relacionada con las distribuciones marginales” (41).

El índice Kappa se define como:

$$\kappa = \frac{\sum \pi_{ii} - \sum \pi_{i.} \sum \pi_{.i}}{1 - \sum \pi_{i.} \pi_{.i}}$$

“En consecuencia, el valor del índice Kappa κ simplemente es la razón entre el exceso de concordancia observado más allá del atribuible al azar ($\sum \pi_{ii} - \sum \pi_{i.} \pi_{.i}$) y el máximo exceso posible ($1 - \sum \pi_{i.} \pi_{.i}$)” (41).

“La máxima concordancia posible corresponde a $\kappa = 1$. El valor $\kappa = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Si la concordancia es mayor que la esperada simplemente a causa del azar, $\kappa > 0$, mientras que, si es menor, $\kappa < 0$. El mínimo valor de κ depende de las distribuciones marginales” (41).

2.2.16. Inserto del test Elecsys. Anti-HCV II. MODULAR ANALYTICS E170

La prueba Anti-HCV II es un test diagnóstico in vitro destinado a la detección cualitativa de los anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (HCV) en suero y plasma humanos Elecsys® Anti-HCV II se utiliza para demostrar la presencia de anticuerpos contra el VHC durante la infección aguda y crónica, y después de una infección resuelta. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (electrochemiluminescence immunoassay) “ECLIA” está concebido para su empleo en los analizadores automáticos Elecsys y cobas e. (42).

2.2.17. Diálisis

Rodríguez et al. (43) señalan la diálisis como un procedimiento terapéutico por medio del cual se eliminan sustancias tóxicas presentes en la sangre. Como ya se ha referido, el tratamiento de diálisis consiste en dos tipos de procedimientos: La hemodiálisis y la diálisis peritoneal. El tratamiento de hemodiálisis consiste en dializar la sangre a través de una máquina que hace circular la sangre desde una arteria del paciente hacia el filtro de diálisis, donde las sustancias tóxicas de la sangre se difunden en el líquido de diálisis; la sangre libre de toxinas retorna al organismo a través de una vena canulada.

2.3. Terminología Básica

- **Anti-VHC.**

“Es la técnica de cribado y estudia la presencia de anticuerpos frente a este virus en el suero del paciente”²⁹.

- **PCR en tiempo real VHC**

“Detecta la presencia de RNA viral en el suero del paciente y tiene utilidad como técnica confirmatoria y como marcador evolutivo de la situación de cada paciente”³⁷.

2.4. Hipótesis

El método de ensayo electroquimioluminiscencia presenta utilidad diagnóstica con alta sensibilidad, especificidad y concordancia frente al método PCR en tiempo real para el diagnóstico de Hepatitis C en un centro de diálisis de Lima, 2018.

2.5. Variables

Cuadro N°2. Cuadro de Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Tipo de variable	Indicador	Escala de medición	Valores
Utilidad diagnóstica del método de ensayo electroquimioluminiscencia para el diagnóstico de Hepatitis C	Proceso en el que se generan especies muy reactivas a partir de precursores estables en la superficie de un electrodo; estas especies sumamente reactivas reaccionan entre sí, y así producen luz	Electroquimioluminiscencia, para el diagnóstico de Hepatitis C	Cualitativo	Resultado de estudio por Método ECLIA.	Nominal	a) válida b) No válida
PCR en tiempo real, para el diagnóstico de Hepatitis C	Incorporación de BROMURO DE ETIDIO al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo la luz UV, cuyo objetivo es sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de los ácidos nucleídos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción	PCR en tiempo real, para el diagnóstico de Hepatitis C	Cualitativo	Resultado de estudio por Método PCR en tiempo real	Nominal	a) Positivo b) Negativo

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y nivel de investigación

Estudio de tipo observacional, transversal y retrospectivo.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Conformada por 123 resultados de muestras de suero de pacientes hemodializados que acuden regularmente a un centro de diálisis de Lima, periodo de estudio de enero-diciembre del año 2018.

La investigación se desarrolló en un centro de diálisis de Lima, el cual cuenta con un servicio de Laboratorio clínico, equipado y con personal calificado.

3.2.2. Muestreo: Censal

3.2.3. Criterios de Selección ECLIA

a) Criterios de inclusión:

- Resultados de pruebas inmunoserológicas para VHC por método ECLIA y PCR en tiempo real.

b) Criterios de Exclusión:

- Resultados de pruebas inmunoserológicas dudosas o indeterminados.
- Resultado de pruebas inmunoserológicas de neonatos y menores de 18 años.

3.3. Técnicas e instrumento de recolección de datos

3.3.1. Técnica

Revisión de registros de laboratorio, se incluyeron los resultados de las muestras de pacientes con resultados de las pruebas de Electroquimiolumiscencia (ECLIA) y método PCR en tiempo real para diagnóstico de VHC.

3.3.2. Instrumento

Ficha de recolección de datos (Ver anexo 01)

3.3.3. Recolección de datos

La información se obtuvo de los registros de laboratorio, la cual se transfirió a la ficha de recolección de datos elaborada para el estudio. Se elaboró una base de datos en Excel para su posterior análisis.

3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico.

En el estudio se hizo uso del análisis estadístico en tablas 2x2 para evaluar la distribución de frecuencias por cada método de procesamiento de laboratorio.

Se realizó análisis estadístico para evaluar el desempeño del método ECLIA en base a estadísticos de sensibilidad, especificidad diagnóstica, valores predictivos positivo y negativo, índice Kappa de Cohen y concordancia para la precisión del método (Electroquimiolumiscencia frente a PCR en tiempo real para VHC).

3.5. Aspectos éticos

La investigación por su tipo y diseño no vulneró aspectos bioéticos de la investigación científica no requirió consentimiento informado. Sin embargo, sí requirió la aprobación de las autoridades del Centro de diálisis. Para ello, se solicitó permiso al jefe del servicio de laboratorio del centro para acceder a la base de datos de acuerdo a los objetivos del proyecto.

Por otro lado, estas acciones no ocasionaron riesgos para el personal o usuarios del centro de Diálisis. Los investigadores mantuvieron en confidencialidad la identidad de los usuarios.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

El estudio se realizó con 123 resultados de muestras de suero de pacientes que acudieron al centro de Diálisis de Lima, las muestras fueron evaluadas por las técnicas ECLIA y PCR-RT. Para obtener los resultados cualitativos de Reactivo y No Reactivo por el método ECLIA se utilizó el punto de corte 7.

Tabla N°1. Tabla de contingencia resultados por ECLIA frente a PCR-RT

CARGA VIRAL PCR-RT			
RESULTADO ECLIA	DETECTABLE	NO DETECTABLE	TOTAL
REACTIVO	19	36	55
NO REACTIVO	2	66	68
TOTAL	21	102	123

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N°1 se muestra la distribución de resultados de las muestras de suero por cada metodología, 45% (55/123) de sueros Reactivos por ECLIA y 17% (21/123) de sueros detectables por PCR-RT.

Sensibilidad y Especificidad

Para determinar el grado de validez diagnóstica del método ECLIA se hizo uso de los valores de sensibilidad y especificidad (Tabla N°2).

Se obtuvo una sensibilidad del 90%, lo que significa que el método ECLIA tiene una alta probabilidad (0.90) de identificar como Reactivo a las muestras de suero que son detectables por PCR-RT.

Se obtuvo una especificidad del 65%, lo que significa que el método ECLIA tiene una probabilidad media (0.65) de identificar como No Reactivo a las muestras de suero que son No detectables por PCR-RT.

Tabla N°2. Resultados de sensibilidad y especificidad de ECLIA frente a PCR-RT para muestras de estudio

Parámetro	ECLIA respecto a PCR-RT
Sensibilidad	90%
Especificidad	65%

Fuente: Elaboración propia

Valores predictivos positivo y Negativo (VPP / VPN)

En la Tabla N°3 se muestran el valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para determinar el grado de seguridad diagnóstica del método ECLIA.

Se obtuvo un VPP o Probabilidad (enfermo/+) del 93%. La probabilidad que la muestra sea detectable por PCRT-RT, dado que es identificada como Reactivo por ECLIA, es del 0.93 (alta probabilidad).

El VPN o Probabilidad (sano/-) resulto 57%. La probabilidad que la muestra sea No detectable por PCRT-RT, dado que es identificada como No Reactivo por ECLIA, es del 0.57 (probabilidad media).

Tabla N°3. Resultados de VPP y VPN de la enfermedad dado resultado ECLIA Probabilidad condición

Parámetro	Probabilidad condición enfermedad
VPP	93%
VPN	57%

Fuente: Elaboración propia

Índice de concordancia

El índice Kappa de Cohen fue 0.3359 (Tabla N°4), grado bajo de concordancia entre los 2 métodos para el diagnóstico del virus de la hepatitis C.

Tabla N°4. Indicadores de concordancia entre ECLIA y PCR-RT para diagnóstico del VHC muestras de estudio de pacientes con hemodiálisis

Indicadores	
Po	0,691056911 proporción de acuerdos observados entre métodos
Pe	0,534800714 proporción de acuerdos esperados o al azar entre métodos
K	0,335890878 Índice de Cohen

Fuente: Elaboración propia

El nivel de concordancia resultado de las coincidencias en el diagnóstico positivo y negativo entre ambos métodos resulta 69.1%, lo que significa que representa la tasa de aciertos en positivos y negativos.

4.2. Discusión

El estudio realizó la evaluación del valor diagnóstico a través de los indicadores de sensibilidad y especificidad, así como valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice Kappa de Cohen para el método ECLIA en el diagnóstico de VHC en pacientes dializados en un centro de diálisis de un hospital de Lima.

El estudio presenta una sensibilidad del 90%, una especificidad del 65%, VPP 93%, VPN del 57% e Índice de Kappa de 33.6% para el método ECLIA frente al PCR-RT, indicadores menores a los obtenidos en el estudio de Rivero R. et al. ⁽¹⁶⁾ quien obtuvo una sensibilidad del 96.99%, una especificidad del 100%, VPP 100%, VPN 97.13% y Kappa de 97.01% para UMELISA HCV 3er gen frente al PCR COBAS AmpliScreen HCV Test v2, probablemente por las características de población en estudio, pacientes tanto hematológicos como no hematológicos (hemodializados). En el presente estudio se enroló pacientes con el diagnóstico de enfermedad renal crónica terminal o grado V de etiología múltiple sometidos a programas de diálisis interdiario, quienes podrían presentar anticuerpos inespecíficos en el suero, los cuales podrían interferir en la reacción antígeno-anticuerpo del método ECLIA.

Si comparamos los indicadores del estudio frente al de Kesli R et al. (14) con sensibilidad 96.3%, especificidad 26.9%, VPP 80.2% y VPN 70%, se aprecia mayor sensibilidad, menor especificidad y una alta tasa de falsos positivos en el estudio, esto se debe a que los ensayos para anti VHC tiene entre sus desventajas la alta tasa de falsos positivos, incapacidad de distinguir entre lo agudo y activo de la enfermedad y una posibilidad de falsa negatividad con muestra de pacientes inmunocomprometidos, tal como lo describe los fabricantes de estos reactivos en las declaraciones publicadas (insertos) (42).

En el estudio (123 muestras), 36 resultaron falsos positivos por el método ECLIA (29%), 2 falsos negativos equivalente a 1.6%, comparado al estudio realizado por Dogan M et al. (9) quienes encuentran que al usar la nueva metodología (CLIA) se logra disminuir la tasa de falsos positivos de 75.1% a 35.5%, probablemente a por el mayor número de pacientes.

El estudio de Mota F. et al. (15) determinó que al comparar las metodologías CLIA y ECLIA, una concordancia de 91.9% entre ambas frente al método de referencia RIBA; se reporta un mayor valor diagnóstico en ECLIA frente al PCR-RT (69.1%); probablemente, el método ECLIA y RIBA permiten la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C y el método de PCR-RT permite la detección directa de componentes del virus en cuestión.

El índice Kappa de Cohen o Indicador de concordancia de ECLIA frente a PCR-RT (Gold Estándar) para diagnóstico de VHC en muestras de pacientes con hemodiálisis fue de 0.34, grado de acuerdo débil. No obstante, el grado de

coincidencias resultó en el orden del 69.1%, se refleja un alto grado de coincidencias a la hora del diagnóstico entre la prueba ECLIA y la prueba PCR-RT. El índice kappa refleja una fuerza de concordancia débil (ECLIA frente al PCR-RT) para detectar virus de hepatitis C en pacientes hemodializados.

La investigación determinó que la técnica ECLIA es una prueba sensible, confiable, pero con un grado de concordancia débil en comparación con la técnica PCR-RT para detección de VHC en pacientes diagnosticados con enfermedad renal crónica terminal en grado V, pacientes sometidos a sesiones interdiarias de diálisis.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El método ECLIA presenta una sensibilidad alta (90%) y especificidad media (65%) para el diagnóstico de VHC en pacientes dializados.
2. El método ECLIA presenta valor predictivo positivo (93%) con alto grado de seguridad diagnóstica para confirmar a un paciente enfermo, mientras que el valor predictivo negativo (57%) indicaría un grado medio de seguridad diagnóstica para confirmar a un paciente sano.
3. El grado de coincidencias fue 69.1%, grado moderado en el nivel de coincidencias a la hora del diagnóstico entre la prueba ECLIA y la prueba PCR-RT.
4. La investigación determinó que método de ensayo electroquimioluminiscencia ECLIA presenta utilidad diagnóstica por ser una prueba altamente sensible, a pesar de tener una especificidad media, ser una prueba confiable por presentar un alto grado de seguridad diagnóstica, pero una prueba con un grado de concordancia débil en comparación con la técnica PCR-RT para detección de VHC en pacientes diagnosticados con enfermedad renal crónica terminal en grado V, pacientes sometidos a sesiones inter diarias de diálisis.

5.2. Recomendaciones

- ✓ Realizar el estudio con un mayor número de pacientes (muestras).

- ✓ Evaluar la posibilidad de realizar un estudio multicentrico, mismo target de pacientes con hemodiálisis, para confirmar los hallazgos de la investigación.

- ✓ Ampliar las variables de analisis para un mejor entendimineto de la utilidad diagnotica.

- ✓ Evaluar la posibilidad de realizar un estudio con muestras de suero residuales en paciente con hemodiálisis, para confirmar los hallazgos de la investigación.

✓ Referencias

1. Norma Técnica Peruana ISO 15189, Lista de verificación NTP ISO 15189.2014.
2. Norma Técnica Peruana ISO 15189, requisitos de gestión 4; versión 201, pp 9.
3. Norma Técnica ISO 9001. Conceptos Fundamentales y principios de Gestión de la calidad, enfoque a procesos. 2015, pp 6.
4. Norma Técnica de salud para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la Hepatitis Viral C en Perú. El Peruano, 2018; pp 50.
5. Messina J, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke G, Pybus O, et al. Global Distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hep [Internet].2015[citado Ene 2015]; 61(1):77-87.Disponible en: <https://doi.org/10.1002/hep.27259>
6. Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus. Diagnostics and treatment. Worl J. Hepatol 2015; 7(10): 1377- 1389.
7. Ministerio de Salud. (MINSA). Resolución Ministerial N°658.2019/MINSA.2019.Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/343478/Resoluci%C3%B3n_Ministerial_N_658-2019-MINSA.PDF
8. Moorman A, Drobenuic J, Kamili S. Prevalence of false-positive hepatitis C antibody results, National Health and Nutrition Examination Study (NHANES) 2007–2012. JC Virology [Internet].2017[April 2017]; 89():1-4.Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138665321730022>

7

9. Doğan M, Kalem F, Yüksekaya I, Türk H, Ertuğrul O. Evaluación comparativa de las pruebas automatizadas de quimioluminiscencia y el ensayo RIBA utilizado en el diagnóstico de VHC. Artículo de investigación. *Investigación biomédica* 2016; 27(4).
10. Salvatierra K, Flórez H. Análisis del virus de la hepatitis C en pacientes en hemodiálisis. *Asociación de Infectología colombiana*. 2016; 20 (3): 130-137.
11. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Rodríguez Ch, Soulier A, Poveda J, Pawlotsky J. The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, Version 2.0, Real-Time PCR Assay Accurately Quantifies Hepatitis C Virus Genotype 4 RNA. *JCM*[Internet].2013[citado Mar 2013]; 51 (4): 1078-82. Disponible en <https://jcm.asm.org/content/jcm/51/4/1078.full.pdf>
12. Emerson F, Lai K. Interferencias de anticuerpos endógenos en inmunoensayos, *Med. de Lab.* [Internet].2013 [Citado febrero 2013]; 44(1): 69–73. Disponible en: <https://doi.org/10.1309/LMMURCFQHKS5YEC>
13. Cabezas-Fernández M, Cabeza-Barrera M. Introducción de un sistema automatizado para el diagnóstico y cuantificación de los virus de la hepatitis B y la hepatitis C. *Abra Virol J.* 2012; 6: 122-34.
14. Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu M, Uyar Y. Comparison of a Newly Developed Automated and Quantitative Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen Test with the HCV RNA Assay for Clinical Usefulness in Confirming Anti-HCV Results. *J Clin Microbiol.*

- [Internet].2011[citado2011]; 49(12): 4089–4093.Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940466>
- 15.Mota F, Assis L, Sant'Anna M. Comparación de dos pruebas automatizadas por quimioluminiscencia para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C Rev Pan-Amaz Saude.[internet].2010 [citado 20 Dic 2010];1(4).Disponible en http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000400003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- 16.Rivero R, Merlin J, Blanco M, Navea L, Lam R, Castillo D, et al. Eficacia diagnóstica de sistemas de inmunoensayos para el virus de la hepatitis C en muestras de pacientes multitransfundidosDiag effec of immun systems. Rev.Cubana Hema. Inmu. Hemo. [Internet].2009[citado 13 set 2009];25(3).Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_serial&pid=0864-0289&lng=es&nrm=iso
- 17.Angeleri P, Angeles M, Solari J, Vidiella G. Hepatitis virales en la Argentina.MINSA Ar[internet].2012[citado 2012]; 31-38.isponible en http://www.msal.gob.ar/images/stories/ryc/graficos/0000000865cnt-2014-09_estado-hepatitis-virales-argentina.pdf
- 18.Gómez I, Álvarez M. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. Rev. Biomed, 2003, 14:253-268.
- 19.Lauer G, Walker B, Hepatitis C virus Infection. N Eng J Med. 2001; 345:41-52.

20. Rodríguez R, Rodríguez A, Rodríguez S, Sotomayor I, Sánchez R. Incidencia del virus C de la hepatitis en pacientes en hemodiálisis. MEDISAN. 2013, 17.
21. Chou P. Hepatitis C Virus: Epidemiología, diagnóstico y manejo de pacientes, Laboratorio medicina. 2007; 38 (2): 86.
22. Micheloud D. El virus de la Hepatitis C. EMEI (Internet). 2008 (citado 10 dic. 2008); disponible en <https://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc/>
23. Restrepo JC. Medicina y el Laboratorio N°88, Editora Médica Colombiana S.A. 2011, capítulo Clínica y el Laboratorio, tema Hepatitis C. Página 412. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2011/myl119-10b.pdf>
24. Ortega R. Ortega R, Hepatitis C en Hemodiálisis, Revista Colombiana de Gastroenterología [internet]. 2005 [citado 2005]; 20(1): 32-42. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/3377/337729264005.pdf>
25. Florián JC. Revisión epidemiológica del virus de la hepatitis C en Perú. Revista Peruana de Salud Pública y Comunitaria. 2018; 1(1): 30- 4.
26. Alter M, Lyster R, Tokars J, Miller R, Arduino M. Recomendaciones para prevenir la transmisión de infecciones en pacientes con hemodiálisis crónica. CDC-MMWR 27 de abril de 2001/50 (RR05), 1- 43.
27. Koutsoudakis G, Forsy X, Pérez Sr. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. Gastro Enter. 2013 [13 Marzo de 2013] 36(4): 280 - 293. Disponible en <http://www.elsevier.es/gastroenterologia>
28. Brass V, Moradpour D, Blum H. Virología molecular del virus de la hepatitis C (VHC). Int J Med Sci [Internet]. 2006 [citado 1 Abr], 3 (2): 29-

34. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1415840/pdf/ijmsv03p0029.pdf>
29. Muñoz G. Diagnóstico serológico y virológico del Hepatitis C y B. Medwave año VII.2007, N°4.
30. Chun H, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. World J Hepatol 2015; 7(10): 1377-1389.
31. Dueñas S, Acosta N, Morales-J, García W. Estructura de la Poliproteína del VHC. Artículo de revisión Med Int Méx. 2018; 34(3): 435-442. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2018/mim183l.pdf> mayo-junio;34(3):435-442
32. Roche Diagnostics GmbH HD-68298 Mannheim. Germany: Roche Diagnostics, 2009. Disponible en www.roche.com http://website.aub.edu.lb/fm/cmop/downloads/cobas_e_411_EN.pdf
33. Yumi M. Eficacia de la técnica ECLIA en la detección Temprana de Toxoplasmosis en mujeres gestantes que acuden al hospital general Alfredo Novoa Montenegro, Guaranda periodo diciembre 2013 a mayo 2014. 2015 (citado Feb 2015); 85(1): 42-43. (26). Disponible en <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1322/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2015-0018.pdf>
34. Reyes S. Cámara de fotoluminiscencia, principios y oferta comparada [Internet].2009 [Citado 26 May 2009]. Disponible en http://www.nib.fmed.edu.uy/Seminario%202009/Monografias%20seminario%202009/REYES-monografia_camaras_ECL2009.pdf

35. Podzorski R. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. Arch Pat & Lab Med [Internet]. 2002 [citado Mar 2002]; 126(3): 285-290. Disponible en <https://www.archivesofpathology.org/doi/full/10.1043/0003-9985%282002%29126%3C0285%3AMTITDA%3E2.0.CO%3B2>
36. Gómez J. Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas. Métodos moleculares para el estudio del ADN y ARN, Perú: 2016 (1): 68-71.
37. Rodríguez I, Barrera H. La Reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANAL [Internet]. 2004 [citado Jul-Set 2004]; 7(3): 323-335. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/228091066_LA_REACCION_EN_CADENA_DE_LA_POLIMERASA_A_DOS_DECADAS_DE_SU_INVE_NCION
38. Lamay de Dios L, Ibarra C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, volumen 2 N°2, México 2013. Disponible en <http://www.medigraphic.com/rid>
39. Greif G. Reacción en cadena de la polimerasa, unidad de Biología Molecular. Institut Pasteur Montevideo [Internet]. 2004 [citado 2004]; 1-19. Disponible en http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf
40. Pita F, Pértegas D. Pruebas diagnósticas. Unidad de epidemiología Clínica y Bioestadística [Internet]. 2003 [citado 14 Jul 2003]; 1-7. Disponible en

https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp

41. López de Ullibarri I, Pita S. Medidas de concordancia: el índice Kappa. Unidad de epidemiología Clínica y Bioestadística [Internet]. 1999 [citado 24 Set 2001]; 6: 169-171. Disponible en <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa.asp#Tabla%204>
42. Roche ®. Anti-HCV II. Cobas Elecsys® [Internet]. 2014 [citado Dic 2014]; 4:1-5. Disponible en https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf14/P140021c.pdf
43. Rodríguez J, Morales Lorena, Peñaranda DI, Torrado Yoryely. Grupo De Investigación Rehabilit. Diálisis y Hemodiálisis. Disponible en <http://www.nefrologiaargentina.org.ar/numeros/2017/volumen152/articulo2.pdf>

