



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Utilidad Clínica del Ensayo ARCHITECT HCV Ag®
en el Diagnóstico de la Hepatitis C

Dña. María Rosario Vicente Romero

2015

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Genética y Microbiología



TESIS DOCTORAL

Utilidad clínica del ensayo ARCHITECT HCV Ag® en el diagnóstico de la hepatitis C

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

POR LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

PRESENTADA POR

Dña. María Rosario Vicente Romero

Murcia, 2015

CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Dra. Rosa Blázquez Garrido, jefa de servicio de Microbiología del Hospital Morales Meseguer de Murcia y **Dra. María Dolores Crespo Sánchez**, jefa de servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Albacete,

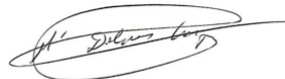
CERTIFICAN:

Que la presente memoria para acceder al grado de Doctor, que lleva por título **“Utilidad clínica del ensayo ARCHITECT HCV Ag® en el diagnóstico de la hepatitis C”** de la que es autora **María Rosario Vicente Romero**, ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste expedimos la presente certificación.

En Murcia, a 1 de junio de 2015.


C.I.P. 0801624004J
Dra. Rosa M^o Blázquez Garrido
C.B. 30/05825-5



Fdo.: Dra. Rosa Blázquez Garrido

Fdo.: Dra. María Dolores Crespo Sánchez

“Da tu primer paso ahora, no es necesario que veas el camino completo. Solo da el primer paso. El resto irá apareciendo a medida que camines”

M. Luther King

A mi familia,

INDICE

1	AGRADECIMIENTOS	11
2	ÍNDICES	15
2.1	ÍNDICE DE FIGURAS	17
2.2	ÍNDICE DE TABLAS	18
3	INTRODUCCIÓN	19
3.1	DESCUBRIMIENTO DEL VHC	23
3.2	ESTRUCTURA DEL VHC	25
3.3	EPIDEMIOLOGÍA	28
3.4	VÍAS DE TRANSMISIÓN	30
3.5	CICLO VITAL DEL VHC	33
3.6	VARIABILIDAD GENÉTICA	35
3.7	DIVERSIDAD GEOGRÁFICA	37
3.8	MECANISMOS DE PERSISTENCIA VIRAL	39
3.9	CURSO NATURAL DE LA INFECCIÓN	40
3.9.1	INFECCIÓN AGUDA	41
3.9.2	INFECCIÓN CRÓNICA	42
3.9.3	COMPLICACIONES A LARGO PLAZO	43
3.10	DIAGNÓSTICO	45
3.10.1	TEST SEROLÓGICOS	47
3.10.2	TEST VIROLÓGICOS	51
3.11	PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO	55
4	JUSTIFICACIÓN	61
5	OBJETIVO	65
6	MATERIAL Y MÉTODOS	69
6.1	APROBACIÓN DE LOS LABORATORIOS	71
6.2	CONSIDERACIONES ÉTICAS	71
6.3	RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	71
6.4	TRANSPORTE DE MUESTRAS	72
6.5	CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL	74
6.6	DETECCIÓN DE ANTÍGENO CORE DEL VHC	80
6.7	ESTUDIO ESTADÍSTICO	83
6.7.1	VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ARCHITECT AG HCV	83
6.7.2	CURVA ROC	84
6.7.3	ESTUDIO DE CORRELACIÓN	84
6.7.4	ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL	85
6.7.5	COMPARACIÓN DE MEDIAS	85
6.8	BIBLIOGRAFÍA	86
7	RESULTADOS	87

7.1	VALIDEZ DE LA TÉCNICA ARCHITECT AG HCV	89
7.2	RENDIMIENTO DE LA TÉCNICA	93
7.3	CURVA ROC	93
7.4	ESTUDIO DE CORRELACIÓN	100
7.5	ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL	101
7.6	COMPARACIÓN DE MEDIAS	103
8	DISCUSIÓN	105
9	CONCLUSIONES	127
10	ANEXOS	131
11	BIBLIOGRAFÍA	135

1 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la aprobación de mis directoras de tesis. Mi más sincero agradecimiento a las Dras. Rosa Blázquez y María Dolores Crespo.

Al Dr. Manuel Segovia por tutelar este trabajo.

A mis profesores de la facultad de Biología, especialmente a la Dra. Alfonso García Ayala, siempre dispuesta a echarme una mano y animándome a seguir adelante con la seguridad de que algún día leería la tesis doctoral. También al Dr. José Cansado, por atenderme y orientarme cuando lo he necesitado.

A mis compañeros del Hospital General Universitario de Albacete, con los que me formé como Microbióloga, por todo lo que me han enseñado. En especial a Jaime, Joaquín Blas, María, Julia, Paco e Inocencio, por echarme una mano también en este trabajo.

A todos los miembros de los grupos de Virología y Oncología Molecular así como a los miembros de la empresa Zurco por su ayuda, dedicación y apoyo durante la elaboración del trabajo experimental realizado para obtener el Diploma de Estudios Avanzados, en especial a Pilar Clemente, Antonio Mas y Ricardo Sánchez, por su paciencia y su gran ayuda en el diseño de los experimentos e interpretación de los resultados y a María Pilar de Castro por su apoyo y sus consejos en momentos de desesperación.

A los compañeros del Hospital Morales Meseguer, en especial a Rosa Cesteros y Lola Navarro siempre animándome y dispuestas a ayudarme.

A Angeles Grau y Francisco Javier Vidal, representantes de Abbott Diagnostics, por su buena disposición para que este trabajo pudiera realizarse.

A Guadalupe Ruiz, miembro de la Unidad de Metodología, Ética y Calidad de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitaria de Murcia, por ayudarme con el estudio estadístico.

Al Comité ético de investigaciones clínicas del Hospital Morales Meseguer, especialmente a la Dra. Nájera.

A Joaquín Carrasco, Secretario Administrativo del Doctorado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Murcia, por su ayuda y su amabilidad.

A todos los que me han animado a lo largo de este proyecto. Especialmente a Inma y a Laura, porque siempre puedo contar con ellas.

A mi familia, especialmente a mis padres, sin su ayuda el camino habría sido mucho más complicado.

A mi marido, porque si lo elegí fue por algo...

A mi hijo Juan por hacernos la vida fácil y divertida con su simpatía y buen humor a todas horas.

Y a la peque (Berta) por no consumir toda mi energía.

2 ÍNDICES

2.1 Índice de figuras

FIGURA 1: Estructura del virus de la hepatitis C (Lindenbach BD)	25
FIGURA 2: Genoma del virus de la hepatitis C	27
FIGURA 3: Infectados por VIH, VHC y coinfectados a nivel mundial (Clausen LN y cols.)	28
FIGURA 4: Prevalencia global del virus de la hepatitis C (%) (Lavanchy D. Y cols.)	29
FIGURA 5: Ciclo vital del virus de la hepatitis C (Lange CM y cols.)	34
FIGURA 6: Filogenia del VHC (Klenerman y cols.)	36
FIGURA 7: Curso natural de la infección por el VHC (Chen SL y cols.)	40
FIGURA 8: Secuencia temporal de marcadores virales durante la infección aguda con resolución espontánea. El sombreado blanco corresponde a niveles de ALT (Mur JIE y cols.).	42
FIGURA 9: Secuencia temporal de marcadores virales en la infección aguda con evolución a la cronicidad. El sombreado blanco corresponde a niveles de ALT (Mur JIE y cols.).	43
FIGURA 10: Factores de riesgo que influyen en la evolución de la infección por el virus de la hepatitis C (Adaptación de Chen SL y cols.)	44
FIGURA 11: Algoritmo diagnóstico de la infección por VHC (CDC)	46
FIGURA 12: Algoritmo diagnóstico de la infección por VHC (Tillmann HL y cols.)	47
FIGURA 13: Tira de nitrocelulosa del sistema INNO LIA HCV Score (Innogenetics)	48
FIGURA 14: Inmunoensayo enzimático	49
FIGURA 15: Diagrama de flujo para la clasificación de sustancias infecciosas y muestras de pacientes (OMS)	73
FIGURA 16: Fase pretratamiento (Abbott Diagnostics)	81
FIGURA 17: Paso 1 (Abbott Diagnostics)	82
FIGURA 18: Paso 2 (Abbott Diagnostics)	82
FIGURA 19: Interpretación de los coeficientes de probabilidad	84
FIGURA 20: Curva ROC	94
FIGURA 21: Diagrama de dispersión	101
FIGURA 22: Diagrama de caja	104
FIGURA 23: Recomendaciones de cribado antivirus hepatitis según grupo y probabilidad de riesgo de infección	115
FIGURA 24: Contenido básico de la anamnesis en pacientes con hepatitis crónica vírica	116
FIGURA 25: Normograma de Fargan	118
FIGURA 26: Potencial papel del antígeno core del VHC en el algoritmo diagnóstico de la infección por VHC	125

2.2 Índice de tablas

Tabla 1: Distribución geográfica de los principales genotipos y subtipos del VHC (Ramia S y cols.)	37
Tabla 2: Secuencia temporal de marcadores de infección por el virus de la hepatitis C	41
Tabla 3: Marcadores virológicos (Chevaliez S y cols.)	45
Tabla 4: Lectura e interpretación de INNO LIA HCV Score (Innogenetics)	50
Tabla 5: Definiciones de respuesta virológica (Molina Pérez E y cols.)	56
Tabla 6: Medicamentos concomitantes recomendados y duración del tratamiento para la terapia combinada con SMV	58
Tabla 7: Pautas de parada del tratamiento	59
Tabla 8: Medicamentos recomendados para la terapia combinada con SOF y duración del tratamiento	59
Tabla 9: Interpretación de los resultados (Roche Diagnostics)	79
Tabla 10: Tabla de contingencia carga viral y antígeno core del VHC	89
Tabla 11: Sueros no infectados con un resultado de antígeno core del VHC > 3 fmol/l	90
Tabla 12: Sueros infectados con un valor de antígeno ≤ 3 fmol/l	91
Tabla 13: Sueros infectados con carga viral entre 15 y 52671,43 UI/ml	92
Tabla 14: Índices de exactitud de la técnica ARCHITECT Ag HCV.	92
Tabla 15: Coeficientes de probabilidad	93
Tabla 16: Parámetros curva ROC	93
Tabla 17: Coordenadas de la curva ROC	94
Tabla 18: Resumen del modelo de regresión lineal	102
Tabla 19: Resumen del ANOVA de la regresión	102
Tabla 20: Estudio de comparación de medias	103
Tabla 21: ANOVA	103
Tabla 22: Interpretación de la realización de pruebas en paralelo	124

3 INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la hepatitis C (VHC). La fase aguda de la infección rara vez es grave y no suele producir una sintomatología específica. Cuando aparecen síntomas, estos son similares a otras infecciones víricas por lo que en muchas ocasiones la infección no se diagnostica y pasa desapercibida. Un número considerable de las personas con infección aguda terminan desarrollando una infección crónica sin ser conscientes y, algunos, sufrirán cirrosis o hepatocarcinoma (HCC) (1).

La organización mundial de la salud (OMS) estima que hay en el mundo entre 130 y 150 millones de personas infectadas y, anualmente, mueren entre 300.000 y 500.000 personas por enfermedades hepáticas relacionadas con el VHC (2).

Para el manejo clínico de los pacientes con hepatitis C se utilizan cuatro marcadores virológicos: el genotipo del virus, su ARN, el antígeno core del virus y los anticuerpos específicos frente al virus (anti-VHC) (3). Dado que en la infección aguda la aparición de anticuerpos anti-VHC ocurre entre 6 y 12 semanas después de la exposición al virus (periodo ventana), la determinación de marcadores de replicación viral permite identificar la infección por el VHC durante dicho periodo ventana, antes de la aparición de los anticuerpos, lo que resulta especialmente útil en el cribado de donantes de sangre, en pacientes con hepatitis aguda seronegativa, o tras exposición accidental percutánea a sangre contaminada (4).

El bajo nivel de virus circulante durante la infección hace necesario que el ARN del virus tenga que ser amplificado usando técnicas moleculares, como la retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que resultan caras y, aunque proporcionan una detección fiable de la viremia en todas las fases de la infección, su principal limitación es la posibilidad de dar falsos positivos por contaminación. Es por ello una técnica que requiere cierta experiencia por parte del personal y resulta adecuada solo en laboratorios dotados de la infraestructura necesaria para llevar a cabo técnicas de biología molecular (5,6).

El primer test comercial desarrollado para detectar el antígeno core del VHC en 1999 fue el HCV Core Antigen ELISA Test System (Ortho Clinical Diagnostics). Este test solo detectaba el antígeno durante el periodo de ventana serológica y esto limitó su utilidad clínica (5). La segunda generación de este test comercial fue llamada Total HCV Core Antigen ELISA Test System ó track-C assay (Ortho Clinical Diagnostics). Esta segunda generación permitía la detección de antígeno core del VHC tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos anti-VHC. En el año 2002 Bouvier y cols. (7) evaluaron esta nueva técnica y concluyeron que la cuantificación de antígeno core del VHC no podía ser utilizado como marcador de replicación viral cuando la carga viral del VHC era inferior a 20.000 UI/ml. Actualmente hay disponible un nuevo método para la detección y cuantificación del antígeno core del VHC, ARCHITECT HCV Ag, que utiliza la misma plataforma ARCHITECT empleada para la determinación de anticuerpos anti-VHC en muchos centros y, según algunos autores, podría suponer un cambio en el enfoque diagnóstico de la infección por el VHC ya que, respecto a los métodos de amplificación de ARN, es un método más barato, rápido y no requiere una cualificación especial del personal (8-13).

Evaluar la técnica ARCHITECT HCV Ag respecto a la detección de la carga viral por PCR a tiempo real nos permitirá obtener conclusiones sobre su utilidad en el diagnóstico rutinario de la infección por VHC.

3.1 Descubrimiento del VHC

Gracias a la aparición de los métodos diagnósticos específicos para la hepatitis A y B, a mediados de los años setenta pudo demostrarse que algunas hepatitis postransfusionales no eran debidas ni al virus A, ni al virus B. A este tipo de hepatitis se le denominó inicialmente "hepatitis no A no B" (HNANB) y era responsable de más del 90% de las hepatitis postransfusionales (14).

Cabe resaltar que el VHC es el primer virus descubierto por clonación molecular sin el uso de métodos biológicos o biofísicos (15). En 1987, Michael Houghton y sus colegas de la Corporación Chiron infectaron experimentalmente a un chimpancé tras la administración intravenosa de un concentrado de factor VIII preparado a partir del plasma de un paciente infectado con hepatitis postransfusional HNANB. Esto permitió obtener grandes cantidades de plasma de chimpancé con un título viral elevado (10^6 dosis infectantes de chimpancé por ml) y a partir de este material se extrajo el ARN por ultracentrifugación.

El ARN extraído fue, posteriormente, desnaturalizado y sometido a la acción de una transcriptasa inversa para la obtención de moléculas de ADN complementario (ADNc), con las que se creó una genoteca y, con el bacteriófago lambda gt11, se transfectó *Escherichia coli*.

De este modo se logró la síntesis de polipéptidos correspondientes a las diferentes secuencias nucleotídicas del ADNc en cuestión. A continuación, las proteínas obtenidas por clonación se enfrentaron con sueros de pacientes con HNANB con la esperanza de que contuvieran anticuerpos específicos frente a alguna de ellas.

Tras el estudio de un millón de clones de la genoteca, Houghton y cols. identificaron un clon que expresaba un antígeno que reaccionaba específicamente con estos sueros.

Finalmente, a partir de ese clon pudieron determinar la casi totalidad de la secuencia del genoma viral (15). Pudo comprobarse entonces que el VHC era la principal causa de la HNANB y, en el momento de su descubrimiento, suponía la principal causa de hepatitis postransfusional.

3.2 Estructura del VHC

El VHC es el único representante del género Hepacivirus de la familia Flaviviridae. La partícula viral tiene un diámetro de 30 a 60 nm y presenta, 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 (FIGURA 1)(16).

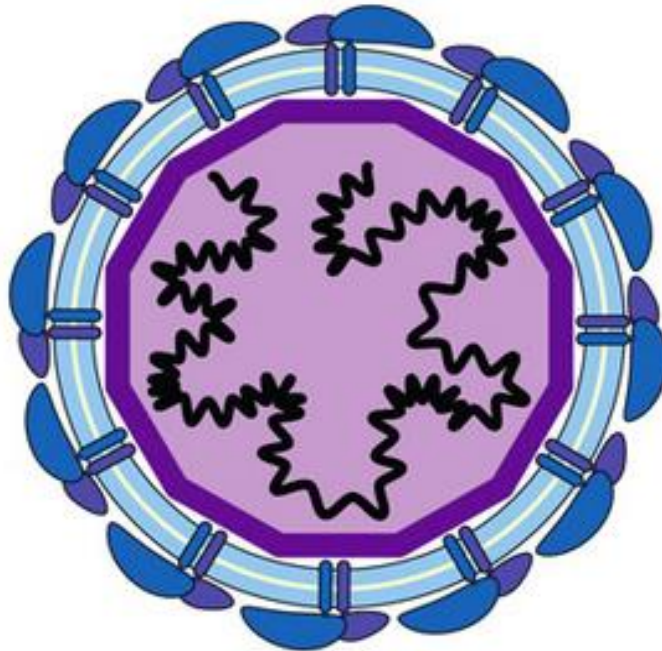


FIGURA 1: Estructura del virus de la hepatitis C (Lindenbach BD)

El genoma del VHC posee una única pauta de lectura (ORF) que es traducida a una poliproteína de aproximadamente 3.010 aminoácidos (FIGURA 2). Esta ORF está flanqueada en los extremos 5' y 3' por dos regiones no traducidas denominadas 5'UTR y 3'UTR, respectivamente. Ambas regiones contienen señales indispensables para la regulación de la replicación y traducción del ARN viral:

- La **región 5'UTR** posee una longitud de 340 bases y es la más conservada del genoma. En ella encontramos la región IRES (del inglés

Internal Ribosome Entry Site) que dirige el ensamblaje de la subunidad 40S del ribosoma (17).

- La **región 3'UTR** se relaciona con la replicación, estabilización y empaquetamiento del ARN viral (18).

El genoma viral codifica para proteínas estructurales y no estructurales. Las **proteínas estructurales** son las únicas presentes en la partícula viral, concretamente:

- el Core (**C**) es una ribonucleoproteína que contiene la secuencia encapsidadora del virus y forma la cápside viral.

- las glicoproteínas (**E1 y E2**) presentes en la envuelta lipídica, están implicadas en el reconocimiento de los receptores específicos y en la entrada del virus en la célula.

- la proteína **p7** ha sido muy poco estudiada aunque su función parece estar relacionada con la formación de un canal iónico. Se trata de una proteína muy hidrofóbica.

El conjunto de **proteínas virales no estructurales** (NS) está formado por las proteínas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, y todas ellas deben sintetizarse antes de iniciar la replicación del genoma en la célula hospedadora.

- **NS2** es una metaloproteasa dependiente de Zinc.

- **NS3** está formada por dos dominios con funciones diferentes; el dominio amino-terminal (Nt) es un dominio proteasa que necesita como cofactor a la proteína viral **NS4A**, mientras que el dominio carboxi-terminal (Ct) presenta actividad helicasa.

- **NS4B** es una proteína de membrana que se localiza en la membrana del retículo endoplasmático y es imprescindible en la replicación viral, ya que está implicada en la generación de las pequeñas vesículas donde se formarán los complejos replicativos.

- De **NS5A** no se conoce muy bien su función pero se sabe que es imprescindible para la replicación viral. Contiene la región ISRD (interferon sensitivity determining region) que se puede utilizar para predecir la respuesta viral a la terapia con interferón (INF). Se ha observado que mutaciones puntuales en NS5A pueden aumentar la replicación viral y que su estado de fosforilación influye en la eficacia replicativa.

- Por último, **NS5B** es una ARN polimerasa dependiente de ARN responsable de la replicación del genoma viral. Tiene la estructura típica de las polimerasas, con forma de mano derecha y constituida por tres dominios denominados pulgar, palma y dedos. No posee actividad correctora de errores por lo que presenta una tasa de error de aproximadamente 10^{-3} por nucleótido y generación.

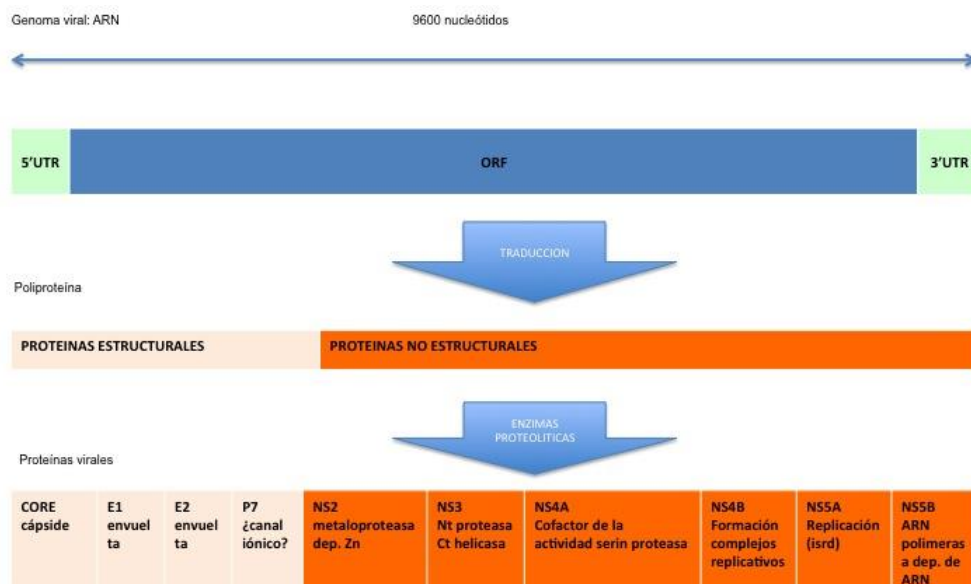


FIGURA 2: Genoma del virus de la hepatitis C

3.3 Epidemiología

Según estimaciones recientes, más de 185 millones de personas en el mundo están infectadas con el VHC. Cada año se infectan entre 3 y 4 millones de personas y se producen 350.000 muertes a causa de esta infección (2). Del total de infectados, 150 millones de personas desarrollan una infección crónica y están en riesgo de sufrir cirrosis hepática o cáncer de hígado (19). En la FIGURA 3 podemos ver representado el número de infectados con VHC, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y coinfectados con ambos virus (20).

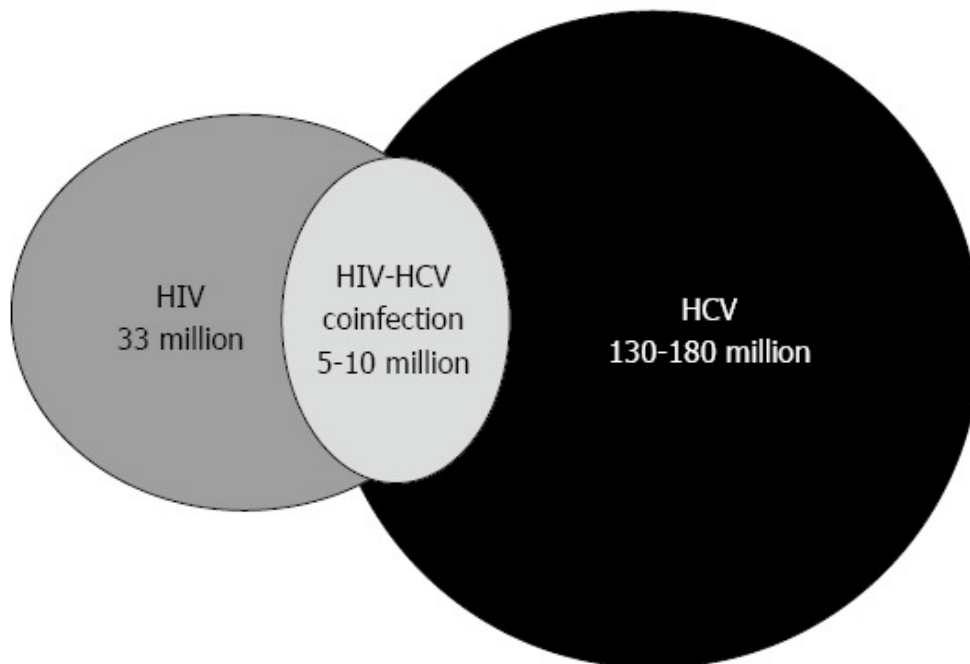


FIGURA 3: Infectados por VIH, VHC y coinfectados a nivel mundial (Clausen LN y cols.)

Como la mayoría de las infecciones agudas cursan de forma asintomática, los datos de incidencia de nuevos casos son difíciles de obtener. En la FIGURA 4 pueden observarse la prevalencia global del VHC (21).

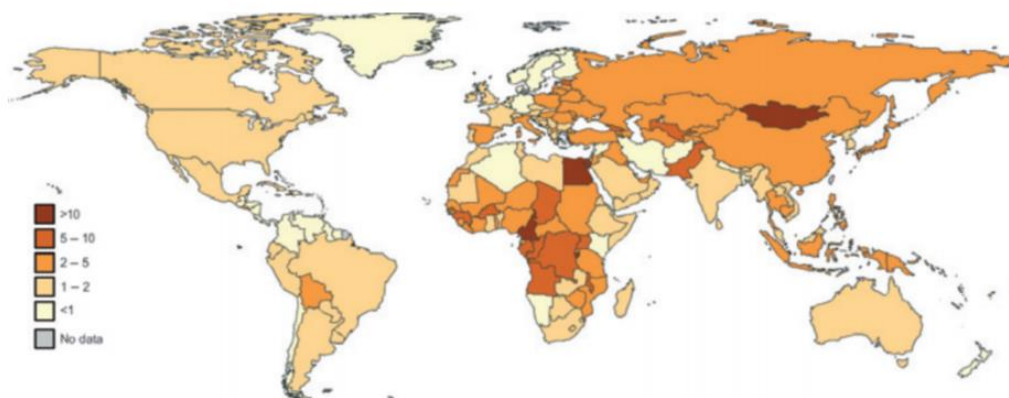


FIGURA 4: Prevalencia global del virus de la hepatitis C (%) (Lavanchy D. Y cols.)

La prevalencia de VHC varía entre 2,4% de Europa occidental y central y el 2,9% para Europa del Este (22). La prevalencia en España se estima que está alrededor del 2,5% al igual que en otros países de Europa occidental (23,24).

A pesar de la reducción de dos tercios de los casos incidentes de hepatitis C que se ha producido en España en los últimos años, es probable que en los próximos años aumente el número de pacientes con enfermedad hepática avanzada debida al VHC que serán atendidos en el sistema sanitario, ya que es previsible que muchos casos ahora no diagnosticados sean reconocidos por primera vez a raíz de algunas de las complicaciones de la enfermedad. Por tanto, todos los esfuerzos encaminados a incrementar el cribado de casos ocultos de hepatitis crónica C en los centros de atención primaria, a fin de que reciban tratamiento antes de que alcancen una fase avanzada, tendrán un impacto beneficioso en términos económicos y sociales.

3.4 Vías de transmisión

Se conocen varias vías de transmisión del VHC (4):

El **uso de drogas por vía parenteral**. Esta vía de transmisión es la más frecuente ya que más del 50% de los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) presentan anticuerpos anti-VHC. Los índices de infección por esta vía oscilan alrededor del 80% globalmente. La puesta en marcha de programas de intercambio de jeringuillas tiende a reducir esta vía de transmisión.

Transfusión sanguínea o de hemoderivados, hemodiálisis, trasplante de órganos (antes de 1992). La introducción del cribado de anticuerpos anti-VHC en 1992 ha permitido que estas vías hayan desaparecido prácticamente, si bien aún puede producirse de manera excepcional durante el periodo ventana, antes de la seroconversión en hepatitis aguda C, siendo la probabilidad inferior a un caso por cada 100.000 unidades transfundidas. La prevalencia de anticuerpos frente al VHC en las unidades de hemodiálisis españolas era superior al 30% a principios de los años noventa pero se había reducido al 18% en el año 2000 (25).

Realización de tatuajes, acupuntura y piercing, estos últimos están solo implicados ocasionalmente.

Transmisión por exposición ocupacional tras pinchazo accidental en personal sanitario. La incidencia media de seroconversión es del 1,8% (rango: 0%-7%).

Exposición mucosa a sangre. Es poco frecuente.

Hospitalización. Es un factor de riesgo para adquirir la infección por VHC (por desinfección inadecuada del material, compartir material contaminado entre los pacientes y la práctica de procedimientos invasivos). Este tipo de transmisión puede

ocurrir de paciente a paciente (documentado en salas de hemodiálisis, hematología y hepatología), de paciente a personal sanitario (en consultas odontológicas y traumatológicas) o del personal sanitario al paciente (en casos excepcionales de cirugía cardíaca o de cavidades profundas, en las que no existe visión directa por parte del cirujano). Se ha descrito la transmisión del VHC en relación con colonoscopias, especialmente si se efectúan biopsias.

Transmisión intrafamiliar. Ocurre por exposición parenteral inaparente, podría darse al compartir maquinillas de afeitar, cepillos de dientes o corta-uñas.

El riesgo de transmisión a largo plazo en **relaciones monógamas heterosexuales** es menor del 5%. El riesgo se incrementa en caso de mantener relaciones sexuales sin preservativo con múltiples parejas sexuales, estar coinfectado con el VIH o padecer enfermedades de transmisión sexual.

El riesgo de **transmisión vertical** es del 5% de promedio, porcentaje que se triplica en los niños nacidos de madres coinfectadas por VIH. No está claro si la práctica de amniocentesis o una rotura prolongada de membranas están asociadas con un mayor riesgo de transmisión materno- infantil.

Lactancia materna. No ha sido relacionada con la transmisión de VHC al recién nacido salvo en casos de grietas en el pezón con sangrado.

El VHC NO se transmite por abrazar, besar o compartir utensilios para comer. No se han descrito casos de contagio por contacto con piel no intacta y el riesgo de transmisión desde personas con bajos niveles de ARN viral es insignificante.

En el 30-40% de casos de hepatitis por VHC el mecanismo de transmisión es desconocido. La infección se detecta con mayor frecuencia en:

- Donantes de sangre.
- Series de pacientes procedentes de clínicas hepáticas.

- Pacientes con historia de uso intranasal de cocaína.
- Un elevado porcentaje de casos son pacientes de mediana o avanzada edad y que probablemente adquirieron la infección años atrás por transmisión percutánea inaparente.
- Pacientes de bajo nivel socioeconómico por asociarse a muchas infecciones.

3.5 Ciclo vital del VHC

El VHC se replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos pero también es capaz de infectar a otras células como las células dendríticas (26) y los linfocitos B (27). Las partículas de VHC se pueden encontrar libres en el suero, unidas a inmunoglobulinas o asociadas a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), siendo esta última probablemente la forma más infecciosa. Sueros ricos en partículas de LDL mostraron ser infecciosos en chimpancés mientras que sueros ricos en partículas de mayor densidad fueron menos infecciosos (28).

Las glicoproteínas de la envuelta viral son capaces de unirse a múltiples proteínas de membrana, como CD81 y LDLR, que podrían servir como receptores específicos (FIGURA 5)(29). Tras endocitosis mediada por receptor se fusiona la envuelta viral con la membrana de los endosomas en un proceso mediado por glicoproteínas de la envuelta y dependiente del pH (30).

En este momento se produce la eliminación de la cápside y la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula infectada.

Una vez es liberado en el citoplasma, el genoma viral se traduce mediante un proceso independiente de estructura cap y que necesita el ensamblaje de la subunidad 40S del ribosoma en el sitio IRES de la región 5'UTR. La poliproteína viral sintetizada es procesada, tanto por proteasas del hospedador como del virus, dando lugar, al menos, a 10 proteínas estructurales y no estructurales que siguen el siguiente orden (29):

NH₂-C-E₂-E₂-p7-NS1-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH

Los primeros cortes de la poliproteína los realiza una proteasa del hospedador dando lugar a la única proteína de la cápside (Core), a las glicoproteínas de la

envuelta (E1 y E2) y a la proteína p7. Las proteínas no estructurales son procesadas por proteasas virales (NS2/3 y NS3/4A).

Como hemos mencionado anteriormente, la proteína NS4B es la encargada de formar unas microvesículas membranosas derivadas de la membrana externa del retículo endoplásmico en cuyo interior se localizan la proteína del core y las proteínas no estructurales NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Estas proteínas virales, junto al ARN viral y a factores celulares hasta la fecha poco conocidos, todos ellos incluidos en las microvesículas, forman el complejo de replicación viral.

La formación de nuevas partículas virales comienza presumiblemente en el interior de estas microvesículas con la interacción del ARN genómico generado por la polimerasa viral NS5B y las proteínas de la cápside formando la nucleocápside que posteriormente se recubrirá con la envuelta.

Finalmente, las partículas virales maduras se exportan por exocitosis y salen de la célula. La alta tasa de replicación, estimada en 10^{12} nuevos viriones por día, y la tasa de error de la polimerasa dan lugar a la existencia de una gran heterogeneidad.

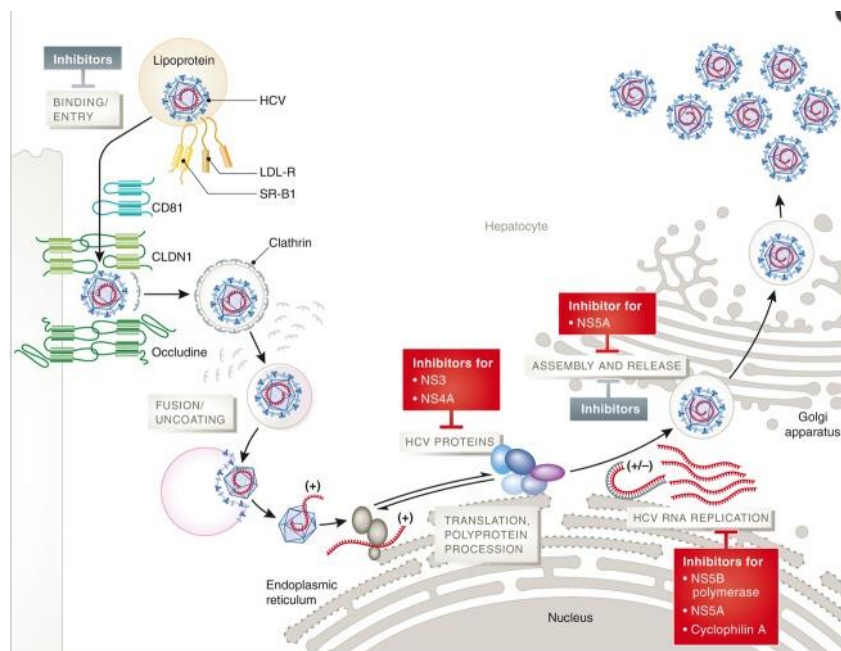


FIGURA 5: Ciclo vital del virus de la hepatitis C (Lange CM y cols.)

3.6 Variabilidad genética

Como la mayoría de los virus ARN, el VHC muta continuamente debido a la baja fidelidad de copia y a la ausencia de actividad correctora de errores de la polimerasa viral durante la replicación del genoma viral. Por tanto, una población de VHC nunca será una población homogénea de genomas idénticos.

La tasa de acumulación de mutaciones para el VHC se ha calculado que está en torno a 10^{-3} sustituciones por sitio y por generación (31), es decir, la enzima comete un error por cada 1.000 a 10.000 nucleótidos que incorpora a la molécula naciente.

Estas poblaciones heterogéneas de genomas no idénticos, aunque muy relacionados entre sí, se conocen como cuasiespecies (32). La heterogeneidad genética no está igualmente distribuida a lo largo del genoma, siendo los genes que codifican para las proteínas estructurales E1 y E2 los más heterogéneos. La región más variable de todo el genoma corresponde a la región hipervariable 1 (HRV1) localizada en el extremo N- terminal de la proteína E2 (33,34). Por el contrario, la región más conservada es la 5'UTR donde se localiza la secuencia IRES.

Esta heterogeneidad genética del virus ha llevado a clasificarlo en 7 genotipos distintos, nombrados del 1 al 7 por orden de descubrimiento, los cuales comparten menos del 80% de homología de secuencia entre sí (35) (FIGURA 6). Cada genotipo, a su vez, es subdividido en un número determinado de subtipos (en total más de 100) nombrados alfabéticamente también por orden de descubrimiento. Estos subtipos difieren entre ellos en un 20-25% de los nucleótidos (36). Las regiones 5'UTR y NS5B, al ser las más conservadas, son las más comúnmente empleadas para la identificación de los diferentes genotipos.

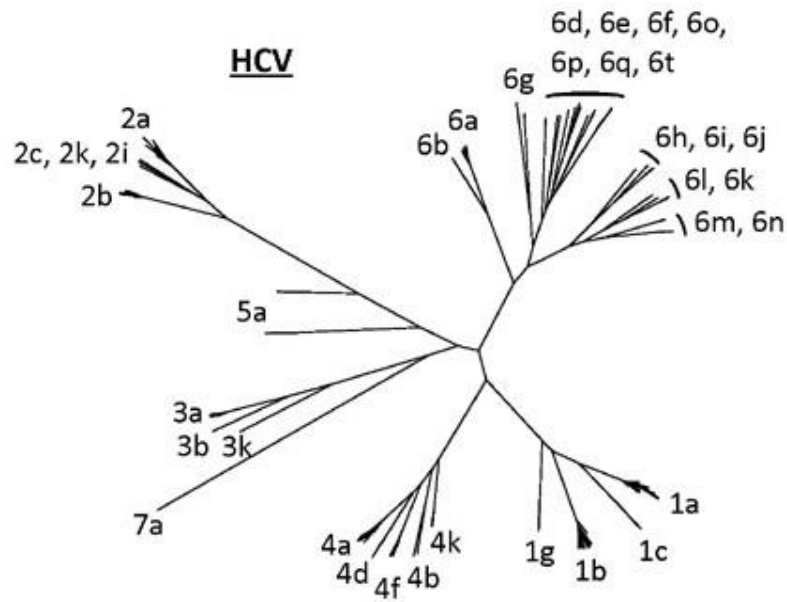


FIGURA 6: Filogenía del VHC (Klenerman y cols.)

Según algunos autores, existe una relación entre diversidad de cuasiespecies y gravedad del proceso infeccioso. Farci y cols. (2000) han encontrado una diversidad de cuasiespecies menor en las hepatitis agudas resolutivas (37). Por el contrario, Mas y cols. (2004) mostraron que una baja diversidad de cuasiespecies siempre se relaciona con infección persistente mientras que una alta diversidad de cuasiespecies puede relacionarse tanto con infección persistente como con resolución espontánea de la infección (33). Este último estudio demostró que la diversidad de las cuasiespecies *per se* no puede predecir la evolución de la infección por VHC.

3.7 Diversidad geográfica

Los genotipos 1, 2 y 3 son responsables de la mayoría de las hepatitis C en Europa occidental, USA y Japón. El genotipo 4 es más frecuente en África del Norte, Central y Oriente Próximo. El genotipo 5 predomina en África del Sur y el 6 en el sudeste asiático (36). La Tabla 1 muestra la distribución geográfica actual de los principales genotipos y subtipos del VHC (38). Como puede observarse en la tabla aparecen los genotipos del 1 al 11. Los genotipos 7, 8 y 9 han sido identificados principalmente en pacientes de Vietnam mientras que los genotipos 10 y 11 han sido identificados en Indonesia. Según Ramia S y cols. (38) los genotipos del 7 al 11 son variantes del mismo grupo y deberían ser clasificados como miembros del genotipo 6.

Tabla 1: Distribución geográfica de los principales genotipos y subtipos del VHC (Ramia S y cols.)

Region	Genotype/subtype	
	Most common	Less common
North America	1a	1b, 2b, 3a
Europe		
Northern Europe	1a	1b, 2, 3a
Southern and Eastern Europe	1b	1a, 2, 3, 2c
Japan	1b	2a, 2b, 3b
Africa		
North Africa*		
Tunisia	1b	1a, 2a, 2b, 3a, 4
Morocco	1b	2a, 2c, 1a
Central Africa		
Gabon	4	1a, 1b, 2a, 2b
Nigeria	1, 4	2
Cameroon	4	1, 2
South Africa	5	1, 2, 3 and 4
South East Asia		
Throughout the region	1	6, 7, 8, 9, 2
Vietnam, Thailand and Myanmar	7, 8, 9	10, 11
Indonesia	10, 11	1a
Philippines	1a	1b, 2a, 2b

* Excluding Egypt.

Se debe resaltar la importancia de la variabilidad de los genotipos según los grupos de riesgo, siendo por ejemplo más frecuentes los genotipos 1a y 3a en los UDVP.

3.8 Mecanismos de persistencia viral

La infección crónica que se establece en gran parte de los pacientes infectados se caracteriza por niveles ARN de VHC detectables y altos niveles del enzima hepático alaninaaminotransferasa (ALT) durante más de 6 meses.

Los mecanismos por los cuales el virus establece una infección persistente no están claros pero la gran variabilidad del virus juega un importante papel ya que le permite escapar de la respuesta inmunitaria del hospedador. Se ha demostrado que la región HVR1 del genoma VHC contiene ciertos epítomos que podrían seleccionar mutantes capaces de escapar al sistema inmunitario (39). Además, diferentes proteínas como la proteína de la envuelta E2, la proteína no estructural NS3/4A con actividad serín-proteasa y la proteína NS5A han sido propuestas como inhibidores de la respuesta mediada por interferón (40).

3.9 Curso natural de la infección

La diana natural del VHC son los hepatocitos y la infección no suele ser diagnosticada durante la fase aguda.

Los síntomas de la infección pueden aparecer a las 7-8 semanas tras la exposición al virus pero la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos o presentan síntomas leves. Los casos descritos de hepatitis fulminante durante este periodo no son frecuentes. Algunos de los síntomas descritos en la bibliografía incluyen: ictericia, malestar, náuseas, fatiga, dolor abdominal, pérdida de apetito, fiebre leve, mialgia y picor. Alrededor del 75-85% de las personas infectadas desarrollan una infección crónica, que dará lugar en un 10-20% de los pacientes al desarrollo de cirrosis. El intervalo entre la infección y el desarrollo de cirrosis puede ser de hasta 20-30 años y se caracteriza por un largo periodo de tiempo en el cual el paciente no presenta síntomas. Un 1-4% de los pacientes con cirrosis desarrollan cáncer de hígado (FIGURA 7) (41-43).

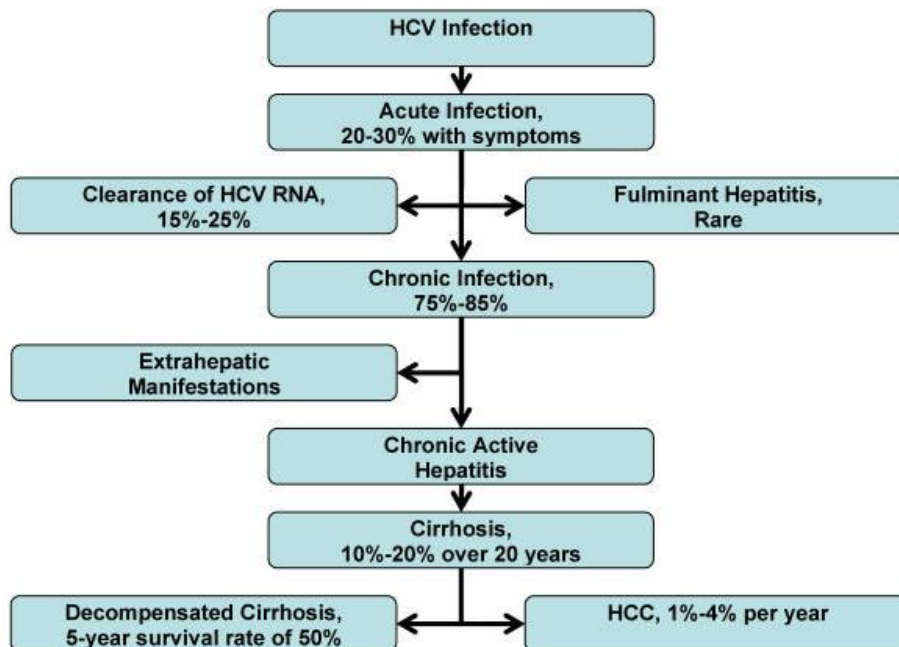


FIGURA 7: Curso natural de la infección por el VHC (Chen SL y cols.)

3.9.1 Infección aguda

La hepatitis C en fase aguda no suele diagnosticarse debido a que la mayoría de los casos cursan de forma asintomática. Solo alrededor del 20-30% de los pacientes en esta fase desarrollan síntomas clínicos a las 3-12 semanas de exposición al virus (41). Los niveles de transaminasas, como la ALT, indicativos de lesión hepática, pueden aumentar a las 2-8 semanas de exposición al virus aunque no existe una clara correlación entre el nivel de transaminasas y la histología hepática (44). La presencia del ARN viral aumenta rápidamente durante las primeras semanas y luego desaparece en los casos que resuelven la infección espontáneamente (15-40% de los casos) (FIGURA 8)(45). El antígeno core del VHC aparece en sangre 1-2 días después que el ARN (46-48) y sus variaciones suelen ser paralelas a las del ARN a lo largo de la infección aguda y crónica (49,50). Los anticuerpos anti-VHC suelen detectarse entre las 6-12 semanas de exposición al virus y permanecen durante toda la infección e incluso un tiempo tras la recuperación (43). En la Tabla 2 se resume la secuencia temporal de los marcadores de infección por el VHC.

Tabla 2: Secuencia temporal de marcadores de infección por el virus de la hepatitis C

Semanas tras la exposición al virus	Marcadores de infección viral
1-2	Detección de ARN viral en sangre
1-2 (1 -2 días después que el ARN)	Detección del antígeno core del VHC
2-8	Aumento de ALT
3-12	20-30% de los pacientes presentan sintomatología inespecífica
6-12	Detección de anticuerpos anti-VHC

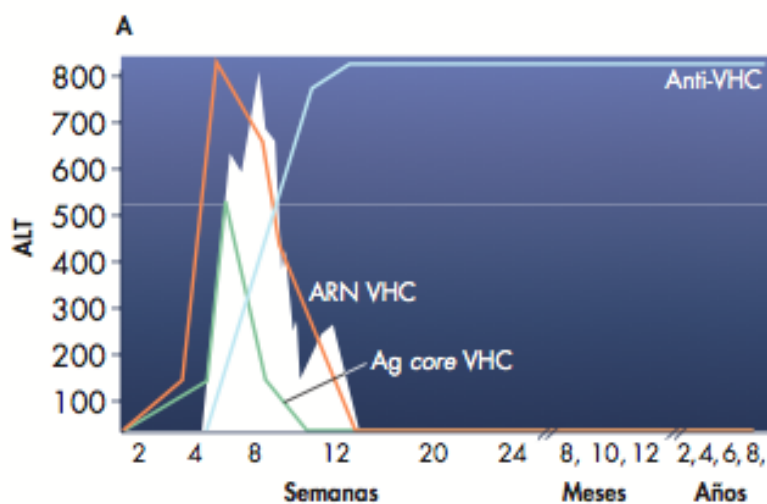


FIGURA 8: Secuencia temporal de marcadores virales durante la infección aguda con resolución espontánea. El sombreado blanco corresponde a niveles de ALT (Mur JIE y cols.).

3.9.2 Infección crónica

Se considera que el paciente está en la fase crónica de la infección cuando se detecta ARN viral durante más de 6 meses (FIGURA 9). La infección por el VHC cronifica en más del 50% de los casos, dado que la inmunidad del huésped es insuficiente para lograr eliminar el virus (51).

En esta fase, la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos durante décadas y en muchas ocasiones se llega al diagnóstico de forma casual cuando, por algún otro problema de salud, se realiza un análisis de sangre y se detecta una alteración de las enzimas hepáticas. Hay que tener en cuenta que, aunque la mayoría de los pacientes con hepatitis crónica C tienen niveles ligeros o moderadamente elevados y fluctuantes de transaminasas, hasta un tercio de los infectados pueden presentar niveles persistentemente normales de transaminasas (52).

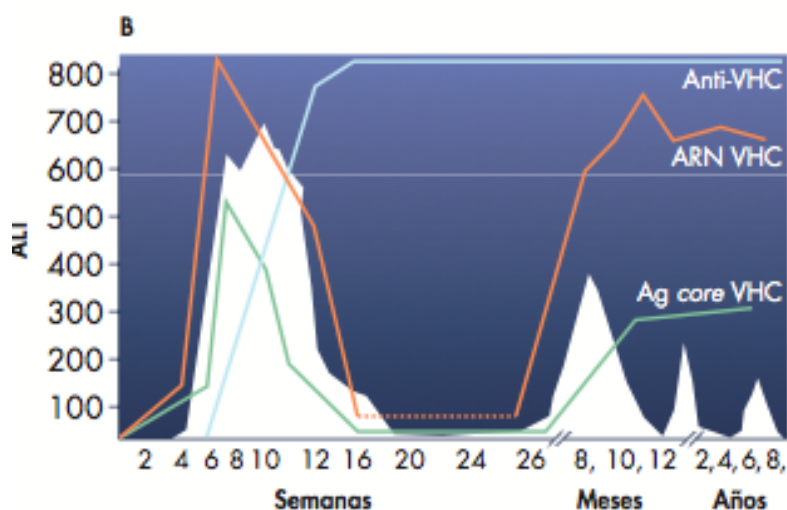


FIGURA 9: Secuencia temporal de marcadores virales en la infección aguda con evolución a la cronicidad. El sombreado blanco corresponde a niveles de ALT (Mur JIE y cols.).

3.9.3 Complicaciones a largo plazo

Entre el 75-85% de las personas que padecen la infección inicial contraen una enfermedad crónica y entre el 60-70% de las que padecen infección crónica sufren una hepatopatía crónica: un 5-20% contraen cirrosis y entre un 1-5% fallecen por cirrosis o cáncer de hígado (19).

Detectar a los pacientes con bajo riesgo de progresión de la enfermedad es importante para poder evitar el inicio inmediato de un tratamiento antiviral que puede tener múltiples efectos secundarios. Se conocen varios factores que durante las últimas décadas han influido en la evolución de la enfermedad (FIGURA 10) (35). Estos factores deben tenerse en cuenta para detectar a los pacientes susceptibles de recibir un tratamiento urgente dado su mayor riesgo de progresión rápida de la enfermedad.



FIGURA 10: Factores de riesgo que influyen en la evolución de la infección por el virus de la hepatitis C (Adaptación de Chen SL y cols.)

3.10 Diagnóstico

El diagnóstico virológico y la monitorización de la infección por VHC se basa en el uso de varios marcadores virológicos (Tabla 3) (53).

Tabla 3: Marcadores virológicos (Chevaliez S y cols.)

Marcadores directos
ARN VHC
Antígeno core del VHC
Marcadores indirectos
Anti-VHC

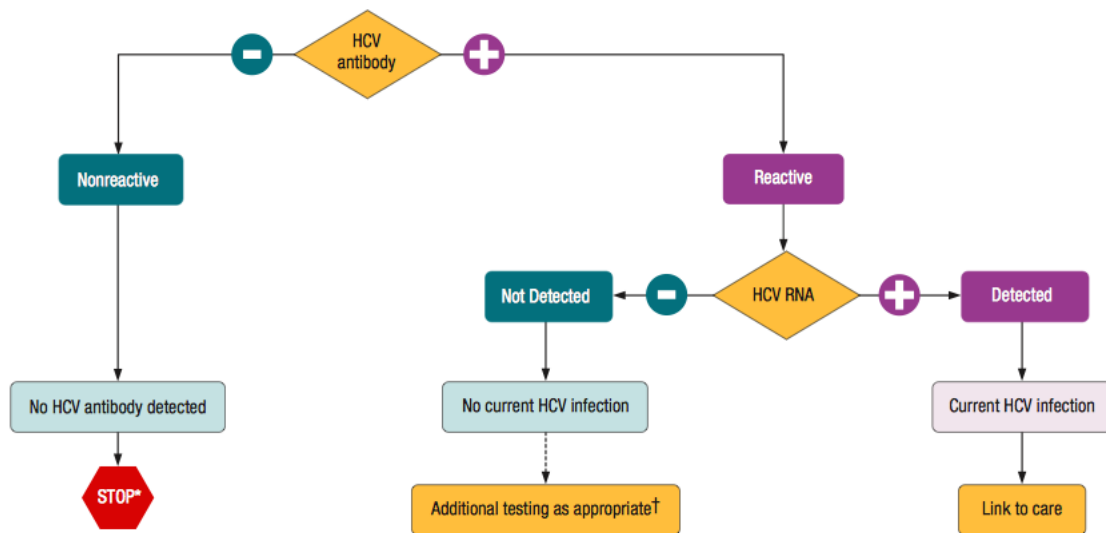
Existe un periodo denominado ventana serológica que se caracteriza por la detección de ARN viral y antígeno core del VHC en ausencia de anticuerpos anti-VHC. Se estima que este periodo dura aproximadamente una media de 60 días (53).

Los test serológicos identifican la presencia de anticuerpos anti- VHC siempre que se haya sobrepasado el periodo de ventana serológica y el paciente haya desarrollado anticuerpos frente al virus. Esto supone una limitación de los test serológicos dado que hay descritos casos de hepatitis C postransfusional en pacientes que recibieron sangre de donantes en los que no se habían detectado anticuerpos anti-VHC (54).

Los test serológicos únicamente indican exposición al virus pero no pueden distinguir entre pacientes que se han recuperado y pacientes expuestos a una infección activa (replicación viral) (55). Actualmente estas pruebas se utilizan como screening y técnica diagnóstica inicial.

Los test virológicos detectan secuencias específicas del ARN viral (carga viral) que indican infección activa. Estos test son necesarios para confirmar la infección activa. La detección de antígeno core del VHC puede ser una alternativa coste-efectiva para confirmar la infección por VHC, aunque los pacientes con baja carga viral (<1.000 UI/ml) pueden dar resultados falsos negativos (56).

Hasta el momento el algoritmo diagnóstico que se aplica en la mayoría de los laboratorios clínicos es similar al propuesto por los Centros para el control y la prevención de las enfermedades (CDC)(FIGURA 11)(57).



* For persons who might have been exposed to HCV within the past 6 months, testing for HCV RNA or follow-up testing for HCV antibody is recommended. For persons who are immunocompromised, testing for HCV RNA can be considered.
 † To differentiate past, resolved HCV infection from biologic false positivity for HCV antibody, testing with another HCV antibody assay can be considered. Repeat HCV RNA testing if the person tested is suspected to have had HCV exposure within the past 6 months or has clinical evidence of HCV disease, or if there is concern regarding the handling or storage of the test specimen.
 Source: CDC. Testing for HCV infection: An update of guidance for clinicians and laboratorians. MMWR 2013;62(18).

FIGURA 11: Algoritmo diagnóstico de la infección por VHC (CDC)

Actualmente son varios los trabajos que proponen incorporar la detección del antígeno core del VHC al algoritmo diagnóstico de la infección por VHC (8–10,46,55,56,58–60), un ejemplo de ello es el algoritmo propuesto por Tillmann (56).

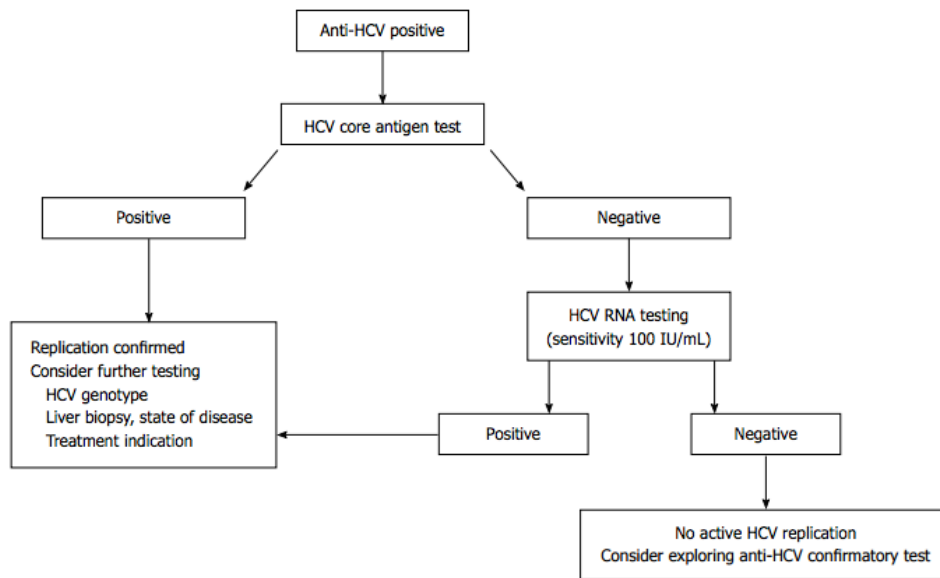


FIGURA 12: Algoritmo diagnóstico de la infección por VHC (Tillmann HL y cols.)

3.10.1 Test serológicos

3.10.1.1 Métodos de cribado

En 1989 surgieron los primeros ensayos capaces de detectar anticuerpos anti-VHC. Desde entonces han evolucionado a lo largo de tres generaciones, mejorando progresivamente su sensibilidad y su especificidad.

Actualmente, estos ensayos suelen utilizar antígenos sintéticos o recombinantes, dado que el virus no ha podido ser aún cultivado a altos títulos. La aparición de anticuerpos anti-VHC contra el virus se retrasa entre 4 y 6 semanas tras la infección, aunque puede retrasarse más en casos puntuales. Durante ese período de ventana serológica, la detección de anticuerpos anti-VHC será negativa, por lo que la negatividad de esta prueba en una muestra única no descarta la infección. La presencia de anticuerpos anti-VHC en suero indica contacto previo con el virus, pero no es, en sí misma, suficiente para establecer el diagnóstico de infección crónica. Además, en pacientes con inmunodeficiencias en la respuesta humoral y en pacientes

en hemodiálisis, la negatividad para anticuerpos anti-VHC no excluye totalmente la infección. Se recomienda que los resultados débilmente positivos se confirmen con pruebas suplementarias.

Existen en el mercado diferentes sistemas automatizados para llevar a cabo la detección de anticuerpos anti-VHC, ARCHITECT Anti-HCV (Abbott Diagnostics) es uno de ellos.

3.10.1.2 Pruebas suplementarias

Las pruebas suplementarias se realizan mediante sistemas de inmunoblots como el INNO LIA™ HCV Score (61) empleando diferentes antígenos adsorbidos sobre tiras de nitrocelulosa (FIGURA 13).

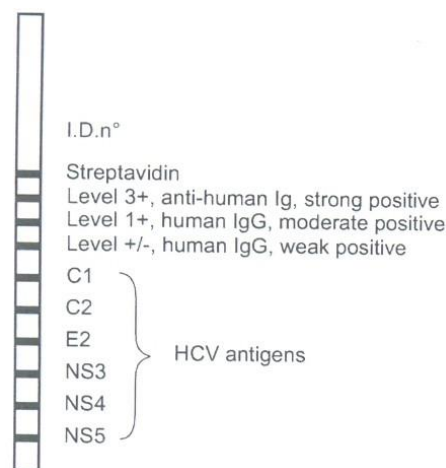


FIGURA 13: Tira de nitrocelulosa del sistema INNO LIA HCV Score (Innogenetics)

El INNO-LIA™ HCV Score está destinado a utilizarse como un ensayo complementario en muestras de suero o plasma humano que resultaron reactivos utilizando un procedimiento de cribaje de anticuerpos anti-VHC. Es un inmunoensayo en tira de tercera generación que incorpora antígenos de VHC derivados de la región principal, de la región hipervariable E2, de la región helicasa NS3 y de las regiones

NS4A, NS4B y NS5A. Se basa en una tira de nylon con soporte de plástico, recubierta con los antígenos mencionados, en forma de 6 bandas. Además, en cada tira hay cuatro bandas de control: una banda de control de estreptavidina, control positivo 3+ (anti-Ig humano), que también se utiliza como banda de control de adición de muestra, control positivo 1+ (IgG humano) y banda de corte \pm (IgG humano).

El INNO-LIA™ HCV Score está basado en el mismo principio que un inmunoensayo enzimático (FIGURA 14). Se incuba una muestra en una cubeta con la tira de ensayo y, si los anticuerpos anti-VHC están presentes en la muestra, se unirán a las bandas de antígeno de la tira. Posteriormente, se añade un conjugado anti-IgG humano de cabra marcado con fosfatasa alcalina purificada, que reacciona con los complejos antígeno-anti-VHC, siempre y cuando se hayan formado previamente. La incubación con el sustrato enzimático produce una coloración marrón oscuro, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-VHC capturado en una banda determinada. El revelado colorimétrico se detiene con ácido sulfúrico.

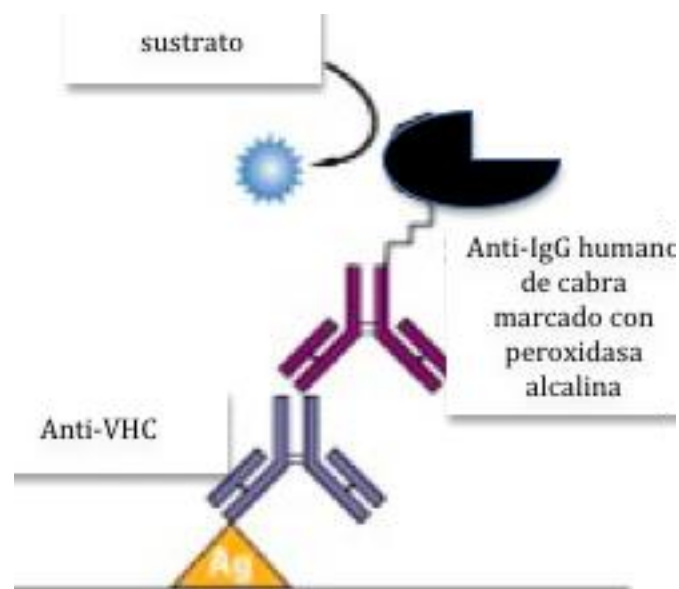


FIGURA 14: Inmunoensayo enzimático

El ensayo LIA® puede automatizarse fácilmente utilizando el aparato *Auto-LIA™*. Este instrumento es un sistema autónomo con aspiración, pipeteado e incubación automatizados. El ensayo en este aparato tiene una duración de 3 horas.

Tabla 4: Lectura e interpretación de INNO LIA HCV Score (Innogenetics)

RESULTADO	Interpretación de las bandas
NEGATIVO	todas las bandas de antígeno de VHC tienen una puntuación negativa únicamente una banda de antígeno de VHC tiene una intensidad de \pm , excepto cuando se observa reactividad para el NS3.
POSITIVO	al menos dos bandas de antígeno de VHC tienen una intensidad \pm o superior
INDETERMINADO	si únicamente una banda de antígeno de VHC tiene una puntuación 1+ o superior si la banda NS3 reacciona con una intensidad \pm o superior y todas las demás bandas de antígeno son negativas.

Limitaciones del procedimiento a tener en cuenta según las recomendaciones del fabricante:

- Debe cumplirse al pie de la letra el protocolo indicado a fin de obtener el rendimiento óptimo del ensayo.
- Las muestras con una banda NS3 +/- o superior pueden indicar una seroconversión para VHC. Por tanto, se las clasifica como indeterminadas. En caso de que se obtenga un resultado INDETERMINADO, se recomienda analizar otra muestra del paciente después de algunas semanas.
- Una muestra con reacción positiva en la banda de control de estreptavidina puede dar reacciones cruzadas con otros antígenos de VHC y no puede ser interpretada como positiva para anticuerpos de VHC.
- En la fase temprana de la infección es posible que no se detecten los anticuerpos contra el VHC.

- En el contexto de la hemodiálisis los anticuerpos pueden ser indetectables.

- La utilización de muestras diluidas puede producir resultados erróneos.

La sensibilidad del ensayo es del 100% y su especificidad varía según la población: en donantes de sangre es del 94,5% mientras que en muestras clínicas es del 93,7%.

Dada la alta sensibilidad y especificidad de las pruebas que detectan anticuerpos anti-VHC, no se recomienda el uso rutinario de las pruebas suplementarias (62). No obstante, solo estas pruebas pueden establecer la presencia o la ausencia de anticuerpos frente al VHC en las muestras que son reactivas en los ensayos de cribado y negativas en los test virológicos, por lo que deben utilizarse siempre que sea necesario comunicar a esos pacientes la presencia de anticuerpos anti-VHC en su suero, como es el caso de los donantes de sangre y de órganos.

3.10.2 Test virológicos

Los test virológicos presentan la ventaja frente a los test serológicos de poder detectar la infección durante el periodo de ventana serológica.

3.10.2.1 *Detección del ARN viral o carga viral*

La detección del ARN del virus se realiza mediante pruebas de amplificación genómica como la RT-PCR u otras. Su positividad indica presencia de virus circulante y confirma infección activa, tanto en fase aguda como crónica. Su negatividad en una muestra puntual no descarta la infección, ya que la viremia es, en ocasiones, intermitente.

Se han desarrollado algunos sistemas que permiten realizar una cuantificación aproximada de la viremia (carga viral) y existe un estándar internacional de ARN del VHC cuantificado en Unidades Internacionales (UI) que se utiliza para unificar los criterios de expresión de resultados entre los diferentes sistemas.

Durante el período de ventana serológica, este u otros test virológicos proporcionan el diagnóstico de la infección cuando las pruebas serológicas son negativas o arrojan resultados indeterminados. La detección del ARN viral acorta el periodo ventana en varias semanas ya que el ARN del VHC se detecta transcurridas 1 a 2 semanas desde la exposición al virus. Por tanto, la utilización de estos métodos se considera hoy en día indispensable para el diagnóstico precoz de la hepatitis C aguda.

La aplicación de las técnicas de PCR en tiempo real genera resultados más rápidos y permiten cuantificar la carga vírica y la detección de mutaciones. La cuantificación por este sistema en una muestra presenta un rango de detección superior al de otras tecnologías y existen sistemas automatizados para la amplificación y detección simultánea. El punto crítico sigue siendo la adecuada extracción de los ácidos nucleicos, para lo cual también existen ya sistemas automatizados en los cuales se minimiza el riesgo de la contaminación de las muestras. Los métodos de cuantificación de la viremia son sensibles y muy específicos pero resultan complejos, requieren un espacio dedicado específicamente a esas técnicas, son lentos a pesar de estar automatizados, requieren personal cualificado y suponen un alto coste (59).

3.10.2.2 Detección del antígeno core del VHC

El alto coste así como la necesidad de personal cualificado y el mayor riesgo de contaminación de las técnicas de cuantificación de ácidos nucleicos respecto a otras técnicas ha llevado a la búsqueda de alternativas en el manejo de la hepatitis C (5). De todas las proteínas candidatas, el antígeno core del VHC tiene una secuencia altamente conservada en todos los genotipos (63).

La cuantificación del antígeno core del VHC en sangre, es considerada por algunos autores como un marcador fiable de replicación viral (7,9,64). El antígeno core del VHC en sangre, aparece 1-2 días después que el ARN y sus variaciones suelen ser paralelas a las del ARN a lo largo de la infección aguda y crónica. Según Tilmann y cols. la detección de antígeno core del VHC podría ser una alternativa a la detección de ARN viral. En un número pequeño de pacientes podrían no detectarse el antígeno core del VHC al presentar cargas virales muy bajas pero, si aceptamos la pérdida de estos casos, el antígeno core del VHC podría utilizarse en el screening diagnóstico de la hepatitis C al igual que se utiliza el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en el screening de dicha enfermedad (56).

Seme y cols. (5) realizaron una revisión sobre el papel del antígeno core del VHC en el manejo de la hepatitis C. En ella se indica que el primer test comercial desarrollado para detectar el antígeno core del VHC en 1999 fue el HCV Core Antigen ELISA Test System (Ortho Clinical Diagnostics). Este test solo detectaba el antígeno durante el periodo de ventana serológica lo que limitó su utilidad clínica.

La segunda generación de estos test fue llamada Total HCV Core Antigen ELISA Test System or track-C assay (Ortho Clinical Diagnostics). Esta segunda generación permitía la detección de antígeno core del VHC tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos anti-VHC. Bouvier y cols. (7) evaluaron esta nueva técnica y concluyeron que la cuantificación de antígeno core del VHC no podía ser utilizado como marcador de replicación viral cuando la carga viral del VHC era inferior a 20.000 UI/ml.

Recientemente, el sistema ARCHITECT® i4000SR, disponible en muchos laboratorios para la detección rutinaria de anticuerpos anti-VHC, entre otras determinaciones, permite la cuantificación automática del antígeno core del VHC (ARCHITECT HCV Ag®).

ARCHITECT HCV Ag es un inmunoanálisis quimioluminiscente (CMIA) que utiliza micropartículas recubiertas con anticuerpo anti-VHC monoclonal para la detección del antígeno del VHC. La detección del antígeno del VHC se utiliza como ayuda en el diagnóstico de casos de sospecha de infección vírica por hepatitis C y para controlar el estado de individuos infectados, es decir, si la infección del paciente se ha resuelto o si éste se ha convertido en portador crónico del virus.

En pacientes con riesgo elevado de infección por el VHC como, por ejemplo, los drogodependientes por vía intravenosa, o en pacientes con inmunodeficiencia, como los pacientes sometidos a hemodiálisis o que padecen coinfecciones por VIH-VHC, puede que el antígeno del VHC sea el único marcador serológico para detectar una infección por el VHC, debido a la respuesta retardada de los anticuerpos específicos frente al VHC (65,66). Para el diagnóstico de hepatitis aguda o crónica, la reactividad del antígeno del VHC se debería correlacionar con la historia del paciente y la presencia de otros marcadores serológicos de hepatitis C (54,67).

Según Medici y cols. (68) la detección de antígeno core del VHC podría ser útil para confirmar o descartar infección activa tanto en pacientes que presentan anticuerpos anti-VHC como en pacientes con infección aguda o pertenecientes a grupos de riesgo. Un estudio llevado a cabo por Ross y cols. (69) concluye que el ensayo ARCHITECT HCV Ag es específico, reproducible, altamente sensible y clínicamente aplicable en el contexto de diagnóstico virológico del VHC.

3.11 Prevención y tratamiento

Actualmente no existe una vacuna convencional efectiva contra el VHC y, por tanto, la prevención consiste en reducir el riesgo de exposición al virus.

El desarrollo de una vacuna eficaz sigue siendo complicado debido a las propias características del virus, principalmente su alta tasa de replicación, estimada en 10^{12} nuevos viriones por día, y la alta tasa de error de la polimerasa (70). Por ello se está poniendo especial énfasis en el estudio de la inmunidad celular, en la que los linfocitos eliminan las células ya infectadas.

Un estudio preclínico ha comprobado, por primera vez, que una vacuna contra el VHC, denominada INO-8000, ha logrado generar una respuesta de células-T no solo en sangre sino también en el hígado. Las conclusiones del mencionado estudio preclínico fueron publicadas en la revista Plos One (71). INO-8000 es una vacuna terapéutica experimental que actúa sobre las proteínas NS3/4A, NS4B y NS5A del VHC y está diseñada para actuar frente a los genotipos 1a y 1b, los que tradicionalmente han sido más difíciles de tratar con las terapias farmacológicas.

El objetivo principal del tratamiento del VHC es la curación de la infección, que generalmente se asocia a la resolución de la hepatopatía en los pacientes sin cirrosis. Los pacientes con cirrosis continúan teniendo un riesgo de complicaciones con peligro para la vida, aunque con una frecuencia inferior, incluso después de erradicada la infección viral (72).

El VHC se divide en 7 genotipos con numerosos subtipos, siendo el genotipo 1 (principalmente 1b) el más frecuente en Europa con una prevalencia aproximada del 70%, seguido del genotipo 3. En España, el genotipo 4 es el tercero en frecuencia, siendo el genotipo 2 el más infrecuente. El genotipo del VHC no condiciona una evolución clínica diferente de la hepatitis C crónica, pero sí tiene un gran impacto en la respuesta al tratamiento (2).

Hasta el año 2011, la combinación de interferón- α pegilado (IFN-peg) y ribavirina (RBV) fue el tratamiento aprobado para la hepatitis crónica C. Este tratamiento comporta efectos secundarios considerables y un elevado coste. Además, la eficacia del tratamiento difiere según el genotipo del VHC: los pacientes infectados con el genotipo 1, solo responden aproximadamente la mitad de los casos, además de requerir mayores dosis de RBV y de una mayor duración de la terapia (48-72 semanas) en comparación con los pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 (73).

Se considera que un paciente ha respondido a la terapia cuando alcanza una respuesta virológica sostenida (RVS), definida como la ausencia de viremia a los 6 meses de finalizar el tratamiento. En la Tabla 5 se recogen las diferentes definiciones de respuesta virológica (74).

Tabla 5: Definiciones de respuesta virológica (Molina Pérez E y cols.)

Abreviatura	Término	Definición
RVR	Respuesta virológica rápida	RNA-VHC indetectable a las 4 semanas de inicio del tratamiento
RVRe	Respuesta virológica rápida extendida	RNA-VHC indetectable a las 4 y 12 semanas de tratamiento
RVT	Respuesta virológica temprana	RNA-VHC indetectable a las 12 semanas de inicio del tratamiento o reducción de la carga viral en > 2 log
RVTc	Respuesta virológica temprana completa	RNA-VHC indetectable a las 12 semanas de inicio del tratamiento
RVTp	Respuesta virológica temprana parcial	Reducción de la carga viral en > 2 log, sin obtener RVTc
RFT	Respuesta a fin de tratamiento	RNA-VHC indetectable al finalizar el tratamiento
RVS	Respuesta viral sostenida	RNA-VHC indetectable al final del tratamiento y 24 semanas después del mismo
NR	No respuesta	RNA-VHC nunca se reduce > 2 log en semana 24
RP	Respuesta parcial	RNA-VHC se reduce > 2 log en semana 24 pero nunca indetectable
	Recaída virológica	Respuesta viral a final de tratamiento pero reaparición ulterior del RNA-VHC
	Rebote viral	RNA-VHC detectable en cualquier momento durante el tratamiento después de haber sido indetectable

En el año 2011 se autorizó el uso de telaprevir (TVR) y boceprevir (BOC) para la infección por el VHC de genotipo 1. Estos dos fármacos son antivirales de acción directa (AAD) de primera generación, y ambos van dirigidos a la serina proteasa NS3/4A del VHC, por lo que se les denomina inhibidores de proteasa (IP). Tanto TVR como BOC deben administrarse en combinación con IFN-peg/RBV. Estas pautas de terapia triple han resultado eficaces en pacientes que no han recibido tratamiento

previo y en pacientes que ya han sido tratados, incluidos los pacientes sin ninguna respuesta previa a la terapia doble de IFN-peg/ RBV.

El 28 de febrero de 2012 el Departamento de Medicamentos de Uso Humano del Ministerio de Sanidad publicó un informe de utilidad terapéutica sobre los criterios y recomendaciones generales para el tratamiento con BOC y TVR de la hepatitis crónica C en pacientes monoinfectados (75). La introducción de la triple terapia que incluye, además de INF-peg y RBV un AAD puede permitir que se alcance una tasa de curación del 75% en enfermos infectados con genotipo 1 que no hayan recibido tratamiento alguno y de cerca del 50% en los que no hayan presentado respuesta a un tratamiento doble previo. La triple terapia tiene una eficacia superior a la del tratamiento clásico pero ocasiona más efectos adversos e implica la necesidad de una evaluación más minuciosa y un seguimiento más frecuente de los pacientes en tratamiento.

En noviembre de 2014 la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios hizo públicos los Informes de Posicionamiento Terapéutico de dos nuevos antivirales: Simeprevir (SMV) y el Sofosbuvir (SOF) (76,77).

SMV ha sido aprobado para el tratamiento de la hepatitis C crónica en adultos. Se trata de un inhibidor de la proteasa NS3/4A, esencial para la replicación viral, utilizado en combinación con otros fármacos activos frente al VHC en función del genotipo. SMV es activo frente a los genotipos 1, 4, 5 y 6. Su eficacia en pacientes infectados con los genotipos 5 y 6 no ha sido estudiada en ensayos clínicos, por lo que no debe utilizarse en estos pacientes.

Las **tablas 6 y 7** muestran los medicamentos concomitantes recomendados y la duración del tratamiento para la terapia combinada con SMV, y las reglas de parada, respectivamente.

Tabla 6: Medicamentos concomitantes recomendados y duración del tratamiento para la terapia combinada con SMV

Población de pacientes	Tratamiento	Duración
Pacientes no tratados previamente (naïve) y con recidiva previa con VHC genotipo 1 ó 4 ¹	OLYSIO + peginterferón alfa + ribavirina ²	24 semanas ³ El tratamiento con OLYSIO se debe iniciar en combinación con peginterferón alfa y ribavirina y ser administrado durante 12 semanas y posteriormente continuar durante 12 semanas adicionales con peginterferón alfa y ribavirina.
Pacientes sin respuesta previa (incluidos los pacientes que hayan tenido una respuesta parcial o nula) con VHC genotipo 1 ó 4 ¹	OLYSIO + peginterferón alfa + ribavirina ²	48 semanas El tratamiento con OLYSIO se debe iniciar en combinación con peginterferón alfa y ribavirina y ser administrado durante 12 semanas y posteriormente continuar durante 36 semanas adicionales
Pacientes con VHC genotipo 1 ó 4, independientemente del historial de tratamiento previo ⁴	OLYSIO + sofosbuvir (+/- ribavirina) ⁵	12 semanas (ver secciones 4.4, 4.8 y 5.1)

¹ Incluye a pacientes con o sin cirrosis y aquellos pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Recidiva o sin respuesta a un tratamiento previo con interferón (pegilado o no pegilado), con o sin ribavirina (ver sección 5.1).

² Cuando se valore utilizar un tratamiento combinado de OLYSIO con peginterferón alfa y ribavirina en los pacientes con VHC genotipo 1a, antes de comenzar el tratamiento se debe realizar un test de identificación del polimorfismo Q80K en NS3 (ver sección 4.4).

³ Los pacientes no tratados previamente (naïve) y con recidiva previa con cirrosis que están coinfectados con el VIH deben recibir 48 semanas de tratamiento. El tratamiento con OLYSIO se debe iniciar en combinación con peginterferón alfa y ribavirina y ser administrado durante 12 semanas y posteriormente continuar durante 36 semanas adicionales con peginterferón alfa y ribavirina. Ver sección Poblaciones especiales de pacientes - Coinfección por el VHC y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).

⁴ Incluye a pacientes no tratados previamente (naïve) o pacientes que fracasaron a un tratamiento previo con peginterferón alfa y ribavirina con o sin cirrosis.

⁵ El tratamiento de OLYSIO con sofosbuvir solamente se debe utilizar en pacientes que no toleran o no son candidatos al tratamiento con interferón, y tienen una necesidad de tratamiento urgente. Se puede añadir ribavirina en base a la evaluación clínica individual de cada paciente (ver secciones 4.4, 4.8 y 5.1). La duración del tratamiento recomendada es de 12 semanas. Se puede valorar una duración de tratamiento de OLYSIO con sofosbuvir (con o sin ribavirina) más larga (hasta 24 semanas) en base a las características individuales (ver secciones 4.4, 4.8 y 5.1).

Tabla 7: Pautas de parada del tratamiento

ARN del VHC	Medida
Semana 4 de tratamiento: ≥ 25	Interrupción de simeprevir, peginterferón alfa y ribavirina
Semana 12 de tratamiento: detectable	Interrupción del peginterferón alfa y la ribavirina (el tratamiento con simeprevir está completo en la semana 12)
Semana 24 de tratamiento: detectable	Interrupción del peginterferón alfa y la ribavirina

El SOF ha sido autorizado para el tratamiento de la hepatitis C crónica en adultos en combinación con otros fármacos activos frente al VHC en función del genotipo. Es un inhibidor nucleótido de la polimerasa NS5B. En la Tabla 8 se recogen los medicamentos recomendados para la administración concomitante y duración del tratamiento para la terapia combinada con SOF.

Tabla 8: Medicamentos recomendados para la terapia combinada con SOF y duración del tratamiento

Población de pacientes*	Tratamiento	Duración
Genotipos 1, 4, 5 ó 6	Sofosbuvir + ribavirina + peginterferón alfa	12 semanas ^{a, b}
	Sofosbuvir + ribavirina Solo para uso en pacientes que no son candidatos o no toleran el tratamiento con peginterferón alfa	24 semanas
Genotipo 2	Sofosbuvir + ribavirina	12 semanas ^b
Genotipo 3	Sofosbuvir + ribavirina + peginterferón alfa	12 semanas ^b
	Sofosbuvir + ribavirina	24 semanas
Pacientes en lista de espera de trasplante hepático	Sofosbuvir + ribavirina	Hasta el trasplante hepático ^c (mínimo 12 semanas)
	Sofosbuvir + ribavirina + peginterferón alfa**	12 semanas ^{a, b}

a. Para pacientes con tratamiento previo e infección por el VHC de genotipo 1 y 4-6, no existen datos con la combinación de sofosbuvir, ribavirina y peginterferón.

b. Se debe contemplar la posible ampliación de la duración del tratamiento más allá de 12 semanas y hasta 24 semanas especialmente para los subgrupos que tienen uno o más factores históricamente asociados a menores tasas de respuesta a los tratamientos con interferón (p. ej. fibrosis/cirrosis avanzada, elevadas concentraciones virales basales, raza negra, genotipo IL28B no CC, previa respuesta nula al tratamiento con peginterferón alfa y ribavirina).

c. Ver "Poblaciones especiales de pacientes. Pacientes en espera de trasplante hepático" más adelante.

4 JUSTIFICACIÓN

Los motivos que nos llevaron a desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral fueron:

- La hepatitis C se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en el mundo occidental.
- La evolución de la infección es, en la mayoría de los casos, silenciosa hacia la cronicidad y posible aparición de complicaciones tales como cirrosis o cáncer de hígado.
- El diagnóstico precoz de la infección activa es importante para poder prevenir las posibles complicaciones de la infección.
- Los test virológicos que se emplean tanto para diagnosticar la infección como para controlar la respuesta al tratamiento, aunque son sensibles y muy específicos, son complejos, requieren un espacio dedicado específicamente a esas técnicas, son lentos a pesar de estar automatizados, requieren personal cualificado y suponen un alto coste.
- La presencia de antígeno del core del VHC en sangre es considerado por algunos autores como un marcador fiable (aunque menos sensible que la detección de ARN viral) de replicación viral. El antígeno core del VHC en sangre, aparece 1-2 días después que el ARN y sus variaciones suelen ser paralelas a las del ARN a lo largo de la infección aguda y crónica (49,50). Además, a diferencia de la presencia de anticuerpos anti-VHC, el antígeno del core del VHC se puede detectar durante el periodo de ventana serológica de la infección y permite diagnosticar la infección activa.
- Hasta la fecha los métodos desarrollados para la detección de antígeno del core del VHC no han sido útiles en la práctica clínica.

- La aparición del ensayo ARCHITECT HCV Ag® para la detección de antígeno del core del VHC podría suponer, según algunos autores, un cambio en el enfoque diagnóstico de la infección por el VHC ya que, respecto a los métodos de amplificación de ARN, es un método más barato, rápido y no requiere una cualificación especial del personal.

5 OBJETIVO

El objetivo de nuestro trabajo es evaluar la utilidad del ensayo ARCHITECT HCV Ag[®], diseñado para la detección del antígeno core del VHC, en el diagnóstico y/o control del tratamiento de la hepatitis C empleando muestras clínicas.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aprobación de los laboratorios

El primer paso que se llevó a cabo fue contactar con las Dras. Rosa Blázquez y María Dolores Crespo, Jefas de Servicio de los Laboratorios de Microbiología del Hospital General Universitario Morales Meseguer de Murcia y del Hospital General Universitario de Albacete respectivamente. Tras discutir el Plan de Investigación, el Plan de Trabajo quedó debidamente firmado en junio de 2014 (Anexo I). En dicho plan de trabajo se estableció que se emplearían muestras del laboratorio de Microbiología del Hospital Morales Meseguer para realizar la detección del antígeno core del VHC en Laboratorio de Microbiología del Hospital General Universitario de Albacete dado que este último laboratorio disponía del equipo necesario para el estudio que se quería realizar (detección de antígeno core del VHC con el sistema ARCHITECH).

6.2 Consideraciones éticas

Se emplearon muestras anonimizadas. En el momento de la recogida de las alícuotas necesarias para el estudio se rompió toda relación entre el código que se le asigna a la muestra y los datos personales del paciente, por tanto, los resultados del estudio realizado no tuvieron ninguna repercusión para los pacientes.

6.3 Recogida y almacenamiento de muestras

Se seleccionaron 300 alícuotas de suero de pacientes con al menos una petición de carga viral de VHC solicitada entre los meses de junio y diciembre de 2013. Todos los pacientes pertenecían al Área de Salud del Hospital General Universitario Morales Meseguer.

Las muestras se recogieron según el protocolo habitual establecido en el Laboratorio de Microbiología del Hospital General Universitario Morales Meseguer.

Generalmente, los pacientes que presentan anticuerpos anti-VHC son derivados a las consultas de atención especializada de Enfermedades Infecciosas o Digestivo para su seguimiento. A todos estos pacientes se les realiza, entre otras pruebas, un estudio de carga viral de VHC. La muestra necesaria para tal estudio debe ser recogida en tubos con aspiración por vacío de 10 ml de sangre anticoagulada con EDTA. Estas muestras son recepcionadas en el laboratorio del mismo hospital donde se extraen y se mantienen refrigeradas hasta ser procesadas para el estudio solicitado (cuantificación de carga viral de VHC). El procesamiento de las muestras incluye centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos y cuantificación de la carga viral.

Los sueros se mantuvieron un máximo de 5 días refrigerados entre 2-8°C y, tras la cuantificación de la carga viral se almacenaron a -70°C.

6.4 Transporte de muestras

Para el envío de las muestras al Hospital General Universitario de Albacete, éstas se prepararon y etiquetaron de acuerdo con las normativas vigentes que rigen el transporte de muestras y sustancias infecciosas. Utilizamos el Diagrama de flujo para la clasificación de sustancias infecciosas y muestras de pacientes (**FIGURA 15**) disponible en la Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2013–2014 para ver a que categoría pertenecían nuestras muestras y transportarlas correctamente (78).

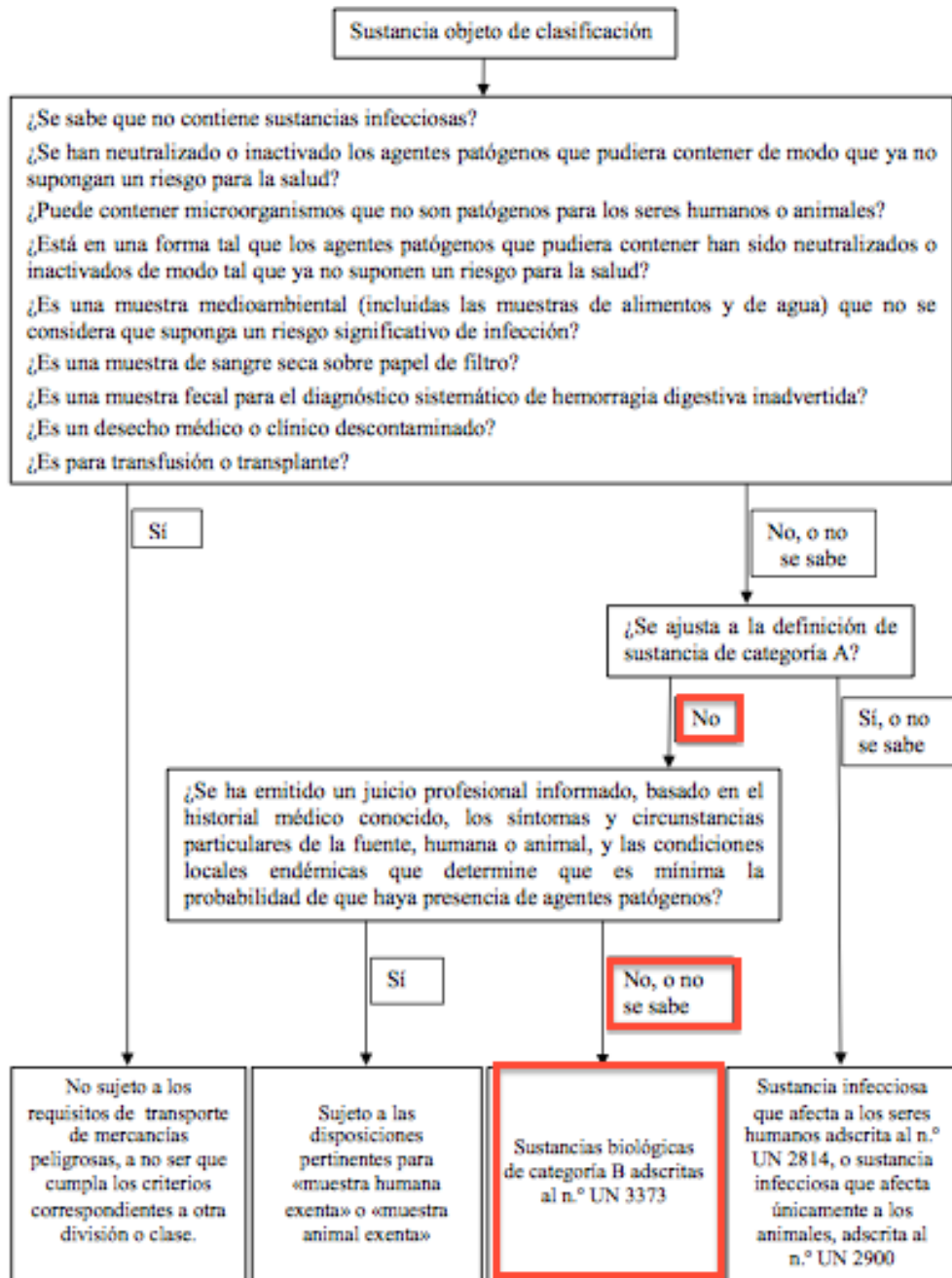


FIGURA 15: Diagrama de flujo para la clasificación de sustancias infecciosas y muestras de pacientes (OMS)

Las muestras se transportaron a una temperatura entre 2 y 8°C (hielo) y, a su llegada al Laboratorio de Microbiología del Hospital General Universitario de Albacete, se dejaron a temperatura ambiente hasta su completa descongelación. Antes de ser procesadas, se centrifugaron 10 minutos a 3.000 rpm. En todos los casos se evitaron más de dos ciclos de congelación/descongelación.

6.5 Cuantificación de la carga viral

Para la detección de la carga viral se utilizó el ensayo COBAS® AmpliPred/COBAS® Taqman® HCV Quantitative Test v2.0 (Roche)(79). Es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos para la determinación cuantitativa de los genotipos 1 a 6 del ARN del VHC en suero o plasma conservado en EDTA mediante el equipo COBAS® AmpliPrep (procesamiento automatizado de muestras) y el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 (amplificación y la detección automatizadas).

Las muestras recién obtenidas (sangre total) se pueden almacenar a una temperatura de entre 2 y 25 °C durante un máximo de 24 horas antes de la centrifugación. Después de la centrifugación, hay que transferir el suero o plasma conservado en EDTA a un tubo de polipropileno estéril y se pueden almacenar a 4°C durante un máximo de 72 horas o a -20°C -80°C durante un máximo de 6 semanas. Las muestras se pueden congelar y descongelar hasta cinco veces sin que haya una pérdida del ARN del VHC.

El ensayo está diseñado para el uso en el tratamiento de pacientes con hepatitis C crónica en combinación con marcadores de infección clínicos y de laboratorio. La prueba puede utilizarse para predecir la probabilidad de una RVS de forma temprana durante el curso de un tratamiento antiviral y para evaluar la respuesta viral a un tratamiento antiviral (tratamiento guiado por la respuesta) a través de la determinación de cambios en los niveles de ARN del VHC.

El ensayo COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 se basa en tres procesos principales:

1. Preparación manual de la muestra para aislar el ARN del VHC.
2. Transcripción inversa del ARN objetivo para generar ADN complementario (ADNc) y amplificación mediante PCR del ADNc objetivo.

3. Detección simultánea de sondas de detección oligonucleótidas doblemente marcadas, escindidas y específicas del fragmento objetivo.

Preparación de las muestras

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 utiliza la preparación automatizada de la muestra en el equipo COBAS® AmpliPrep mediante una técnica de captura basada en sílice. El volumen de muestra necesario es de 650 µl.

En primer lugar se lleva a cabo la lisis de las partículas víricas del VHC mediante incubación de la muestra a alta temperatura junto a:

- Tampón de lisis/unión
- Proteasas
- Micropartículas magnéticas
- Un número conocido de moléculas de ARN del estándar de cuantificación (QS) del VHC.

Las proteasas y el tampón de lisis/unión permiten liberar los ácidos nucleicos y proteger al ARN del VHC liberado de las RNasas presentes en el suero o el plasma conservado en EDTA. El ARN del VHC y el ARN del QS del VHC quedan unidos a la superficie de las micropartículas magnéticas. Las sustancias no unidas, tales como sales, proteínas y otras impurezas celulares, se eliminan mediante el lavado de las micropartículas magnéticas.

Tras la separación de las partículas y la completa realización de los pasos de lavado, se hacen eluir los ácidos nucleicos adsorbidos a temperatura elevada con una solución acuosa (muestra procesada).

A continuación se añade la muestra procesada, que contiene el ARN del VHC y el ARN del QS del VHC liberados, a la mezcla de amplificación y se transfiere al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48.

Transcripción inversa y amplificación mediante PCR

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 utiliza la transcripción inversa del ARN del VHC al ADNc y la amplificación del ADNc con cebadores (primers) que definen una secuencia en la región muy conservada de la región no traducida 5' del genoma del VHC. La transcripción inversa y la reacción de amplificación mediante PCR se lleva a cabo con una mezcla optimizada de enzimas recombinantes termoestables: las polimerasas de ADN Z05D y Z05. En presencia de manganeso (Mn^{2+}) y bajo condiciones de tampón apropiadas, Z05 y Z05D exhiben actividad tanto de transcriptasa inversa como de polimerasa de ADN. Esto permite que la transcripción inversa y la amplificación mediante PCR tengan lugar junto con la detección en tiempo real de los amplicones.

Amplificación del fragmento objetivo

Tras la transcripción inversa del ARN objetivo del VHC y el ARN del QS del VHC, el termociclador del analizador COBAS® TaqMan® o del analizador COBAS® TaqMan® 48 calienta la mezcla de reacción para desnaturalizar el híbrido ARN:ADNc y exponer las secuencias objetivo específicas del cebador. A medida que la mezcla se enfría, los cebadores se hibridan con el ADNc del fragmento objetivo. Las polimerasas de ADN termoestables (Z05 y Z05D), en presencia de Mn^{2+} y un exceso de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), extienden los cebadores hibridados a lo largo de la plantilla objetivo para producir una molécula de ADN bicatenario denominada amplicón. Este proceso se repite automáticamente durante 48 ciclos con el fin de duplicar en cada ciclo la cantidad de ADN amplicón.

Amplificación selectiva

La amplificación selectiva del ácido nucleico del fragmento objetivo de la muestra se logra en la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV

Quantitative v2.0 mediante el uso de la enzima AmpErase (uracil-N- glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP).

La enzima AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no del ADN que contiene desoxitimidina. El ADN natural carece de desoxiuridina que, sin embargo, está siempre presente en el amplicón debido al uso de trifosfato de desoxiuridina como uno de los dNTPs del reactivo de la mezcla maestra; por lo tanto, sólo el amplicón contiene desoxiuridina.

La desoxiuridina permite que la enzima AmpErase pueda destruir el amplicón contaminante antes de la amplificación del ADN del fragmento objetivo. Además, la enzima AmpErase destruye cualquier producto inespecífico que se pueda formar tras la activación inicial de la mezcla maestra por el manganeso. Cuando se calienta en el primer paso del ciclo térmico, la cadena de ADN amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, por lo que el ADN ya no puede amplificarse. La enzima AmpErase permanece inactiva durante un período de tiempo prolongado una vez expuesta a temperaturas superiores a los 55 °C, es decir, durante los pasos de la ciclación térmica y, por consiguiente, no destruye el amplicón objetivo formado durante la reacción de PCR.

Detección de sondas escindidas y doblemente marcadas y determinación cuantitativa del ARN del HCV

La prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 utiliza la tecnología de PCR en tiempo real. El uso de sondas doblemente marcadas con fluorescente permite detectar en tiempo real la acumulación del producto de la PCR mediante la supervisión de la intensidad de emisión de los marcadores emisores fluorescentes liberada durante el proceso de amplificación. Las sondas constan de sondas oligonucleótidas específicas para el VHC y el QS del VHC con un marcador emisor (reporter dye) y un marcador silenciador (quencher dye). Las sondas del VHC y del QS del VHC están marcadas con diferentes marcadores emisores fluorescentes. Cuando las sondas están intactas, la proximidad del marcador silenciador suprime la

fluorescencia del marcador emisor debido a efectos de transferencia de energía de tipo Förster. Durante la PCR, la sonda se hibrida con una secuencia del fragmento objetivo y se escinde por la actividad de las nucleasas 5' → 3' de las polimerasas de ADN Z05 y Z05D termoestables. Cuando se han liberado y separado el marcador emisor y el marcador silenciador, cesa el enmascaramiento (quenching) y la actividad fluorescente del marcador emisor experimenta un aumento. La amplificación del ARN del VHC y el ARN del QS del VHC se miden de forma independiente a distintas longitudes de onda. Este proceso se repite durante los 48 ciclos predeterminados, aumentando en cada ciclo la intensidad de emisión de los marcadores emisores individuales, lo que permite la identificación independiente del ARN del VHC y el QS del VHC. El ciclo de la PCR en el que la curva de crecimiento adquiere forma exponencial está relacionado con la cantidad de material de partida presente al inicio de la PCR.

La cuantificación del ARN vírico del VHC se realiza empleando el QS del VHC. El estándar compensa los efectos de inhibición y controla los procesos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más exacta del ARN del VHC presente en cada muestra. El QS del VHC es un constructo de Armored RNA (aRNA) no infeccioso que contiene fragmentos de las secuencias del VHC con sitios de unión a cebadores idénticos a los del ARN objetivo del VHC y una región exclusiva de unión a sonda que permite diferenciar el amplicón del QS del VHC del amplicón del HCV objetivo.

El QS del VHC se añade a cada una de las muestras en un número de copias conocido y está presente durante la preparación de las muestras, la transcripción inversa y la amplificación mediante PCR y la detección de las sondas de detección oligonucleótidas doblemente marcadas y escindidas. El analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 calcula la concentración de ARN de VHC presente en las muestras de prueba comparando la señal del VHC con la señal del QS del VHC para cada muestra y control.

Durante la fase de hibridación de la PCR en el analizador COBAS® TaqMan® o en el analizador COBAS® TaqMan® 48, las muestras se iluminan y excitan con luz filtrada, lo que permite recoger los datos de emisión de fluorescencia filtrada correspondientes a cada muestra. El equipo envía esas lecturas de fluorescencia al programa AMPLILINK y las almacena en una base de datos. Se utilizan comprobaciones previas para determinar si los datos de ARN del VHC y ARN del QS del VHC constituyen conjuntos válidos; asimismo, se generan avisos cuando los datos estén fuera de límites prefijados. Una vez completadas y superadas todas las comprobaciones previas, las lecturas de fluorescencia se procesan para generar valores correspondientes al ARN del VHC y el ARN del QS del VHC. La concentración de ARN del VHC se expresa en unidades internacionales (UI)/ml y la duración del ensayo es de unas 4 horas.

Los resultados de las muestras se interpretan como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de los resultados (Roche Diagnostics)

Resultado	Interpretación
Target Not Detected	El valor de Ct para el HCV está por encima del límite para el ensayo o no se ha obtenido un valor de Ct para el HCV. Comunique el resultado como "ARN del HCV no detectado".
<1.50E+01 IU/mL	Las UI/ml calculadas están por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo. Comunique el resultado como "ARN del HCV detectado, menos de 15 UI/ml de ARN del HCV".
≥1.50E+01 IU/mL y ≤1.00E+08 IU/mL	Los resultados calculados superiores o iguales a 15 UI/ml e inferiores o iguales a 1,00E+08 UI/ml se encuentran dentro del intervalo lineal del ensayo. Comunique el resultado como "XX UI/ml de ARN del HCV detectado".
>1.00E+08 IU/mL	Los resultados calculados están por encima del intervalo lineal del ensayo. Comunique el resultado como "más de 1,00E+08 UI/ml de ARN del HCV". Si desea obtener resultados cuantitativos, diluya la muestra original con plasma conservado en EDTA o suero humano negativo para el HCV (según la matriz de la muestra original) y repita la prueba. Multiplique el resultado comunicado por el factor de dilución.

Según los datos del fabricante el ensayo tiene una sensibilidad y especificidad del 100%.

6.6 Detección de antígeno core del VHC

Para la detección del antígeno core del VHC se utilizó el ensayo ARCHITECT HCV Ag (Abbott Diagnostics), un inmunoanálisis de 2 pasos que utiliza la tecnología CMIA con protocolos de ensayos flexibles, denominados Chemiflex, para la determinación cuantitativa del antígeno core del virus de la hepatitis C.

El volumen de muestra necesario es de 110 µl y el tiempo de realización de la prueba son 36 minutos. Con el ensayo ARCHITECT HCV Ag se pueden utilizar los siguientes tipos de muestras:

- Suero humano (incluyendo el suero recogido en tubos con separador de suero)
- Plasma humano recogido con: EDTA sódico, EDTA potasio , Heparina de litio, Heparina sódica, Citrato sódico o CPD.

Con anticoagulantes líquidos, los valores de los resultados obtenidos en las distintas muestras de pacientes pueden ser inferiores debido a su efecto de dilución.

No se recomienda utilizar muestras en las siguientes condiciones:

- inactivadas con calor
- mezcladas
- intensamente hemolizadas
- con contaminación microbiana evidente
- procedentes de cadáveres o de otros líquidos corporales

Para obtener resultados óptimos, las muestras de suero y plasma no deben presentar fibrina, eritrocitos ni partículas en suspensión. Estas muestras pueden proporcionar resultados inconsistentes y, por tanto, se deben transferir a un tubo de centrífuga y centrifugar mínimo a 3.000 x g durante 10 minutos.

Las muestras se pueden almacenar con o sin el coágulo, los eritrocitos o el gel separador durante un máximo de 5 días a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

Si el análisis se retrasa más de 5 días, hay que retirar el coágulo, los eritrocitos o el gel separador del suero o plasma, y congelarlo a una temperatura igual o inferior a -20 °C. No se recomienda someter las muestras a más de 2 ciclos de congelación/descongelación.

La técnica ARCHITECT HCV Ag se lleva a cabo en tres fases:

1. Fase de pretratamiento (FIGURA 16): Se combinan la muestra con los reactivos de pretratamiento (HCl 0,83 N) para liberar el antígeno core del VHC y obtener la muestra pretratada.

Fase de Pretratamiento: la muestra y los reactivos de pre-tratamiento son incubados.

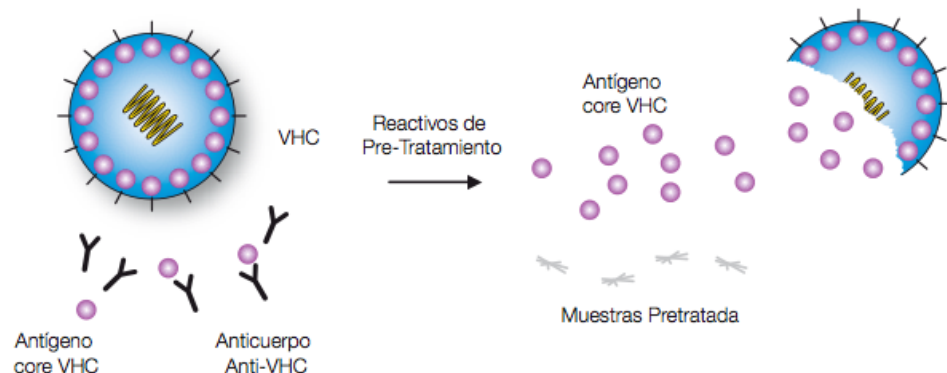


FIGURA 16: Fase pretratamiento (Abbott Diagnostics)

2. Paso 1 (FIGURA 17): la muestra pretratada se combina con las micropartículas recubiertas con anticuerpo anti-VHC de forma que el antígeno core se une a los anticuerpo anti-VHC.

Paso 1: Incubación de las micropartículas revestidas de anticuerpos monoclonales anti-VHC y de la muestra pre-tratada.

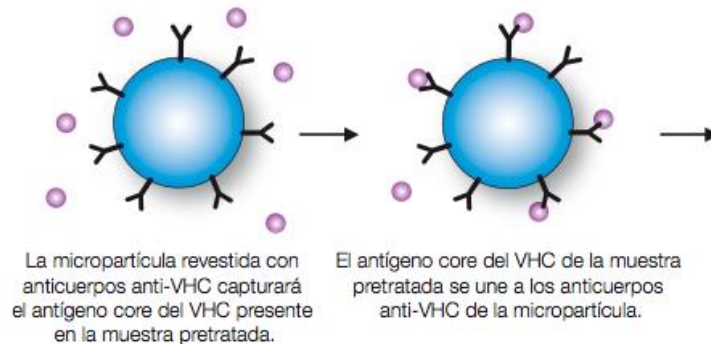


FIGURA 17: Paso 1 (Abbott Diagnostics)

3. Paso 2 (FIGURA 18): Se añade anticuerpos anti-VHC marcados con acridinio y estos se unen al antígeno core del VHC. Las soluciones pre-activadora y activadoras son añadidas para producir una reacción quimioluminiscente, que se mide en unidades relativas de luz (URL). Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de antígeno del VHC presente en la muestra y las URL detectadas por el sistema óptico del ARCHITECT *i* System.

Paso 2: Adición del anticuerpo anti-VHC marcado con acridinio y posterior generación de la señal.

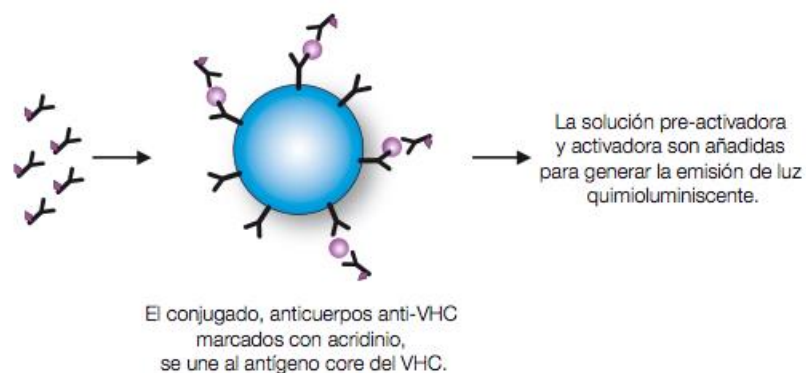


FIGURA 18: Paso 2 (Abbott Diagnostics)

La concentración de antígeno core de la hepatitis C en la muestra se determina mediante una curva de calibración ARCHITECT HCV Ag que ha sido generada

previamente. Si la concentración de la muestra es mayor o igual a 3,00 fmol/l, la muestra se considera reactiva para el antígeno del VHC.

Según los datos del fabricante el ensayo tiene una sensibilidad del 97,8% del y una especificidad mayor de 99,5%.

6.7 Estudio estadístico

Los datos se recogieron en una base de datos EXCEL, Microsoft Office 97, diseñada para tal fin y el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 18.0.

6.7.1 Validación de la técnica ARCHITECT Ag HCV

Para la construcción de la tabla de contingencia se consideró la carga viral como el método “gold standard” del diagnóstico de hepatitis C y esta variable se categorizó en tres grupos: carga viral no detectada (0 UI/ml), carga viral indetectable (≤ 15 UI/ml) y carga viral detectable (>15 UI/ml). La detección del antígeno core del VHC se categorizó en dos grupos: muestras reactivas (>3 fmol/l) y muestras no reactivas (≤ 3 fmol/l).

A partir de esta tabla de contingencia se calcularon los índices de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del ensayo ARCHITECT HCV Ag junto a sus intervalos de confianza del 95%. Para conocer cuanto más frecuente es un resultado positivo o negativo entre los infectados que entre los no infectados se calcularon los coeficientes de probabilidad positivo y negativo respectivamente. Atendiendo a los criterios que aparecen en la FIGURA 19 se interpretó el valor de dichos coeficientes.

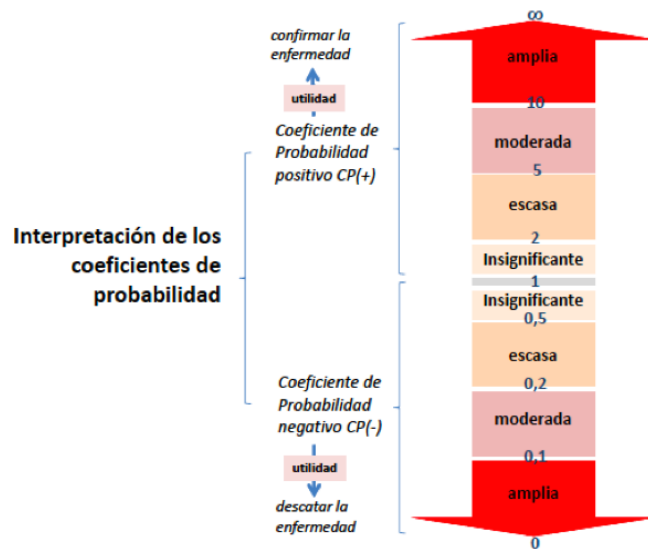


FIGURA 19: Interpretación de los coeficientes de probabilidad

6.7.2 Curva ROC

Los valores de carga viral indetectable (≤ 15 UI/ml) no se tuvieron en cuenta y se consideraron “casos perdidos”.

La curva ROC se obtuvo representando la sensibilidad en función de los falsos positivos (1-especificidad) de la prueba diagnóstica, donde cada punto de la curva representa un par sensibilidad/(1-especificidad) correspondiente a un nivel de decisión determinado.

6.7.3 Estudio de correlación

Los valores de carga viral indetectable (≤ 15 UI/ml) no se tuvieron en cuenta y se consideraron “casos perdidos”.

Para visualizar de forma más directa e intuitiva el tipo de relación existente entre las variables, carga viral y antígeno core del VHC, se llevó a cabo la transformación de los datos empleando la raíz cuadrada con el fin de matizar la difusión de la variable, y se realizó un gráfico de dispersión colocando la variable

antígeno core del VHC en el eje de abscisas y la variable carga viral en el de ordenadas.

Teniendo en cuenta el Teorema del Límite Central consideramos que las variables en estudio seguían una distribución normal ($n= 300$; $n>30$) y los datos se analizaron empleando una prueba paramétrica como es el coeficiente de correlación de Pearson.

6.7.4 Análisis de regresión lineal

Utilizamos el modelo lineal de regresión para predecir el nivel de carga viral (variable independiente, X_i) a partir de la cuantificación del antígeno core del VHC (variable dependiente, Y_i) detectado en una muestra de suero. Este modelo viene dado por la ecuación de una recta:

$$Y_i = B_0 + B_1 X_i$$

Siendo el coeficiente B_1 la pendiente de la recta y B_0 el punto en que la recta corta el eje vertical.

Las pruebas paramétricas utilizadas fueron la *t de Student* y el ANOVA de regresión. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

6.7.5 Comparación de medias

Se crearon 3 grupos en función de la carga viral obtenida y se calculó el valor medio del antígeno core del VHC en cada uno de ellos:

Grupo 1: carga viral $<10^2$ UI/ml

Grupo 2: carga viral entre 10^2 y 10^6 UI/ml

Grupo 3: carga viral $>10^6$ UI/ml

Se utilizó el test de ANOVA para comparar las medias entre grupos. Un valor $p \leq 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se representaron utilizando un diagrama de cajas.

6.8 Bibliografía

Como gestor bibliográfico se ha utilizado un programa de software libre para la gestión de referencias bibliográficas llamado Zotero.

7 RESULTADOS

Se realizó un estudio transversal seleccionando una muestra de pacientes representativa de la situación real en la que se aplicaron las pruebas de cuantificación de la carga viral del VHC. Estas pruebas se aplican a pacientes con presencia de anticuerpos anti-VHC o sospecha de hepatitis. Se estudiaron 300 muestras de suero sanguíneo. En todas las muestras se determinó la carga viral de VHC y se cuantificó el antígeno core del VHC, siendo estas las dos variables recogidas para el estudio:

1. Variable 1: carga viral del VHC (UI/ml)
2. Variable 2: antígeno core del VHC (fmol/l)

7.1 Validez de la técnica ARCHITECT Ag HCV

La validación de la técnica se realizó definiendo el ensayo de detección de carga viral como la técnica “gold standard” para clasificar a los pacientes en dos grupos:

- Pacientes infectados: aquellos que tenían una carga viral >15 UI/ml.
- Pacientes no infectados: aquellos que tenían una carga viral no detectada o ≤ 15 UI/ml.

En la Tabla **10** se recogen los resultados de la técnica ARCHITECT Ag HCV aplicada a los pacientes con y sin infección.

Tabla 10: Tabla de contingencia carga viral y antígeno core del VHC

ANTIGENO CORE DEL VHC	CARGA VIRAL (UI/ml)			TOTAL
	NO INFECTADOS		INFECTADOS	
	CV = 0	CV \leq 15	CV > 15	
> 3 fmol/ml	1 (FP)	2 (FP)	126 (VP)	129
\leq 3 fmol/ml	142 (VN)	14 (VN)	15 (FN)	171
TOTAL	159		141	300

Entre los resultados obtenidos encontramos:

- Verdaderos positivos (VP): pacientes infectados diagnosticados como infectados con la técnica ARCHITECT Ag HCV.
- Verdaderos negativos (VN): pacientes sanos diagnosticados como no infectados con la técnica ARCHITECT Ag HCV.
- Falsos positivos (FP): pacientes sanos diagnosticados como infectados con la técnica ARCHITECT Ag HCV.
- Falsos negativos (FN): pacientes enfermos diagnosticados como no infectados con la técnica ARCHITECT Ag HCV.

De los 300 sueros analizados, 159 no estaban infectados con VHC y 141 si lo estaban. De los 159 sueros no infectados, 156 obtuvieron un valor de antígeno core del VHC ≤ 3 fmol/l y sólo 3 sueros obtuvieron un resultado de antígeno > 3 fmol/l (Tabla 11). Un volumen insuficiente de muestra nos impidió llevar a cabo la recomendación del fabricante de analizar por duplicado las muestras con valores de concentración entre 3 y 10 fmol/l.

Tabla 11: Sueros no infectados con un resultado de antígeno core del VHC > 3 fmol/l

	Carga viral (UI/ml)	Antígeno core VHC (fmol/l)
Suero 1	0	6
Suero 2	15	4,48
Suero 3	15	4,08

De los 141 sueros infectados, 126 obtuvieron un valor de antígeno > 3 fmol/l y 15 obtuvieron un valor ≤ 3 fmol/l. De los 15 sueros infectados con un valor de antígeno ≤ 3 fmol/l, 12 muestras presentaron valores de carga viral inferiores o iguales a 737 UI/ml y 3 presentaron una mayor carga viral (Tabla 12).

Tabla 12: Sueros infectados con un valor de antígeno ≤ 3 fmol/l

	Carga viral (UI/ml)	Antígeno core VHC (fmol/l)
Suero 1	37828,00	0
Suero 2	34450,98	1,34
Suero 3	6377,23	0,63
Suero 4	737,22	1,25
Suero 5	231,92	0
Suero 6	199,11	0,47
Suero 7	133,56	0
Suero 8	105,67	0,24
Suero 9	105,67	0
Suero 10	76,38	1,15
Suero 11	73,12	1,97
Suero 12	105,67	0
Suero 13	61,49	0,33
Suero 14	20,11	1,29
Suero 15	17,05	1,7

Como se observa en la Tabla **12** las cargas virales de los sueros en los que la detección de antígeno core del VHC fue ≤ 3 fmol/l fueron mayoritariamente inferiores a 750 UI/ml. Solo tres cargas virales resultaron más elevadas con valores de 6377, 34450 y 37828 UI/ml.

Al trabajar con muestras anonimizadas no fue posible consultar la historia clínica de estos pacientes.

Las cargas virales $\geq 52671,43$ UI/ml (121/300) dieron positiva la detección antígeno core del VHC. De las muestras con un resultado de carga viral entre 15 UI/ml y 52671,43 (20/300), 15 muestras son las que aparecen en la Tabla **12** y las otras 5 dieron un valor de antígeno core del VHC >3 fmol/l con los siguientes valores de carga

viral: 509, 2217, 18898, 24634 y 36803 UI/ml (Tabla 13).

Tabla 13: Sueros infectados con carga viral entre 15 y 52671,43 UI/ml

	Carga viral (UI/ml)	Antígeno core del VHC (fmol/l)
Suero 1	36803,22	197,79
Suero 2	24634,55	10986,75
Suero 3	18898,37	34,74
Suero 4	2217,22	12,7
Suero 5	509,4	692,65

A partir de los datos de la Tabla 10 se obtuvieron los índices de sensibilidad (S), especificidad (E) y valores predictivos de la técnica ARCHITECT Ag HCV junto a sus correspondientes intervalos de confianza del 95% que se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Índices de exactitud de la técnica ARCHITECT Ag HCV.

Índice (fórmula matemática)	Valor estimado	Intervalo de confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Sensibilidad (VP/VP+FN)	0,89	0,85	0,95
Especificidad (VN(VN+FP))	0,98	0,96	1
VPP (VP/VP+FP)	0,98	0,95	1
VPN (VN/VN+FN)	0,91	0,88	0,96

VPP: valor predictivo positivo VPN: valor predictivo negativo

7.2 Rendimiento de la técnica

A partir de los valores de S y E se calcularon los coeficientes de probabilidad positivo (CPP) y negativo (CPN) (Tabla 15).

Tabla 15: Coeficientes de probabilidad

CPP (S/1-E)	47,36	15,42	145,49
CPN (1-S/E)	0,11	0,07	0,18

7.3 Curva ROC

La curva ROC (FIGURA 20) muestra que la técnica diagnóstica ARCHITECT HCV Ag tiene una alta capacidad de discriminación, con un área bajo la curva de 0,969 (Tabla 16). El punto de corte que maximizaría la capacidad de diagnóstico de la técnica fue de 6,21 (Tabla 17).

Tabla 16: Parámetros curva ROC

Variables resultado de contraste	Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
RaizCuadrada_Antigeno	,969	,011	,000	,947	,990

La variable (o variables) de resultado de contraste: Raiz Cuadrada_Antígeno tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados .

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

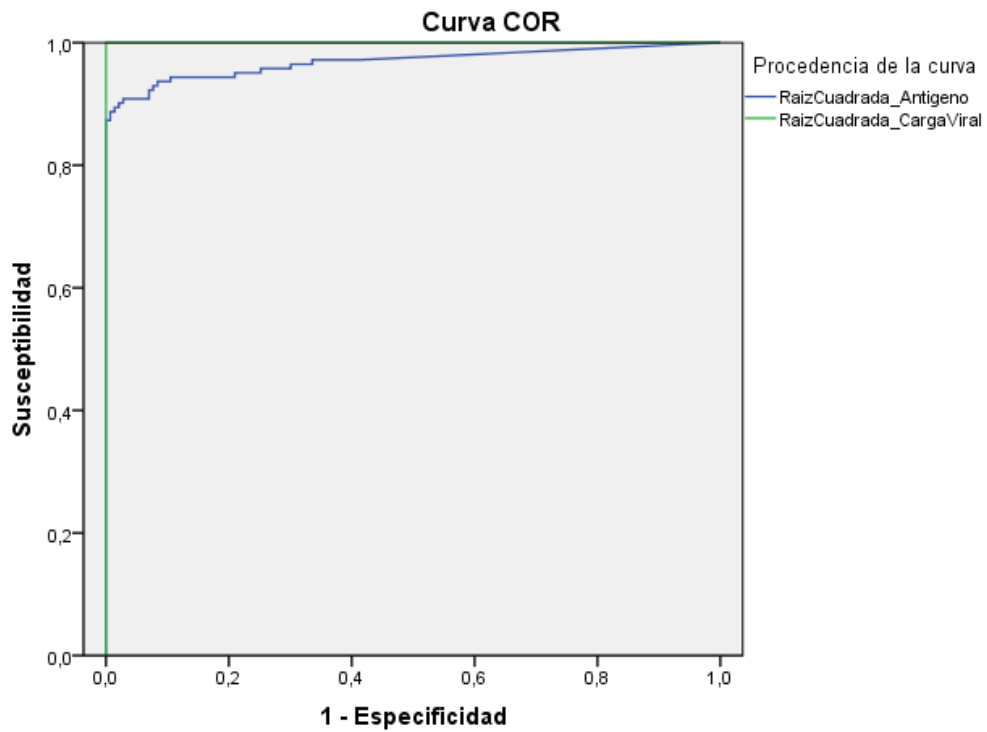


FIGURA 20: Curva ROC

Tabla 17: Coordenadas de la curva ROC

Variables resultado de contraste: antígeno core del VHC (fmol/l)

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
,01	,972	,413
,02	,972	,406
,03	,972	,399
,04	,972	,392
,06	,972	,385
,09	,972	,378
,11	,972	,371
,13	,972	,364
,16	,972	,357

,18	,972	,350
,21	,972	,343
,24	,972	,336
,25	,965	,336
,27	,965	,329
,29	,965	,322
,30	,965	,315
,31	,965	,308
,32	,965	,301
,36	,958	,301
,39	,958	,294
,40	,958	,280
,42	,958	,273
,44	,958	,266
,46	,958	,252
,49	,951	,252
,51	,951	,245
,54	,951	,238
,56	,951	,231
,60	,951	,224
,63	,951	,210
,65	,944	,210
,67	,944	,203
,69	,944	,196
,72	,944	,189
,78	,944	,182
,83	,944	,175
,85	,944	,168
,86	,944	,161
,92	,944	,154
,98	,944	,147
1,00	,944	,140

1,03	,944	,133
1,07	,944	,126
1,11	,944	,119
1,15	,944	,105
1,17	,937	,105
1,21	,937	,098
1,21	,937	,091
1,23	,937	,084
1,27	,930	,084
1,29	,930	,077
1,31	,923	,077
1,34	,923	,070
1,36	,915	,070
1,40	,908	,070
1,42	,908	,063
1,44	,908	,056
1,47	,908	,049
1,52	,908	,042
1,57	,908	,035
1,65	,908	,028
1,83	,901	,028
1,97	,901	,021
2,15	,894	,021
2,71	,894	,014
3,12	,887	,014
4,33	,887	,007
5,68	,880	,007
5,94	,873	,007
6,21	,873	,000
9,56	,866	,000
12,95	,859	,000
17,18	,852	,000

26,36	,845	,000
33,15	,838	,000
35,16	,831	,000
41,04	,824	,000
46,95	,817	,000
48,38	,810	,000
49,82	,803	,000
57,27	,796	,000
70,74	,789	,000
77,41	,782	,000
77,63	,775	,000
85,68	,768	,000
102,66	,761	,000
112,28	,754	,000
114,53	,746	,000
127,32	,739	,000
145,56	,732	,000
154,53	,725	,000
156,57	,718	,000
167,71	,711	,000
185,71	,704	,000
195,24	,697	,000
212,08	,690	,000
241,86	,683	,000
264,71	,676	,000
284,81	,669	,000
303,61	,662	,000
312,02	,655	,000
352,21	,648	,000
392,98	,641	,000
397,15	,634	,000
400,29	,627	,000

409,62	,620	,000
449,56	,613	,000
485,13	,606	,000
489,02	,599	,000
490,62	,592	,000
514,93	,585	,000
558,32	,577	,000
598,36	,570	,000
655,61	,563	,000
762,68	,556	,000
839,38	,549	,000
879,85	,542	,000
918,59	,535	,000
974,09	,528	,000
1079,29	,521	,000
1145,37	,514	,000
1179,31	,507	,000
1203,61	,500	,000
1207,96	,493	,000
1253,27	,486	,000
1321,58	,479	,000
1360,84	,472	,000
1413,72	,465	,000
1475,26	,458	,000
1539,98	,451	,000
1595,82	,444	,000
1839,50	,437	,000
2072,73	,430	,000
2204,16	,423	,000
2341,47	,415	,000
2373,32	,408	,000
2402,68	,401	,000

2419,98	,394	,000
2506,99	,387	,000
2820,47	,380	,000
3160,96	,373	,000
3308,08	,366	,000
3427,37	,359	,000
3527,60	,352	,000
3579,01	,345	,000
3633,84	,338	,000
3794,25	,331	,000
3928,40	,324	,000
3932,21	,317	,000
3991,31	,310	,000
4057,13	,303	,000
4120,44	,296	,000
4191,77	,289	,000
4235,00	,282	,000
4353,92	,275	,000
4448,54	,268	,000
4561,23	,261	,000
4819,79	,254	,000
5077,14	,246	,000
5284,86	,239	,000
5487,43	,232	,000
5620,89	,225	,000
5833,80	,218	,000
6559,93	,211	,000
7109,27	,204	,000
7118,01	,197	,000
7146,03	,190	,000
7548,54	,183	,000
8278,51	,176	,000

8664,57	,169	,000
8753,85	,162	,000
8890,40	,155	,000
9046,72	,148	,000
9371,49	,141	,000
9701,23	,134	,000
9929,89	,127	,000
10218,27	,120	,000
10672,98	,113	,000
11455,60	,106	,000
12120,12	,099	,000
12895,02	,092	,000
13543,67	,085	,000
14409,49	,077	,000
15800,56	,070	,000
17060,82	,063	,000
18721,46	,056	,000
19857,95	,049	,000
19999,70	,042	,000
20001,00	,000	,000

La variable (o variables) de resultado de contraste: fmol/l tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.

a. El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

7.4 Estudio de correlación

En el diagrama de dispersión (FIGURA 21) observamos que cuanto más altos son los valores de una de las variables, más altos son también los de la otra; a simple vista

podemos intuir que la nube de puntos se sitúa en una línea recta ascendente indicando la existencia de una relación lineal positiva entre las variables estudiadas.

Obtuvimos un coeficiente de correlación de Pearson de 0,804, siendo la correlación significativa ($p < 0,01$).

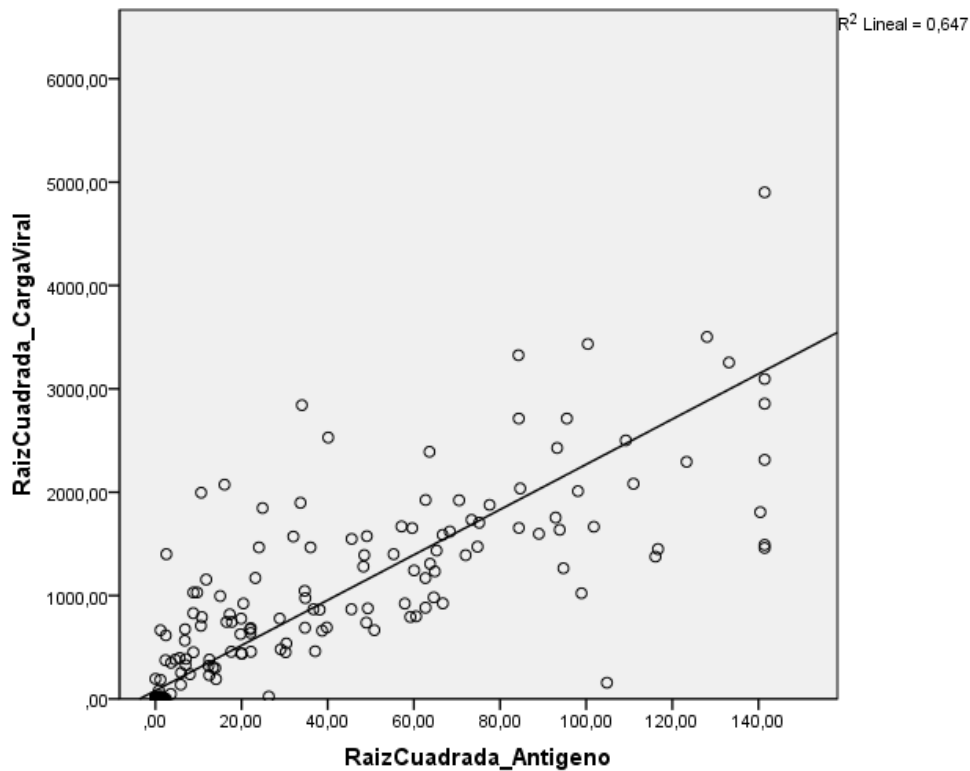


FIGURA 21: Diagrama de dispersión

7.5 Análisis de regresión lineal

Con el procedimiento de regresión realizado estimamos la recta de regresión y los estadísticos asociados al modelo de regresión simple. La Tabla **18** y la Tabla **19** son el resultado de analizar los datos del estudio sobre detección del antígeno core y carga viral del VHC con dicho procedimiento.

Tabla 18: Resumen del modelo de regresión lineal

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
	,499 ^a	,249	,246	3683,429

a. Variables predictoras: (Constante), carga viral UI/ML

La Tabla **18** contiene los estadísticos del modelo estimado. Aparecen en ella el coeficiente de correlación múltiple R y su cuadrado R² o coeficiente de determinación. R toma un valor de 0,499_y su cuadrado nos indica que el 24,9% de la variación del antígeno core del VHC es debido a variaciones en la carga viral. R² corregida es una corrección a la baja de R² que se basa en el número de casos y de variables independientes. En nuestro estudio, como hay 300 casos y una sola variable independiente, los dos valores de R² (el corregido y el no corregido) son prácticamente iguales. El bajo valor del error típico de la estimación obtenido nos indica que el ajuste de la recta es aceptable.

Tabla 19: Resumen del ANOVA de la regresión

Modelo	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1,338E9	1	1,338E9	98,610	,000 ^a
Residual	4,043E9	298	1,357E7		
Total	5,381E9	299			

a. Variables predictoras: (Constante), carga viral (UI/ml)

b. Variable dependiente: antígeno core del VHC (fmol/l)

Finalmente obtuvimos la siguiente ecuación para la recta de regresión:

Antígeno core del VHC = 1370,489 + 0,00001 Carga viral

A cada valor de antígeno core del VHC le corresponde un pronóstico de un incremento constante de 1370,489 más 0,00001 veces el valor de carga viral.

7.6 Comparación de medias

En la Tabla 20 y en la Tabla 21 se recogen los resultados del ANOVA aplicado para la comparación de medias de antígeno core del VHC entre grupos con distinta carga viral. La diferencia observada entre las medias de antígeno core en los diferentes grupos resultó significativa ($p < 0,05$). Para la representación gráfica de los datos se empleó el diagrama de caja (FIGURA 22).

Tabla 20: Estudio de comparación de medias

Carga viral (UI/ml)	N	Media Antígeno core VHC	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
$\leq 10^2$	164	,50	,882	,069	,37	,64
$10^2 - 10^6$	70	923,36	1671,152	199,741	524,89	1321,83
$>10^6$	66	7268,63	6360,668	782,944	5704,98	8832,28
Total	300	1814,82	4242,270	244,928	1332,82	2296,82

Tabla 21: ANOVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,559E9	2	1,279E9	134,616	,000
Intra-grupos	2,822E9	297	9503287,357		
Total	5,381E9	299			

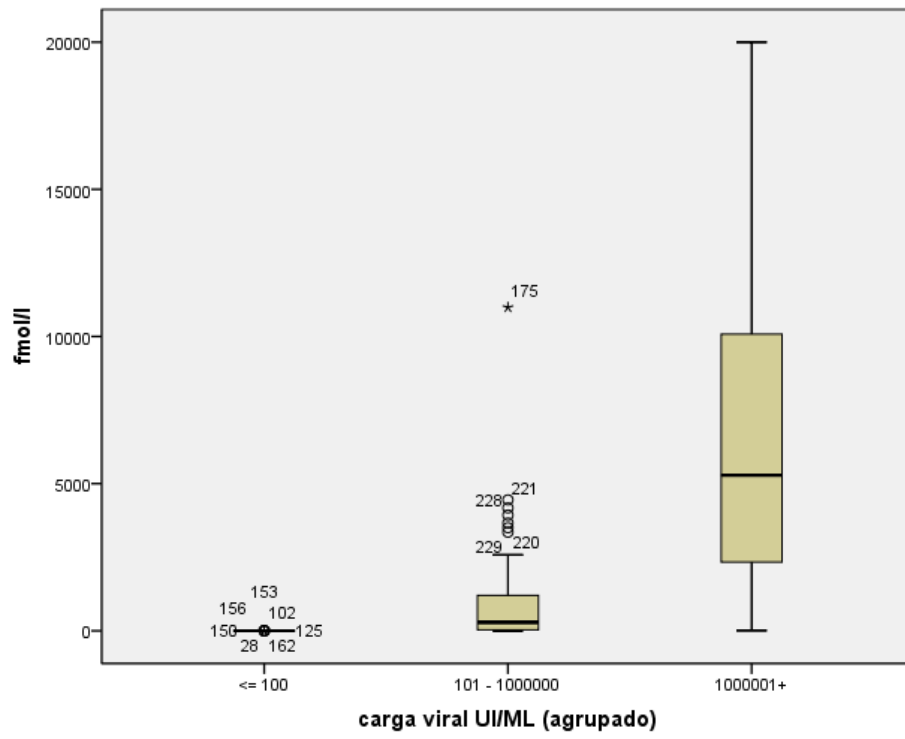


FIGURA 22: Diagrama de caja

8 DISCUSIÓN

La hepatitis C es una infección viral que puede presentarse como una afección leve, de pocas semanas de duración, o evolucionar a una enfermedad hepática crónica que puede provocar cirrosis y cáncer de hígado. Un 70-75% de las personas infectadas desarrollará una infección crónica, y la mayoría de éstas presentarán hepatitis crónica con un grado variable de progresión de la inflamación y fibrosis hepática. De estos pacientes, un 10-20% evolucionarán a cirrosis tras 20-40 años, pudiendo producirse complicaciones graves como cirrosis descompensada y cáncer hepático. Una vez establecida la cirrosis, el riesgo de carcinoma hepático es de 1-4% al año. La hepatitis C es la primera causa de cáncer de hígado y de trasplantes de hígado en Europa lo que supone una carga importante para los sistemas sanitarios y la sociedad.

Para el manejo clínico de los pacientes con esta enfermedad se utilizan cuatro marcadores virológicos: los anticuerpos anti-VHC, el ARN viral, el genotipo del virus y el antígeno core del virus. La detección de antígeno core del VHC se realiza actualmente en pocos laboratorios, debido a que la técnica que parece dar mejores resultados es de reciente aparición y está siendo evaluada.

Analizando las ventajas y desventajas de cada uno de los marcadores hemos querido aclarar el potencial papel de la detección de antígeno core del VHC en el algoritmo diagnóstico rutinario de la hepatitis C. La determinación del genotipo viral es siempre necesaria a la hora de establecer el tratamiento ya que no todos los genotipos responden igual por lo que no formará parte de esta discusión.

En cuanto a la detección de anticuerpos anti-VHC es la prueba más utilizada en la mayoría de los laboratorios clínicos para descartar la infección por VHC. Teniendo en cuenta que la aparición de los anticuerpos anti-VHC ocurre entre 6 y 12 semanas después de la exposición al virus, el problema más común que presenta esta técnica es la obtención de resultados falsos positivos en aquellos pacientes con un título bajo de anticuerpos. Según Kesli y cols. (12) entre la población con una prevalencia de anticuerpos anti-VHC por debajo del 10% (por ejemplo, donantes de sangre, personal

militar, población en general, trabajadores del sexo o personas atendidas en consultas de enfermedades de transmisión sexual), la proporción de resultados falsos positivos es aproximadamente del 35% (rango entre el 15 y el 60%).

En las pruebas de cribado de anticuerpos anti-VHC se aconseja la utilización de pruebas complementarias para confirmar las muestras positivas, excepto en los sueros marcadamente reactivos (80) y, la realización de estas pruebas complementarias suele retrasar el informe definitivo (10).

Según recoge la guía de práctica clínica de la Asociación Europea para el estudio del hígado (EASL) (72) los anticuerpos anti-VHC son detectables mediante un EIA en la inmensa mayoría de pacientes con infección por VHC, pero los resultados del EIA pueden ser negativos en la fase inicial de la hepatitis aguda C y en los pacientes con una profunda inmunosupresión. Además, tras la eliminación del virus, ya sea de forma espontánea o inducida por el tratamiento, los anticuerpos anti-VHC persisten sin que haya ARN de VHC aunque pueden reducirse y acabar desapareciendo en algunos individuos.

Según indican en la guía de práctica clínica de la EASL, el diagnóstico de la hepatitis C aguda tan solo puede realizarse de manera fiable si se puede documentar una seroconversión a anticuerpos anti-VHC, puesto que no existe ningún marcador serológico que demuestre que la infección por VHC se encuentra en la fase aguda. Alrededor de un 50% de los pacientes con hepatitis C aguda presentarán anticuerpos anti-VHC en el momento del diagnóstico. En tales casos, puede sospecharse una hepatitis aguda C si los signos y síntomas clínicos son compatibles con una hepatitis aguda C: ALT > 10 × el límite superior de la normalidad, ictericia, ausencia de antecedentes de hepatopatía crónica u otras causas de hepatitis aguda y/o si puede identificarse un origen reciente probable de transmisión.

Como ya se comentó en su momento, la hepatitis en su fase aguda es la mayoría de las veces asintomática por lo que diagnosticar la infección en esta fase es

complicado. En todos los casos, puede detectarse el ARN de VHC durante la fase aguda, aunque puede haber periodos breves de ARN del VHC indetectable.

El diagnóstico de hepatitis C crónica se basa en la detección tanto de anticuerpos anti-VHC como de ARN del VHC en presencia de signos de hepatitis crónica: elevación de aminotransferasas u observaciones histológicas. Dado que en los casos de infección por VHC contraída de forma reciente la eliminación espontánea del virus es muy poco frecuente después de entre cuatro y seis meses de infección, puede establecerse un diagnóstico de hepatitis C crónica después de ese periodo de tiempo. En la población en general, es más importante informar respecto a la existencia de infección crónica que informar respecto a la presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHC (81).

La determinación de marcadores de replicación viral permite identificar la infección por el VHC durante el periodo de ventana serológica lo que resulta especialmente útil en el cribado de donantes de sangre, en pacientes con hepatitis aguda seronegativa, o tras exposición accidental percutánea a sangre contaminada. El bajo nivel de virus circulante durante la infección hace necesario que el ARN del virus tenga que ser amplificado usando técnicas moleculares que resultan caras y, aunque proporcionan una detección fiable de la viremia en todas las fases de la infección, su principal limitación es la posibilidad de dar falsos positivos por contaminación. Es por ello que las técnicas moleculares requieren cierta experiencia por parte del personal y resulta adecuada solo en laboratorios dotados con una infraestructura destinada a llevar a cabo técnicas de biología molecular.

Otro inconveniente de las técnicas de detección del ARN viral es que el ARN viral puede ser temporalmente indetectable debido a la respuesta inmune. Durante esos periodos de “no viremia” se pueden detectar anticuerpos anti-VHC y no detectarse ARN viral por lo que sería necesario repetir la cuantificación de la carga viral unas semanas más tarde en una nueva muestra (12). La cuantificación de la carga viral requiere un volumen de muestra mínimo de 650 µl recogido en tubos con EDTA y la duración de la técnica es aproximadamente de 4 horas.

Dado que la proteína core del VHC posee una estructura altamente conservada en todos los genotipos virales, a partir del año 2000 comenzaron a desarrollarse técnicas capaces de detectar la presencia de antígeno core del VHC en pacientes con sospecha de infección.

La primera técnica que se desarrolló para la detección y cuantificación del antígeno core del VHC fue un EIA incapaz de detectar el antígeno en presencia de anticuerpos anti-VHC (5). Se desarrolló entonces una segunda generación de estos test pero resultó ser incapaz de detectar el antígeno core del VHC en muestras con valores de ARN inferiores a 20.000 UI/ml lo que limitó su utilidad clínica (7). Según publicaron Song y cols. en el año 2010 (9), la baja sensibilidad de los ensayos desarrollados hasta el momento para la detección de antígeno core del VHC había supuesto un obstáculo para su uso clínico.

Recientemente se ha comercializado un nuevo método para la detección y cuantificación del antígeno core del VHC que utiliza la misma plataforma ARCHITECT empleada para la determinación de anticuerpos anti-VHC en muchos centros y, según algunos autores, podría suponer un cambio en el enfoque diagnóstico de la infección por el VHC ya que, respecto a los métodos de amplificación de ARN, es un método más barato, rápido y no requiere una cualificación especial del personal (8–13). El ensayo ARCHITECT HCV Ag permite utilizar la misma muestra de suero requerida para la detección de anticuerpos anti-VHC, necesita un volumen mínimo de muestra de 110 μ l y la duración de la prueba es de tan solo 34 minutos.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido evaluar la utilidad del ensayo ARCHITECT HCV Ag[®], diseñado para la detección del antígeno core del VHC, en el diagnóstico y/o control del tratamiento de la hepatitis C empleando muestras clínicas. Se seleccionaron 300 sueros de pacientes con al menos una petición de carga viral de VHC solicitada entre los meses de junio y diciembre de 2013 y se realizó la técnica objeto del estudio.

El rendimiento de todo test diagnóstico se basa en su comparación con un gold standard o patrón de referencia y, en nuestro caso, utilizamos como gold standard la cuantificación de la carga viral por PCR a tiempo real ya que esta es la técnica que define la presencia de infección por VHC con la máxima certeza conocida.

El trabajo realizado aporta información sobre las características de la técnica ARCHITECT HCV Ag: validez y seguridad, rendimiento, correlación con el gold standard y potencial papel en el algoritmo diagnóstico de la hepatitis C. Conforme a estas características se estructura la siguiente discusión.

VALIDEZ Y SEGURIDAD DE LA TECNICA ARCHITECT HCV Ag

Al comparar un test diagnóstico con su gold standard, se pueden obtener cuatro combinaciones si los resultados del test se expresan en forma binaria como es el caso de la detección de antígeno core del VHC con la técnica en estudio (> 3 fmol/l: Reactivo y ≤ 3 fmol/l: No reactivo):

- Verdadero positivo (VP): Gold estándar > 15 UI/ml y detección de antígeno core del VHC > 3 fmol/ml
- Verdadero negativo (VN): Gold estándar < 15 UI/ml y detección de antígeno core del VHC < 3 fmol/ml
- Falso positivo (FP): Gold estándar < 15 UI/ml y detección de antígeno core del VHC > 3 fmol/ml
- Falso negativo (FN): Gold estándar > 15 UI/ml y detección de antígeno core del VHC < 3 fmol/ml

Estas combinaciones se pueden resumir en una tabla de contingencia de 2×2 como se refleja en la Tabla 10. A partir de esa tabla se han calculado distintas formas de expresar el poder de discriminación del test diagnóstico objeto del estudio. Los resúmenes de las propiedades del test estudiadas aparecen en la **Tabla 14** y **Tabla 15**.

Es evidente que una buena prueba diagnóstica es la que ofrece resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas a un test son validez y seguridad. La sensibilidad y la especificidad de un test son medidas de su validez mientras que la seguridad viene determinada por los valores predictivos .

La técnica objeto de estudio proporciona un resultado cuantitativo por lo que la sensibilidad y la especificidad de la prueba dependen del punto de corte establecido, en este caso, por el fabricante (3 fmol/l). Este punto de corte indica el valor de la prueba a partir del cual se considera que un determinado paciente está o no infectado por el VHC. Cuando el punto de corte tiene un valor bajo, aumenta la sensibilidad de la prueba de modo que la mayoría de los sujetos infectados serán correctamente clasificados, pero a costa de un incremento de pacientes sanos que serán diagnosticados como infectados. Por el contrario, si el punto de corte es más alto la prueba sería más específica y la mayoría de pacientes sanos serían correctamente clasificados, pero a costa de un incremento de pacientes infectados no identificados como tales.

Considerando como técnica de referencia la detección de carga viral del VHC y como punto de corte de la prueba ARCHITECT HCV Ag el valor recomendado por el fabricante (3 fmol/l) hemos obtenido una sensibilidad y especificidad del 89% y 98% respectivamente. Hemos podido comprobar que nuestros datos son similares a los aportados por otros autores.

Li Cavoli y cols. (11) realizaron un estudio en 92 pacientes sometidos a diálisis y evaluaron varias técnicas diagnósticas de hepatitis C, entre ellas el ensayo de detección de antígeno core del VHC (Architect Abbott) y la carga viral del VHC por PCR (TaqMan Roche) y encontraron una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 100%.

Park y cols (8) también realizaron un estudio para ver si la nueva técnica desarrollada por Abbott podía utilizarse como alternativa a la cuantificación del ARN

viral por PCR a tiempo real y obtuvieron una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%. Kesli y cols. (12) obtuvieron una especificidad del 100% y mayor sensibilidad, de 96,3%, al igual que Song y cols. (9).

Hadziyannis y cols. (13) también destacan en un estudio la mayor sensibilidad de esta nueva técnica desarrollada por Abbott respecto a las desarrolladas anteriormente.

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten valorar la validez de la prueba diagnóstica, sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica.

Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente se le realiza una prueba y se obtiene un resultado, lo que interesa conocer es la probabilidad de que el paciente esté realmente infectado o no ante un resultado positivo o negativo de la prueba. Esta seguridad de la prueba viene reflejada por los valores predictivos pero hay que tener en cuenta que, aunque los valores predictivos, a diferencia de la sensibilidad y la especificidad, nos dan información clínicamente relevante, dependen de la prevalencia de la enfermedad. El VPP disminuye a medida que la prueba se aplica a poblaciones con una baja prevalencia de la infección ya que, en esas circunstancias, aumentan los resultados falsos positivos. Por tanto, si un paciente tiene un riesgo mayor o menor de poder estar infectado por el VHC, los valores predictivos variarán.

En nuestro estudio hemos obtenido un VPP del 98% y el VPN del 92%. Un 2% de los pacientes que obtengan un resultado positivo de la prueba serán clasificados como enfermos sin serlo y un 8% serán clasificados como sanos estando infectados.

En el estudio realizado por Li Cavoli y cols. (11) obtuvieron un VPP del 100% y un VPN del 97%.

En los estudios de Park y cols (8) y Kesli y cols. (12) obtuvieron un VPP del 100% y un VPN de 86,4% y 89,7% respectivamente.

Lo cierto es que el hecho de que la sensibilidad y la especificidad sean independientes de la prevalencia hace que estos índices constituyan la forma más frecuente de expresar el rendimiento de un test a pesar de sus limitaciones.

Para dar solución a las limitaciones de las medidas tradicionales hemos recurrido a otros conceptos que permiten medir mejor el rendimiento de una prueba diagnóstica. Estos conceptos son las probabilidades pre-test y post-test y la razón de verosimilitud o coeficiente de probabilidades y se tratarán en el siguiente apartado “rendimiento de la técnica”.

RENDIMIENTO DE LA TECNICA

En el transcurso de la consulta diaria, el médico puede estimar de manera intuitiva la probabilidad de que sus pacientes padezcan o no hepatitis C.

En el manual práctico de tratamiento de las hepatitis crónicas víricas del Servicio de Medicina Interna del hospital Juan Canalejo de La Coruña (82) encontramos recomendaciones de cribado antiviral de la hepatitis según grupo y probabilidad de riesgo de infección (FIGURA 23) así como el contenido básico de la anamnesis en pacientes con hepatitis crónica vírica (FIGURA 24).

GRUPO	RIESGO DE INFECCIÓN	CRIBADO VHB	CRIBADO VHC
ADVP	Alto	Sí	Sí
Receptores de factores de coagulación antes de 1987	Alto	No	Sí
Receptores de sangre u órganos antes de 1992	Alto	No	Sí
Pacientes con hipertransaminemia	Alto	Sí	Sí
Pacientes con VIH	Alto	Sí	Sí
Pacientes en hemodiálisis	Medio	Sí	Sí
Personas con enfermedades hepáticas sin diagnosticar	Medio?	Sí	Sí
Población penitenciaria	Medio	Aconsejable	Aconsejable
Personal sanitario	Bajo	Si se produce exposición	Si se produce exposición
Personas promiscuas	Alto/bajo	Sí	No
Pareja sexual estable de infectado	Alto/bajo	Sí	No

FIGURA 23: Recomendaciones de cribado antiviral hepatitis según grupo y probabilidad de riesgo de infección

ANTECEDENTES FAMILIARES
ANTECEDENTES PERSONALES
<ol style="list-style-type: none"> 1. Transfusiones y hemoderivados 2. Intervención quirúrgica mayor/menor o ingreso hospitalario 3. Exposiciones de riesgo
HÁBITOS
<ol style="list-style-type: none"> 1. Consumo de drogas ilegales 2. Uso de drogas por vía parenteral o nasal 3. Promiscuidad sexual 4. Tatuajes o <i>piercings</i> 5. Consumo de alcohol y/o fármacos 6. Riesgo laboral
ENFERMEDADES CONCOMITANTES
<ol style="list-style-type: none"> 1. Obesidad 2. Enfermedades tiroideas 3. Diabetes 4. Hiperlipidemia 5. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana 6. Enfermedades autoinmunes 7. Insuficiencia cardíaca
SÍNTOMAS Y/O SIGNOS DE DAÑO HEPÁTICO
<ol style="list-style-type: none"> 1. Astenia y anorexia. Fiebre o febrícula 2. Náuseas o vómitos 3. Prurito 4. Dolor en hipocondrio derecho 5. Arañas vasculares u otros estigmas de hepatopatía crónica 6. Edemas

FIGURA 24: Contenido básico de la anamnesis en pacientes con hepatitis crónica vírica

Siguiendo esas recomendaciones, el médico puede clasificar al paciente dentro del grupo de alto, medio o bajo riesgo de tener hepatitis C. En cualquier caso habrá calculado, de manera inconsciente, la probabilidad de padecer hepatitis C, sin haberla cuantificado. Esa probabilidad se denomina probabilidad pre-test. y, además, es posible cuantificarla aunque en nuestro caso no ha sido posible por no disponer de

los datos adecuados. Para ello bastaría, por ejemplo, recoger prospectivamente los resultados de las futuras 100 detecciones de antígeno core del VHC con la técnica objeto de nuestro estudio en pacientes cuyo cuadro clínico hiciera necesario descartar la infección por VHC y comprobar en cuantas de ellas se confirma la infección. Si se confirmara en 35 casos podríamos decir que la probabilidad pre-test, en nuestro ejemplo, es del 35%.

Los coeficientes de probabilidad nos indican las veces que el resultado del test diagnóstico en estudio aumentará o disminuirá la probabilidad pre-test de padecer hepatitis C. Por, tanto, conocida la probabilidad pre-test y los coeficientes de probabilidad, tras aplicar el test diagnóstico obtendremos la probabilidad post-test de estar infectado por el VHC.

En nuestro caso hemos obtenidos unos coeficientes de probabilidad positivo y negativo de 47,36 y 0,11 respectivamente. Por tanto, en un paciente infectado por VHC es 47,36 veces más probable detectar el antígeno core que en un paciente sano y no detectar el antígeno core del VHC en un paciente infectado es muy poco probable (0,1 veces). Estos parámetros son útiles para determinar la potencia diagnóstica de la prueba. Dado que el valor del CPP es >10 (y CPN es $<0,1$) podemos decir que la técnica evaluada es una prueba muy potente que apoya fuertemente el diagnóstico (83).

La forma más sencilla de calcular la probabilidad post-test es utilizando el normograma de Fagan (FIGURA 25), una herramienta que nos permite, conociendo la probabilidad pre-test (prevalencia), calcular la probabilidad de estar sano o enfermo utilizando el CPP o el CPN, respectivamente.

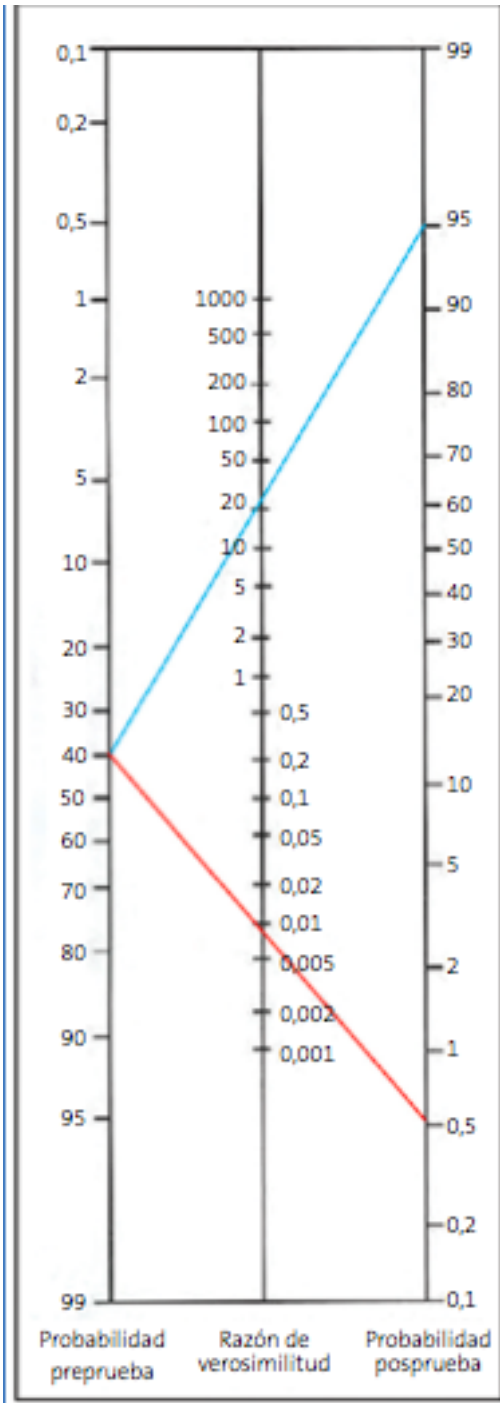


FIGURA 25: Normograma de Fargan

La FIGURA 25 muestra un ejemplo que asume una probabilidad pre-test del 40%. Un CPP de 20, haría que la probabilidad post-test ascendiera hasta el 95% y sería muy probable que el paciente estuviera infectado. Un CPN de 0,01 proporcionaría una probabilidad post-test del 0,5%, con lo que probablemente se podría descartar la infección.

ESTUDIO DE CORRELACION

El diagrama de dispersión que hemos realizado con los datos recogidos nos ha permitido hacernos una idea bastante aproximada sobre el tipo de relación existente entre la cuantificación del ARN viral por PCR a tiempo real y la cuantificación del antígeno core del VHC con la técnica objeto de nuestro estudio. La nube de puntos obtenida se ajusta bastante bien a una línea recta al igual que hemos observado en otros trabajos publicados (8,9,12,13).

Para estudiar la posible existencia de relación entre la carga viral de VHC y la cantidad de antígeno core del VHC hemos realizado un análisis de correlación y regresión, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. El resultado ha sido $r=0,804$ ($p<0,01$) lo que indica que existe una buena relación lineal entre ambos parámetros.

En otros trabajos consultados los valores del coeficiente de correlación son también similares a los nuestros. Hadziyannis y cols. (13) y Moscato y cols. (84), obtuvieron un valor de 0,8, Kesli y cols. (12), de 0,907 y Park y cols. (8), obtuvieron un coeficiente de correlación de 0,9464 al igual que Song y cols. (9).

POTENCIAL PAPEL DEL ANTIGENO CORE DEL VHC EN EL ALGORITMO DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS C

La hepatitis C en España es una enfermedad de declaración obligatoria y en los protocolos de la red nacional de vigilancia epidemiológica publicados en el año 2013 (85), la detección de antígeno core del VHC aparece como alternativa a la detección del ARN viral dentro de los criterios que debe cumplir un paciente para ser clasificado como “caso” y en la definición de “infección aguda reciente”. Ambas técnicas son consideradas pruebas que indican infección en curso.

Revisando los artículos recogidos en PubMed desde 2010 hasta la fecha sobre la técnica ARCHITECT HCV Ag (Abbott Diagnostics), hemos comprobado que son varios los autores que han evaluado esta nueva técnica de detección de antígeno core del VHC y, al igual que nosotros, ponen de manifiesto que el ensayo desarrollado por Abbott Diagnostics puede ser una alternativa a los métodos moleculares empleados actualmente para detectar la carga viral del VHC.

En el año 2010 Park y cols. (8) evaluaron la técnica ARCHITECT HCV Ag utilizando como gold estándar el ensayo Roche Cobas Taqman y concluyeron que el ensayo de detección de antígeno core del VHC podría ser una alternativa a la RT-PCR. Este mismo año, Song y cols. (9) también evaluaron la técnica y concluyeron que presentaba una buena sensibilidad, precisión y correlación lineal con los niveles de ARN viral por lo que podría usarse como un buen marcador de replicación viral para monitorizar la respuesta al tratamiento en pacientes con infección crónica.

En el año 2011 Moscato y cols. (84) realizaron un trabajo en pacientes con hepatitis C crónica en tratamiento y concluyeron que la carga viral y la detección de antígeno core del VHC pueden ser útiles. Medici y cols. (68) proponen que la detección de antígeno se realice a los pacientes con anticuerpos anti-VHC para confirmar o excluir la infección activa y a pacientes con hepatitis aguda o pertenecientes a grupo de riesgo. Yuksel y cols. (86) también evaluaron la técnica y creen que la detección de antígeno core del VHC podría ser una ventaja en laboratorios que no tienen disponibles técnicas de PCR. Kesli y cols. (12) consideran que la técnica es muy específica, sensible, segura, fácil de montar, coste-efectiva y aplicable como screening, prueba suplementaria, y confirmatorio de pacientes con anticuerpos anti-VHC.

En el año 2012 Vermehren y cols. (87) evaluaron la técnica durante la monitorización del tratamiento de pacientes con hepatitis C crónica infectados con virus del genotipo 1 y concluyeron que la técnica podía ser útil. Kuo y cols. (88) realizaron un estudio en el que vieron que la detección de anticuerpos anti-VHC y la detección de antígeno core del VHC podían predecir bien la viremia mientras que la

combinación de ambos marcadores puede proporcionar un mejor resultado. Dawson (89) puso de manifiesto que los test serológicos para detectar anticuerpos anti-VHC no pueden diferenciar entre pacientes que han resuelto la infección y pacientes con la infección activa a diferencia del antígeno core del VHC.

En el año 2013 siguieron apareciendo publicaciones que evaluaban la nueva técnica desarrollada por Abbott para la detección de antígeno core del VHC. Hadziyannis y cols. (13) se preguntaron si el antígeno core del VHC era un marcador seguro de carga viral y realizaron un estudio tras el cual determinaron que su papel en el diagnóstico y otras aplicaciones clínicas se basaba en la relación coste-efectivo. Ottiger y cols. (90) propusieron un nuevo algoritmo para confirmar la presencia de anticuerpos anti-VHC: según estos investigadores la detección de antígeno core del VHC podría aplicarse para diferenciar las infecciones activas o resueltas y los resultados falsos positivos de anticuerpos anti-VHC.

En el año 2014 Reyes-Mendez y cols. (91) propusieron incorporar la detección de antígeno core del VHC al algoritmo diagnóstico para confirmar la presencia de anticuerpos anti-VHC como alternativa a las técnicas moleculares en aquellos laboratorios que no tienen un fácil acceso a estas últimas técnicas. Garbuglia y cols. (92) obtuvieron resultados que sugerían que la detección de antígeno core del VHC representaba una herramienta adecuada para determinar la infección en curso en pacientes infectados con VIH al resultar más barata y más rápida que la cuantificación del ARN viral. Chevaliez y cols (93) encontraron el ensayo altamente específico y fácil de montar. Buket y cols. (94) evaluaron la técnica de detección de antígeno core del VHC desarrollada por Abbott y concluyeron que podía usarse en el diagnóstico de hepatitis C ya que era una técnica barata, sencilla y mostraba alta especificidad (100%) y valor predictivo positivo (100%). Sugerían la necesidad de realizar más estudios para aclarar el potencial papel de la técnica dados los valores de sensibilidad (86,5%) y valor predictivo negativo (59,4%) que habían obtenido en su estudio. Cabe destacar que estos valores de sensibilidad y valor predictivo negativo son los más bajos encontrados entre las publicaciones que hemos consultado.

En el año 2015 hay dos publicaciones, en una recomiendan la implementación del ensayo en el screening de rutina en poblaciones de riesgo como hombres que mantienen sexo con hombres infectados con el VIH (95) y en la otra recomiendan su implementación en donantes de sangre y UDVP (96).

La evaluación que nosotros hemos llevado a cabo de la prueba ARCHITECT HCV Ag junto a la revisión bibliográfica realizada nos lleva a plantearnos en que situaciones podría ser útil el uso de la nueva técnica desarrollada por Abbott para la detección de antígeno core del VHC.

La hepatitis C detectada a tiempo puede considerarse una enfermedad curable, de lo contrario, puede evolucionar hacia una enfermedad grave. Por ello, es importante tener en cuenta a la hora de dar un diagnóstico que la peor equivocación que se puede cometer es dar un diagnóstico falso negativo.

Revisando los grupos en los que se debería testar el VHC (donantes de tejidos/sangre, pacientes en hemodiálisis y sanitarios que realicen procedimientos con riesgo de exposición a fluidos biológicos) y los grupos de personas a los que se les debería ofrecer la realización de pruebas para descartar la infección por VHC (todas las personas nacidas a partir de 1945 hasta 1965, personas con hipertransaminasemia no filiada, usuarios actuales o antiguos de drogas por vía parenteral, incluidos los que se inyectaron solo una vez y no se consideran a si mismos consumidores de drogas, portadores del VIH, personas que han recibido hemodiálisis, hemofílicos que recibieron concentrados de factores antihemofilia antes de 1987, personas con antecedente de transfusión sanguínea y/o trasplante antes de 1992, hijos de madres con infección por VHC, sanitarios tras pinchazo accidental o exposición mucosa con sangre VHC+, personas que recibieron tratamiento médico o dental en países donde la prevalencia del VHC es común y los métodos de control de infección son pobres, portadores de piercings o tatuajes en circunstancias donde el procedimiento de control de la infección se sospecha que no es óptimo, personas con múltiples parejas sexuales, contactos sexuales con portadores del VHC e inmigrantes de países de prevalencia elevada de infección por VHC) hemos intentado ver en que

situaciones los pacientes podrían beneficiarse de la técnica evaluada en este trabajo analizando cada uno de los grupos.

Donantes de tejidos:

En el Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos (97). En este Real Decreto indican realizar la detección de anticuerpos anti-VHC y, solo en caso de progenitores hematopoyéticos, realizar además PCR.

Teniendo en cuenta que en los pacientes hemodializados así como en los inmunodeprimidos, las pruebas de detección de anticuerpos son menos sensibles que en la población general, en estas circunstancias, la detección de antígeno core del VHC permite reducir el periodo ventana (98) y, realizada en paralelo con la determinación de anticuerpos anti-VHC pensamos que ayudaría tanto a confirmar como a descartar la infección con mayor seguridad (Tabla 22).

Donantes de sangre:

Siguiendo la normativa española descrita en el Real Decreto 1088/2005 (99), los centros y servicios de transfusión deben cumplir unos requisitos técnicos y condiciones mínimas de calidad de las donaciones de sangre y los derivados sanguíneos, para garantizar la seguridad de todos los posibles receptores de hemoderivados (99). En las donaciones de sangre total, donaciones por aféresis y autodonación de predepósito se realizarán, entre otras pruebas analíticas la detección de anticuerpos anti-VHC y pruebas de amplificación genómica del ácido nucleico del VHC. Teniendo en cuenta este Real Decreto descartamos la posibilidad de incorporar la detección de antígeno core del VHC en los donantes de sangre.

Personas con algún factor de riesgo descrito:

Los pacientes con una **exposición de riesgo reciente** se ven obligados a esperar entre 6 y 12 semanas para poder ser diagnosticados ya que ese es el tiempo de ventana serológica durante el cual los anticuerpos anti-VHC no son detectados. En estos casos, la detección de antígeno core del VHC evitaría la espera del paciente y la infección activa podría diagnosticarse de forma precoz (1-2 semanas tras la exposición) aplicando una técnica rápida, barata y fácil de montar. En estos casos también creemos que sería útil añadir en paralelo a la detección de anticuerpos anti-VHC la detección de antígeno core del VHC (Tabla 22).

Población en general:

En estos casos la única prueba que se realiza es la detección de anticuerpos anti-VHC y un resultado negativo descarta la infección. Nos parece importante volver a resaltar que en determinadas situaciones, periodo ventana o inmunosupresión, la detección de antígeno core del VHC permite reducir el periodo ventana (98) y, realizada en paralelo con la determinación de anticuerpos anti-VHC ayudaría tanto a confirmar como a descartar la infección con mayor seguridad (Tabla 22).

Tabla 22: Interpretación de la realización de pruebas en paralelo

Anticuerpo	Antígeno	Interpretación
POSITIVO	POSITIVO	Infección activa
POSITIVO	NEGATIVO	Confirmar anticuerpos si el resultado no es marcadamente positivo Valorad posible FN del antígeno
NEGATIVO	POSITIVO	Valorad posible FN de los anticuerpos Posible infección activa en paciente inmunodeprimido o en periodo ventana
NEGATIVO	NEGATIVO	No infección

El potencial papel que creemos puede tener la técnica desarrollada por Abbott para la detección de antígeno core del VHC en el algoritmo diagnóstico de la infección por VHC se refleja en la **FIGURA 26**.

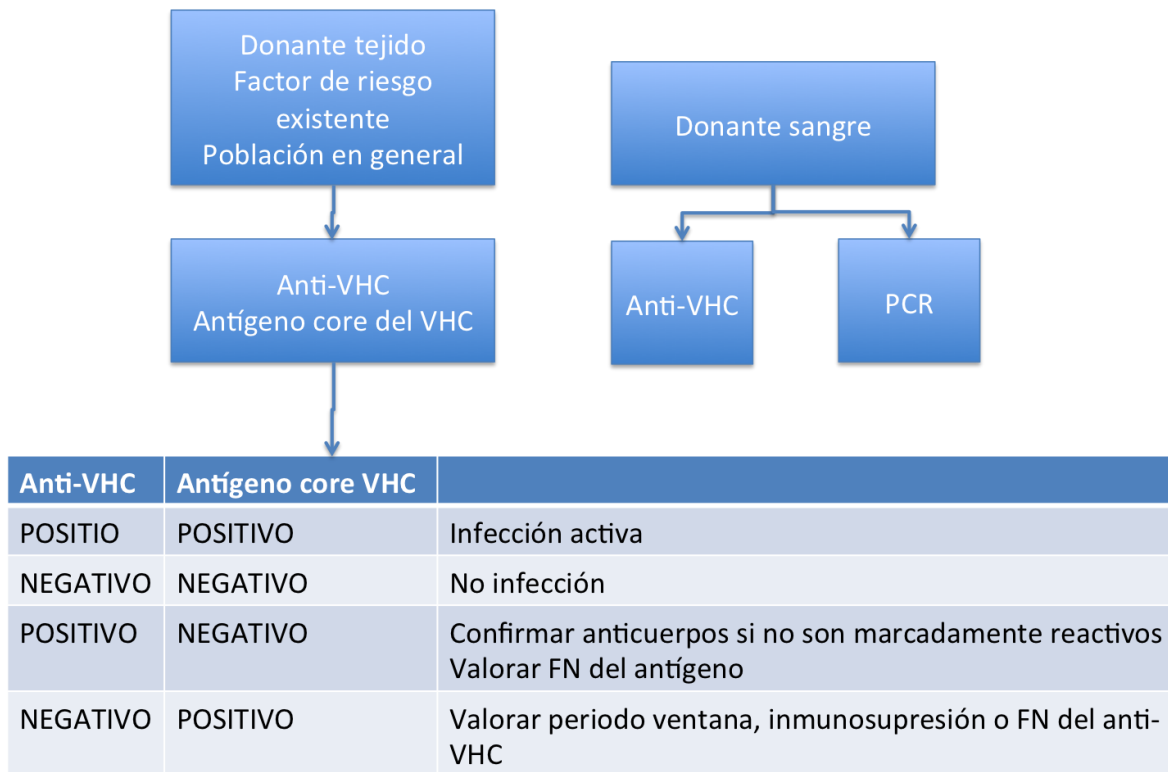


FIGURA 26: Potencial papel del antígeno core del VHC en el algoritmo diagnóstico de la infección por VHC

Realizando en paralelo la determinación de anticuerpos anti-VHC y la detección de antígeno core del VHC cualquier positivo en alguna de ellas llevaría a detectar el problema en principio, y si todas las pruebas son negativas llevaría asociado un elevado VPN necesario para descartar la enfermedad.

9 CONCLUSIONES

1. La técnica evaluada posee una sensibilidad del 89% y una especificidad del 98%.
2. El VPP obtenido indica que el 98% de los pacientes en los que se detecta antígeno core del VHC con la técnica de estudio resultan estar infectados. Un 2% de infectados pueden no ser diagnosticados como tales.
3. El VPN obtenido indica que en el 91 % de los pacientes en los que no se detecta el antígeno core del VHC no estarán infectados.
4. Disponer de los datos necesarios para calcular la probabilidad pre-test resultaría útil para mejorar la interpretación de los resultados.
5. Los coeficientes de probabilidad resultan ser una herramienta útil para predecir la probabilidad de estar infectado por el VHC después de realizar el test.
6. El estudio de correlación entre las variables estudiadas demuestra que existe una buena correlación entre ambas.
7. Con los resultados obtenidos no podemos indicar un nivel de carga viral por debajo del cual la técnica ARCHITECT HCV Ag no vaya a detectar el antígeno core del VHC.
8. Recomendaríamos la detección de antígeno core del VHC en paralelo con la detección de anticuerpos anti-VHC en donantes de tejido, pacientes hemodializados y población en general. De este modo, cualquier positivo en alguna de ellas llevaría a detectar el problema en principio, y si todas las pruebas son negativas llevaría asociado un elevado VPN necesario para descartar la enfermedad.

10 ANEXOS

ANEXO I: Aprobación de los laboratorios

Las responsables de los Laboratorios de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Morales Meseguer de Murcia, la Dra. Rosa Blázquez Garrido, y del Hospital General Universitario de Albacete, la Dra. María Dolores Crespo Sánchez, aprueban la realización de esta investigación para llevar a cabo el trabajo de Tesis Doctoral de Dña. María Rosario Vicente Romero.

Fdo: Dra. Rosa Blázquez Garrido

Fdo: Dra. María Dolores Crespo Sánchez

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):47–52.
2. World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. 2014.
3. Pawlotsky J-M. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis.* 2003 Feb;7(1):127–37.
4. Guía de práctica clínica hepatitis C [Internet]. Available from: http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_531_Hepatitis_C_actualizacion12.pdf
5. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2005 Feb;32(2):92–101.
6. Medhi S, Potukuchi SK, Polipalli SK, Swargiary SS, Deka P, Chaudhary A, et al. Diagnostic utility of hepatitis C virus core antigen in hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2008 May;41(7-8):447–52.
7. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology Baltim Md.* 2002 Jul;36(1):211–8.
8. Park Y, Lee J-H, Kim BS, Kim DY, Han K-H, Kim H-S. New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification. *J Clin Microbiol.* 2010 Jun;48(6):2253–6.
9. Song D, Kang JE, Kim SY, Hwang S-H, Kim HH, Lee EY, et al. [Evaluation of ARCHITECT HCV core antigen assay]. *Korean J Lab Med.* 2010 Dec;30(6):654–9.
10. Alados-Arboledas JC, López-Prieto MD, López-Cepero J. [Role of the new Architect HCV Ag® assay in the management of hepatitis C naïve patients]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2013 May;31(5):351–2.
11. Li Cavoli G, Zagarrigo C, Schillaci O, Servillo F, Tralongo A, Coglitore M, et al. Hepatitis C virus core antigen test in monitoring of dialysis patients. *Hepat Res Treat.* 2012;2012:832021.
12. Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu MG, 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. 2011 Dec;49(12):4089–93.

13. Hadziyannis E, Minopetrou M, Georgiou A, Spanou F, Koskinas J. Is HCV core antigen a reliable marker of viral load? An evaluation of HCV core antigen automated immunoassay. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol*. 2013;26(2):146–9.

14. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*. 1991 Mar;65(3):1105–13.

15. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359–62.

16. Lindenbach BD. Virion Assembly and Release. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:199–218.

17. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 1992 Mar;66(3):1476–83.

18. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan S-L, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* [Internet]. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006 [cited 2013 Sep 4]. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1630/>

19. WHO fact sheet#164. Hepatitis C. Geneva: World Health Organization; 2012. 2012.

20. Clausen LN, Lundbo LF, Benfield T. Hepatitis C virus infection in the human immunodeficiency virus infected patient. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Sep 14;20(34):12132–43.

21. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Feb;17(2):107–15.

22. Negro F. Epidemiology of hepatitis C in Europe. *Dig Liver Dis*. 2014 Dec 15;46:S158–S164.

23. Huarte MP, Casi MA. [Virology, diagnostic tests, epidemiology and transmission mechanisms of hepatitis C virus infection]. *An Sist Sanit Navar*. 2004;27 Suppl 2:41–9.

24. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV

- seroprevalence. *Hepatology*. 2013 Apr 1;57(4):1333–42.
25. Barril G, Traver JA. Decrease in the hepatitis C virus (HCV) prevalence in hemodialysis patients in Spain: effect of time, initiating HCV prevalence studies and adoption of isolation measures. *Antiviral Res*. 2003 Oct;60(2):129–34.
26. Bain C, Inchauspé G. [Dendritic cells and hepatitis C virus]. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 Jul;49(6):464–5.
27. Sung VM-H, Shimodaira S, Doughty AL, Picchio GR, Can H, Yen TSB, et al. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol*. 2003 Feb;77(3):2134–46.
28. Bradley D, McCaustland K, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J Med Virol*. 1991 Jul;34(3):206–8.
29. Lange CM, Jacobson IM, Rice CM, Zeuzem S. Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. *EMBO Mol Med*. 2014 Jan;6(1):4–15.
30. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7271–6.
31. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 15;88(8):3392–6.
32. Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res*. 2007 Aug;127(2):131–50.
33. Mas A, Ulloa E, Bruguera M, Furcić I, Garriga D, Fábregas S, et al. Hepatitis C virus population analysis of a single-source nosocomial outbreak reveals an inverse correlation between viral load and quasispecies complexity. *J Gen Virol*. 2004 Dec;85(Pt 12):3619–26.
34. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 15;89(8):3468–72.
35. Klenerman P, Fleming V, Barnes E. What are the prospects for controlling

hepatitis C? PLoS Med. 2009 Jun 16;6(6):e1000096.

36. Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2009;510:33–53.
37. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):103–26.
38. Ramia S, Eid-Fares J. Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Middle East. *Int J Infect Dis*. 2006 Jul 1;10(4):272–7.
39. Gismondi MI, Becker PD, Díaz Carrasco JM, Guzmán CA, Campos RH, Preciado MV. Evolution of hepatitis C virus hypervariable region 1 in immunocompetent children born to HCV-infected mothers. *J Viral Hepat*. 2009 May;16(5):332–9.
40. Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrazin C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2005 Feb;32(2):86–91.
41. Chen SL, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Int J Med Sci*. 2006 Apr 1;3(2):47–52.
42. Lauer. Hepatitis C Virus Infections. *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 1 · July 5, 2001.
43. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012 Aug;26(4):401–12.
44. Haber MM, West AB, Haber AD, Reuben A. Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1995 Aug;90(8):1250–7.
45. Mur JIE, S. Sauleda Oliveras. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29Supl 2:107–12.
46. Peterson J, Green G, Iida K, Caldwell B, Kerrison P, Bernich S, et al. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative “window” phase of hepatitis C infection. *Vox Sang*. 2000;78(2):80–5.
47. Lee SR, Peterson J, Niven P, Bahl C, Page E, DeLeys R, et al. Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of “window-phase” blood donations. *Vox Sang*. 2001 Jan;80(1):19–23.
48. Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, Durando P, Lee S, de Luigi C, et al. Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. *J Clin Microbiol*.

2001 Sep;39(9):3110–4.

49. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Use of virologic assays in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*. 2005 Aug;9(3):371–382, v.

50. Pawlotsky J-M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*. 2002 May;122(6):1554–68.

51. García-Retortillo M, Fornis X. [Genomic variability and natural history of hepatitis C virus infection]. *Gastroenterol Hepatol*. 2002 Oct;25(8):514–20.

52. Iñarrairaegui M, Elizalde I, Martínez Echeverría A, Zozaya JM, Beloqui R, Martínez-Peñuela JM. Chronic Hepatitis C virus infection. *An Sist Sanit Navar*. 2004 Jan;27:69–81.

53. Chevaliez S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Feb;17(2):116–21.

54. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1802–8.

55. Veillon P, Payan C, Picchio G, Maniez-Montreuil M, Guntz P, Lunel F. Comparative evaluation of the total hepatitis C virus core antigen, branched-DNA, and amplicor monitor assays in determining viremia for patients with chronic hepatitis C during interferon plus ribavirin combination therapy. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3212–20.

56. Tillmann HL. Hepatitis C virus core antigen testing: role in diagnosis, disease monitoring and treatment. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Jun 14;20(22):6701–6.

57. Recommended Testing Sequence for Identifying Current Hepatitis C Virus (HCV) Infection [Internet]. Available from:

http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/PDFs/hcv_flow.pdf

58. Muerhoff AS, Jiang L, Shah DO, Gutierrez RA, Patel J, Garolis C, et al. Detection of HCV core antigen in human serum and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. *Transfusion (Paris)*. 2002 Mar;42(3):349–56.

59. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2005 Feb;32(2):92–101.

60. Tillmann HL, Wiegand J, Glomb I, Jelineck A, Picchio G, Wedemeyer H, et al. Diagnostic algorithm for chronic hepatitis C virus infection: role of the new HCV-core antigen assay. *Z Für Gastroenterol.* 2005 Jan;43(1):11–6.
61. INNO-LIA HCV Score [Internet]. Available from: http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/IGT_/80538.20110309.pdf
62. Pawlotsky J-M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatol Baltim Md.* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S65–73.
63. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:54–60.
64. Laperche S, Le Marrec N, Girault A, Bouchardeau F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreuil M, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):3877–83.
65. Thomson EC, Nastouli E, Main J, Karayiannis P, Eliahoo J, Muir D, et al. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *AIDS Lond Engl.* 2009 Jan 2;23(1):89–93.
66. Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostaing L, Izopet J. Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2010 May;48(1):18–21.
67. Fabrizi F, Lunghi G, Aucella F, Mangano S, Barbisoni F, Bisegna S, et al. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):414–20.
68. Medici MC, Furlini G, Rodella A, Fuertes A, Monachetti A, Calderaro A, et al. Hepatitis C virus core antigen: analytical performances, correlation with viremia and potential applications of a quantitative, automated immunoassay. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2011 Aug;51(4):264–9.
69. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1161–8.
70. Jawaid A, Khuwaja AK. Treatment and vaccination for hepatitis C: present and future. *J Ayub Med Coll Abbottabad JAMC.* 2008 Mar;20(1):129–33.

71. Comunicado de prensa de Inovio Pharmaceuticals, Inc 09/01/2013: Inovio Pharmaceuticals to Initiate Clinical Trial for its Hepatitis C Therapeutic Vaccine (INO-8000) Later this Year. Available from: <http://ir.inovio.com/2013-01-09-Inovio-Pharmaceuticals-to-Initiate-Clinical-Trial-for-its-Hepatitis-C-Therapeutic-Vaccine-INO-8000-Later-this-Year>.
72. European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014 Feb;60(2):392–420.
73. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2011 Aug;55(2):245–64.
74. Molina Pérez E, Fernández Castroagudín J, Domínguez Muñoz E. [Current indications for triple therapy in hepatitis C virus infection]. *Gastroenterol Hepatol*. 2012 Apr;35(4):266–77.
75. Criterios y recomendaciones generales para el tratamiento con boceprevir y telaprevir de la hepatitis crónica C (VHC) en pacientes monoinfectados [Internet]. 2012. Available from: http://www.msssi.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/TRATAMIENTO_HEPATITIS_CRONICA_C.pdf
76. Informe de Posicionamiento Terapéutico de Sofosbuvir [Internet]. Available from: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-sofosbuvir-sovaldi.pdf>
77. Informe de Posicionamiento ® Terapéutico de Simeprevir [Internet]. Available from: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-simeprevir-olysio.pdf>
78. OMS. Coordinación del Reglamento Sanitario Internacional Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2013–2014 [Internet]. Available from: http://www.uab.cat/doc/guiaref_transport_OMS
79. Cobas ® Ampliprep / Cobas® Taqman HCV test (Roche Diagnostics S.L). P/N: 03568547 190.
80. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L, Centers for Disease Control and Prevention.

Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Reports Morb Mortal Wkly Rep Recomm Reports Centers Dis Control. 2003 Feb 7;52(RR-3):1–13, 15; quiz CE1–4.

81. Ohsawa M, Kato K, Itai K, Tanno K, Fujishima Y, Konda R, et al. Standardized Prevalence Ratios for Chronic Hepatitis C Virus Infection Among Adult Japanese Hemodialysis Patients. *J Epidemiol*. 2010 Jan 5;20(1):30–9.

82. Manual práctico de tratamiento de las hepatitis crónicas víricas del Servicio de Medicina Interna del hospital Juan Canalejo de La Coruña.

83. M. Molina Arias. Características de las pruebas diagnósticas. *Rev Pediatr Aten Primaria* 2013;15:169-73.

84. Moscato GA, Giannelli G, Grandi B, Pieri D, Marsi O, Guarducci I, et al. Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C. *Intervirology*. 2011 Feb;54(2):61–5.

85. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria [Internet]. Available from:

http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/PROTOCOLOS_RENAVE.pdf

86. Yuksel P, Caliskan R, Ergin S, Aslan M, Celik DG, Saribas S, et al. New approaches to in vitro diagnosis of hepatitis C infection a reason for post transfusion hepatitis: Diagnostic value of determination of hepatitis C virus core antigen. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. 2011 Dec;45(3):247–50.

87. Vermehren J, Susser S, Berger A, Perner D, Peiffer K-H, Allwinn R, et al. Clinical utility of the ARCHITECT HCV Ag assay for early treatment monitoring in patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2012 Sep;55(1):17–22.

88. Kuo Y-H, Chang K-C, Wang J-H, Tsai P-S, Hung S-F, Hung C-H, et al. Is hepatitis C virus core antigen an adequate marker for community screening? *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):1989–93.

89. Dawson GJ. The potential role of HCV core antigen testing in diagnosing HCV infection. *Antivir Ther*. 2012;17(7 Pt B):1431–5.

90. Ottiger C, Gygli N, Huber AR. Detection limit of architect hepatitis C core antigen assay in correlation with HCV RNA, and renewed confirmation algorithm for reactive anti-HCV samples. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2013 Nov;58(3):535–40.
91. Reyes-Méndez MÁ, Juárez-Figueroa L, Iracheta-Hernández P, Medina-Islas Y, Ruiz-González V. Comparison of two diagnostic algorithms for the identification of patients with HCV viremia using a new HCV antigen test. *Ann Hepatol*. 2014 Jun;13(3):337–42.
92. Garbuglia AR, Monachetti A, Galli C, Sabatini R, Ferreri ML, Capobianchi MR, et al. HCV core antigen and HCV-RNA in HIV/HCV co-infected patients with different HCV genotypes. *BMC Infect Dis*. 2014;14:222.
93. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Bouvier-Alias M, Pawlotsky J-M. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2014 Sep;61(1):145–8.
94. Buket CA, Ayşe A, Selçuk K, Süleyman Ö, Emel SÇ. Comparison of HCV core antigen and anti-HCV with HCV RNA results. *Afr Health Sci*. 2014 Dec;14(4):816–20.
95. Vanhomerig JW, van de Laar TJW, Koot M, van Rooijen MS, Schinkel J, Speksnijder AGCL, et al. Evaluation of a hepatitis C virus (HCV) antigen assay for routine HCV screening among men who have sex with men infected with HIV. *J Virol Methods*. 2015 Mar;213:147–50.
96. Mixson-Hayden T, Dawson GJ, Teshale E, Le T, Cheng K, Drobeniuc J, et al. Performance of ARCHITECT HCV core antigen test with specimens from US plasma donors and injecting drug users. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2015 May;66:15–8.
97. Real Decreto-ley 9/2014 [Internet]. Available from:
<http://www.boe.es/boe/dias/2014/07/05/pdfs/BOE-A-2014-7065.pdf>
98. Criterios de selección del donante de órganos respecto a la transmisión de infecciones [Internet]. 2004. Available from:
<http://www.ont.es/infesp/DocumentosDeConsenso/infecciondonante.pdf>
99. Real Decreto 1088/2005. BOE 2005; 225:31288-31304. [Internet]. Available from: <http://www.boe.es/boe/dias/2005/09/20/pdfs/A31288-31304.pdf>