

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**Estudio comparativo entre los métodos IRMA y ELISA, para la
determinación de hepatitis "C" en los bancos de sangre de los hospitales
nacionales de la región nor-oriental del país
(Zacapa y Chiquimula)**

**Informe de tesis
Presentado por:**

Doris Lisbeth Barrera González

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, marzo del 2002

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
06
(294)

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	Licda HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	Lic. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	Dr. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	Dr. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	Dr. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTINEZ
VOCAL IV	Br. CESAR ALFREDO FLORES LOPEZ
VOCAL V	Br. MANUEL ANIBAL LEAL GOMEZ

ACTO QUE DEDICO

**A Dios
Todopoderoso**

A la Virgen María

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala
En especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**A mis padres
Julio Barrera
Thelma de Barrera**

**A mis hermanos
Julio y Karina**

**A mi abuelita
Belarmina Barrera**

**A mis tios y primos
Con mucho cariño**

**A mis compañeros y amigos
Todos en especial**

AGRADECIMIENTOS

Al Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar por su asesoría y apoyo incondicional en la realización de este trabajo de tesis.

Al financiamiento proporcionado por la Dirección General de Investigación –DIGI- de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Dirección General de Energía y Minas, Sub Dirección de Energía por el aporte de los reactivos, en especial a la Licenciada Diana Freire de Nave por su colaboración, al Instituto de Investigación de Químicas y Biológicas –IIQB-, en especial a Miriam Maritza Melchor. A los Directores de los Hospitales Nacionales de Zacapa y Chiquimula por dejar usar sus instalaciones y para recolección de muestras y muy especial a la Licda. Ana Cecilia Barrientos por su infinita colaboración durante la investigación.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

INDICE

CONTENIDO	Pag.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1 HEPATITIS VIRAL.....	3
3.2 HEPATITITS C.....	3
3.2.1 DEFINICIÓN (HCV).....	4
3.2.2 ORGANIZACIÓN GENOMICA.....	4
3.2.3 SINTOMAS.....	5
3.2.4 DIAGNOSTICO.....	5
3.2.5 TRATAMIENTO.....	10
3.2.6 EPIDEMIOLOGIA.....	11
4. JUSTIFICACION.....	13
5. OBJETIVO.....	14
6. HIPOTESIS.....	15
7. MATERIALES Y METODOS.....	16
7.1 UNIVERSO DE TRABAJO.....	16
7.2 RECURSOS HUMANOS.....	16
7.3 RECURSOS INSTITUCIONALES.....	16
7.4 RECURSOS MATERIALES.....	16
7.5 PREPARACION DE REACTIVOS.....	17
7.6 PROCEDIMIENTO.....	18
7.7 CRITERIOS DE EXCLUSION.....	19
7.8 CALCULO DE CORTE.....	20
7.9 ENSAYO INMUNOENZIMATICO.....	21
7.10 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	22
8. RESULTADOS.....	23
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	24
10. CONCLUSIONES.....	25
11. RECOMEDACIONES.....	26
12. REFERENCIAS.....	28
13. ANEXOS.....	31

1. RESUMEN

El virus de la Hepatitis C (HCV), se transmite principalmente a través de la sangre y derivados así como fluidos del cuerpo .

Dentro de los métodos para determinación de Hepatitis C; en los bancos de sangre de Guatemala se encuentran el de ELISA (Inmunoensayo enzimático) y el de IRMA (Radioinmunoensayo), ambas pruebas de tamizaje.

El presente estudio consistió en comparar sensibilidad, especificidad, tiempo de corrimiento, accesibilidad y precio a los métodos IRMA (reactivos donados por la Dirección de Energía, de Laboratorios Chiron) y ELISA de Almar Diagnostics para la determinación de hepatitis C en los donadores de los Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales de Zacapa y Chiquimula.

Se analizaron un total de 656 muestras las que corresponden 357 de Zacapa y 299 de Chiquimula en el período de enero a junio del año 2,001 . Los resultados obtenidos fueron 4 positivos (0.6 por ciento) por ambos métodos, 2 positivos (0.56 por ciento) para cada departamento y 652 negativos (99.4 por ciento) por ambos métodos.

Los resultados obtenidos en la investigación demuestran que son altamente comparables los métodos IRMA Y ELISA, según la tabla de Interpretación de varios valores de Kappa (K), para esto se tomó en cuenta el resultado de $K=1$ que se hizo por medio de la tabla 2x2.

Se concluyó que el método de IRMA es 100 por ciento específico y sensible, pero poco accesible a Hospitales Departamentales.

El método ELISA se debe continuar utilizando por su fácil acceso en equipo y reactivos en los Hospitales Nacionales.

2. INTRODUCCION

La hepatitis "C" es una infección viral de importancia clínica ya que puede evolucionar a una hepatitis crónica activa, cirrosis hepática e incluso a carcinoma hepatocelular (1,2).

Estudios realizados indican que el virus de hepatitis "C" es transmitido por vía parenteral, afectando a pacientes tratados con factor VIII, hemodializados, y principalmente como consecuencia de transfusiones sanguíneas (3,4).

La hepatitis "C" en muchos casos es asintomática, el paciente sólo manifiesta una mínima elevación de las enzimas hepáticas (ALT) y en menos del 25 por ciento de los pacientes se presenta ictericia (5).

El presente estudio consistió en la comparación de los métodos IRMA (reactivos donados por la Dirección de Energía, de Laboratorios Chiron) y ELISA de Almar Diagnostics, con respecto a concordancia, accesibilidad, precio, tiempo, especificidad y sensibilidad, para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis "C" en donadores que acudieron a los Hospitales Nacionales de Zacapa y Chiquimula durante los meses de enero a junio del año 2001.

La base de datos se manejó por Epi-Info, este es un paquete estadístico que permite crear archivos de datos, analizarlos y hacer reportes (6).

3. ANTECEDENTES

3.1 HEPATITIS VIRAL

La hepatitis es una inflamación aguda del hígado. Puede ser producida por una infección viral, por sustancias tóxicas o por fármacos. Los virus que infectan el hígado son de varios tipos. Algunos de ellos inducen, no en todos los pacientes, inmunidad para toda la vida, pero sólo para ese tipo de virus. Desde una perspectiva virológica cada agente es único pero generalmente no pueden ser diferenciados basándose sólo en la presentación clínica debiendo recurrirse a una serie de marcadores, antígenos y/o anticuerpos, detectados en el suero del paciente (7).

Los virus causantes de hepatitis pueden ser divididos de acuerdo a la forma de contagio en dos grandes grupos: los que se transmiten por vía digestiva, alimentos, aguas, etc., y los de transmisión parenteral como transfusiones, agujas compartidas, y no parenteral como vía sexual, vía materno-fetal (7).

Dentro del primer grupo encontramos al virus de la Hepatitis A (HAV) y al virus de la Hepatitis E (HEV) y en el segundo grupo se encuentran los virus de la Hepatitis B (HBV) y el virus de la Hepatitis C (HCV) (7).

Otros virus que ocasionalmente inducen hepatitis son citomegalovirus y el virus Epstein-Barr (7,8).

3.2 HEPATITIS C

En el año 1975 se demostró claramente que algunas de las hepatitis virales post-transfusionales no eran causadas por el virus de hepatitis B por lo que se le llamó hepatitis no A no B (HNANB), usando métodos biológicos y moleculares sofisticados, se ha designado al virus de la

hepatitis no A no B como virus de la hepatitis C (HCV). Esta infección afecta aproximadamente 170,000 Estadounidenses cada año (9,10).

3.2.1 DEFINICION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (HCV)

El genoma del virus de la hepatitis C está constituido de un ARN monocatenario, de polaridad positiva, de aproximadamente 9,300 nucleótidos. El virión mide 50 a 60 nanómetros de diámetro y está provisto de un recubrimiento de glicoproteínas. Su peso molecular es aproximadamente de 4×10^6 daltones. Por sus características genéticas esta incluido entre la familia *Flaviviridae* (11).

3.2.2 ORGANIZACIÓN GENOMICA

Al igual que los miembros de la familia *Flaviviridae* el HCV tiene genes que codifican para proteínas estructurales y las no estructurales.

- Genes de estructura situados en la región 5' que codifican: la nucleocápside (c), proteínas de membrana y glicoproteínas de recubrimiento.
- Genes que codifican las proteínas no estructurales: NS1, NS3, NS4 Y NS5.

Las funciones de estas diferentes proteínas no estructurales son poco conocidas. La NS1 tiene un papel en la fijación del complemento, la región NS2 y NS4 en la fijación a la membrana celular, la región NS3 tiene una función en la polimerasa o replicasa (11,12).

Una de las proteínas utilizadas en la prueba inmunoenzimática que se ensaya actualmente para la investigación de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, corresponde a una proteína no estructural llamada c-100-3, codificada por una parte del genoma correspondiente a las regiones NS3-NS4. Es sobre todo en la región 3' que el virus de la hepatitis C presenta homología a las estructuras con los flavivirus, sin embargo la región 5' es bastante diferente (11,13).

3.2.3 SINTOMAS

El virus de la hepatitis C se transmite principalmente a través de la sangre, derivados de sangre y fluidos del cuerpo. Las personas con mayor riesgo de infectarse son: pacientes que se someten a repetidas transfusiones de sangre, hemodiálisis, personal de salud y drogadictos intravenosos (10).

Ciertos pacientes sufren una infección de leve a moderada, que desaparece sin necesidad de tratamiento. Cuando la infección continua por seis meses o más se conoce como Hepatitis C crónica, que puede caracterizarse por cansancio y alteración de la función hepática. Quienes tienen mayor riesgo de desarrollo cirrosis o cáncer del hígado (10).

Algunos pacientes con hepatitis C no experimentan síntomas, mientras otros sufren; fiebre, vómitos, dolor abdominal, y pueden presentar cambios en el color de la excreta y/u orina (10).

De igual manera, es posible que los pacientes con hepatitis C crónica no presenten síntomas. Cuando éstos ocurren, pueden incluir: cansancio, irritabilidad, náusea, pérdida del apetito, dolores musculares, dolor de cabeza y dolor en las articulaciones (10).

3.2.4 DIAGNOSTICO

Durante la década de los años 80, la autoexclusión voluntaria de los donantes de sangre con factores de riesgo para el SIDA y, posteriormente, la implementación del control de los donadores para identificar anti-HIV, redujo a menos del 5 por ciento de la posibilidad de adquirir una hepatitis postransfusional. Durante los últimos años de la década de los 80 y primeros de los 90 en Estados Unidos se introdujeron pruebas de detección de la hepatitis B, que incluía la determinación de enzimas alanino aminotrasferasa (ALT), antígeno de superficie del HBV y anticuerpos contra el core del HBV, que identificaban donantes de sangre con una probabilidad elevada de transmitir hepatitis B a los

receptores y, posteriormente, tras el descubrimiento del HCV, los inmunoanálisis de la primera generación para tamizar la presencia de anti-HCV. Con ello se redujo aún más la incidencia de hepatitis postransfusional. Un análisis prospectivo de la hepatitis postransfusional realizado entre 1986 y 1990 demostró que la incidencia de este tipo de hepatitis en un hospital universitario urbano cayó del 3.8 por ciento (0.45% por unidad transfundida) al 1.5 por ciento (0.19% por unidad) tras la introducción de las pruebas anteriormente mencionadas y al 0.6 por ciento (0.03% por unidad) cuando se empezaron a utilizar los análisis de detección de anti-HVC de primera generación. La aplicación de los análisis de segunda generación para detección de anti-HCV reducirá aún más la frecuencia de la hepatitis C postransfusional, incluso hasta tasas casi indetectables (14).

3.2.4.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

3.2.4.1.1 Métodos Inmunoensayo Enzimático

Actualmente son los de mayor uso. Contienen una mezcla de péptidos sintéticos o recombinantes, o una combinación de ambos, con los que se detectan los anticuerpos IgG en la muestra sérica. Cuando se indica que un suero es reactivo con esta metodología se afirma que tiene anticuerpos para alguno o todos los antígenos empleados en la prueba, pero no se sabe frente a cual o cuales. Con el empleo de estas pruebas se ha acortado el período de ventana de las primoinfecciones a unas cuatro semanas y en el 80% de los casos el paciente es seropositivo a la cuarta semana del comienzo de la enfermedad (15).

Se ha detectado respuesta de tipo IgM contra el antígeno del "core", NS3 Y NS4, que habitualmente coincide en el tiempo con la respuesta de tío IgG. La respuesta más intensa de IgM está dirigida contra el antígeno del "core" y en algunos casos es el primer marcador que aparece tras la infección por el virus. La duración de la respuesta de IgM es la fase

crónica de la enfermedad. En cualquier caso no se ha demostrado que la determinación de IgM anti-HCV en el diagnóstico de la infección aporte datos claros y concluyentes sobre la biología o estadio de la infección viral (15,16).

La especificidad de este método puede definirse como la capacidad de detectar como no reactivas muestras procedentes de una población con bajo riesgo de infección. Se ha encontrado que la especificidad de la prueba de ELISA para la detección del antígeno c100-3 es del 95 por ciento. La sensibilidad puede definirse como la capacidad de detectar como reactivas aquellas muestras procedentes de personas con enfermedad conocida asociada al virus de la hepatitis "C". Así se conoce que la sensibilidad de la prueba de ELISA para este tipo de hepatitis es del 95 por ciento (21).

Se ha probado que éstas pruebas de anti-HCV son altamente sensibles y específicas, pero depende mucho del estado del paciente y la etapa en la que se encuentre la hepatitis "C" para obtener resultados negativos o positivos. Los casos falsos negativos de anti-HCV pueden ser cuando todavía no hay una respuesta inmune, no detectable si no se usan ensayos de tercera generación. Los niveles bajos detectables de anticuerpos se pueden dar más en la enfermedad aguda, autolimitante, en donde el virus puede permanecer por poco tiempo (22).

Valores negativos se pueden obtener también en los pacientes en remisión como consecuencia de terapia con esteroides (23).

3.2.4.1.2 Radioinmunoensayo:

En este ensayo, un anticuerpo se marca con el isótopo y no el antígeno. Dicho anticuerpo marcado reacciona directamente con el suero para la detección del antígeno específico, por lo que la concentración de este es directamente proporcional a la cantidad de emisión radioactiva (16).

La prueba utilizada en este estudio, es una prueba de IRMA tipo "sándwich" simple en la péptidos sintéticos del HCV capturados en copas de poliestireno reaccionan con anticuerpos totales presentes en el suero. Una vez capturados los anticuerpos específicos se procede a la detección de las inmunoglobulinas tipo G (IgG) con anti-IgG humana de cabra marca con I¹²⁵. Las lecturas de radioactividad se realizan en un contador gamma (16).

3.2.4.1.3 Pruebas Confirmatorias de Anticuerpos

Estas pruebas están diseñadas para conocer individualmente que antígenos virales son los responsables de la reactividad obtenida mediante una prueba de ELISA convencional. Se realiza sobre un soporte de nitrocelulosa a la que se han adherido estos péptidos en diferentes lugares. La adición de la muestra y su revelado pondrá de manifiesto los péptidos que generaron anticuerpos (17).

3.2.4.1.3.1 Confirmación por Inmunoensayo Lineal

Este método de confirmación se basa en la captura de anticuerpos totales contra HCV en cinco pozos recubiertos por separado con péptido sintéticos de proteína estructurales y no estructurales de virus y una proteína recombinante (17).

A continuación se presentan los antígenos utilizados en cada uno de los pozos:

Tipo de Placa (Poliestireno)	Antígenos
C-1	Péptido sintético de Core número 1 (PEPC-1)
C-2	Péptido sintético de Core número 2 (PEPC-2)
NS4-1	Péptido sintético de la proteína no estructural 4 (PEPNS4-1)
NS5-1	Péptido sintético de la proteína no estructural 5 (PEPNS5-1)
NS3	Proteína recombinante de la región no estructural 3 (NS3)

Una vez capturados los anticuerpos específicos, se detectan las inmunoglobulinas tipo G (IgG) con un anticuerpo anti-IgG humana marcado con I^{125} y se determina el número de cuentas de radiación gamma por minuto (cpm) en cada uno de los pozos (18).

Del el 97 al 99 por ciento de los sueros anti-HCV ELISA positivos tienen la prueba confirmatoria positiva (17).

3.2.4.1.4 Detección del RNA del Virus de la Hepatitis C.

Su detección directa mediante técnicas de hibridación convencional de ácido nucleico es técnicamente difícil, pero el RNA-HCV puede ser detectado por técnicas de amplificación como la reacción en cadena de polimerasas (PCR). El RNA del virus en el suero una o dos semanas después de la transfusión se encuentra presente en forma transitoria en la hepatitis aguda y de manera indefinida cuando la evolución es crónica. El RNA-HCV detectado por PCR es el mayor predictor del estado infeccioso, y esa prueba constituye el único método que permite diagnosticar con mayor certeza la transmisión del HCV así como vigilar la respuesta al tratamiento antiviral (15,19,20).

3.2.4.1.5 RIBA

También se encuentra en el mercado la prueba de RIBA, este ensayo utiliza una técnica de "inmuno-blotting" permitiendo la detección cualitativa de anticuerpos dirigidos contra dos proteínas no estructurales del virus de la hepatitis "C". En las pruebas de segunda generación se utilizan cuatro proteínas recombinantes, (C100-3, 5-1-1, C33C y C22-3).

El RIBA parece más específico que el ELISA aunque quizá menos sensible. El ELISA detecta los anticuerpos dirigidos contra las proteínas C-100-3, C-200 y C22-3. El RIBA de confirmación permite identificar en inmunoblotting los anticuerpos anti-HCV dirigidos respectivamente contra las proteínas 5-1-1, C-100-3, C33C y C22-3 (24).

Estos análisis serológicos son muy sensibles y se positivizan de manera más precoz luego de una hepatitis aguda. También es posible que

persistan por más tiempo los anti C-100-3, aun en caso de cura de la hepatitis, en particular para los anti C22-3 (24).

3.2.5 TRATAMIENTO

Los Interferones son glicoproteínas que ejercen una variedad de efectos biológicos: inducen la resistencia a las infecciones vírales y la regulación de otras funciones celulares, incluyendo la proliferación y respuesta inmunológica. Existen tres tipos de interferón humano: alfa, beta y gamma. El tratamiento llevado a cabo actualmente para hepatitis "C" se basa en la administración de una recombinación de alfa interferón en dosis de uno a tres millones de unidades, tres veces a la semana por veinticuatro semanas. Se ha demostrado una mayor eficacia utilizando tres millones de unidades con un porcentaje de mejoría del 46 por ciento comprobada contra veintidós por ciento cuando se utiliza un millón (25). El tratamiento con alfa interferón recombinante puede disminuir la inflamación y la necrosis hepática, asimismo es capaz de disminuir los niveles de alanino aminotransferasa en el suero (26).

Balart y colaboradores usaron el alfa interferón para el tratamiento de 166 pacientes infectados con el virus de hepatitis C quienes desarrollaron cronicidad con elevación de alanino aminotrasferasa, encontraron que la dosis de tres millones de unidades por veinticuatro semanas logra disminuir en 52 por ciento de los pacientes los niveles de ALAT así como la mejoría clínica del individuo (27).

Estudios recientes muestran que en diferentes partes del mundo la administración de suero comercial inmune de gamaglobulina (ISG) antes de la transfusión sanguínea disminuye significativamente la incidencia, severidad y complicaciones de hepatitis C, en contraste, pacientes tratados con ISG después de ser expuestos al virus, mostraron una menor protección respecto a aquellos individuos pre-inmunizados (28).

3.2.6 EPIDEMIOLOGIA

En la década de 1980, esta hepatitis constituyó el 6 por ciento de todos los casos informados de hepatitis en Estados Unidos (5).

Se ha estimado que el 54 por ciento (en un rango de 10 a 70 por ciento) de individuos con el HCV desarrollaron una infección crónica, y muchos de ellos terminan en cirrosis y carcinoma hepatocelular (29).

En los Estados Unidos se presentó un estudio el cual reporta una prevalencia de HCV del cinco por ciento en donadores de banco de sangre para el año de 1990. El método que se utilizó es la modificación de la reacción de la cadena polimerasa (PCR) (30)

Quiñonez y Lemus, en 1990, realizaron un estudio con donadores seleccionados en el Hospital General de Enfermedad Común del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social. Dicho estudio se basó en el método ELISA de segunda generación encontrándose 1.4 por ciento de anti-HCV. Los autores sugieren que se utilice ELISA como método de tamizaje para determinar anticuerpos contra el HCV en la selección de donadores en este país (31).

En 1991, Arana Batres estudió 141 donadores del banco de sangre del Hospital Roosevelt. Utilizando generación encontró una seroprevalencia de 3.54 por ciento para HCV (1).

En 1993, Luján trabajando con los donadores del Banco de Sangre del Hospital General de Enfermedades del IGSS. Encontró una prevalencia de infección por HCV de 1.32 por ciento, siendo la mayoría de los casos positivos, donadores remunerados (32).

En 1994, Crespo realizó un estudio en una clínica para enfermedades de transmisión sexual, siendo la población analizada los pacientes que acuden a esa clínica. Encontró una prevalencia para anticuerpos contra HCV de 1.5 por ciento (33).

En 1994, Sánchez entre otras pruebas encontró un prevalencia de infección por HCV de 0.17 por ciento en donadores que acuden al Banco

de Sangre del Hospital Roosevelt (34).

En 1994, un estudio realizado por Moguel en el Hospital General San Juan de Dios, se encontró una prevalencia de 1.01 por ciento de un total de 455 donadores tomados al azar (35).

En 1993, Malouf encontró una seroprevalencia de infección por HCV de 2.5 por ciento, en donadores de Banco de Sangre del Centro Medio Militar (36).

En 1995, Cruz Leal determinó la prevalencia de hepatitis "C" en donadores que acuden en un Banco de sangre de la Ciudad de Guatemala (no se menciona el nombre del hospital), fue del 1 por ciento (37).

El Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, La Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y Dirección General de Energía y Minas realizaron un Estudio Epidemiológico e Implementación de Pruebas de tamizaje de Hepatitis C en Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales Roosevelt y San Juan de Dios; en la cual se encontró una prevalencia de anticuerpos contra el virus de Hepatitis C de 0.6 por ciento, de un total de 3,500 donadores(38).

En 1993-94 se realizó un estudio sobre las enfermedades transmitidas por transfusión sanguínea en los hospitales de Zacapa y Chiquimula, donde se investigó la prevalencia (ver tabla 1).

4. JUSTIFICACION

Actualmente en los Bancos de Sangre del interior del país se utiliza el método ELISA para determinación de Hepatitis "C", debido a alto grado de especificidad y sensibilidad y que el equipo, reactivos y procedimiento es accesible a los laboratorios. Otro método con alto grado de sensibilidad y especificidad y que se puede utilizar como prueba de tamizaje es IRMA

Con base a lo anterior es importante hacer la comparación entre el método IRMA y el método ELISA, en la determinación de Hepatitis "C" en donadores de Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales de la Región Nor-oriente del país (Zacapa y Chiquimula).

5. OBJETIVO

Comparar la sensibilidad, especificidad, y accesibilidad entre los métodos de IRMA y ELISA en la determinación de Hepatitis "C" en donadores de Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales de la Región Nor-Oriente del país (Zacapa y Chiquimula).

6. HIPOTESIS

Existe buena concordancia entre los métodos IRMA y ELISA para la Determinación de Hepatitis "C".

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

El universo de trabajo lo constituyeron los 656 sueros de donadores que acudieron a los Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales (Zacapa y Chiquimula).

7.2 RECURSOS HUMANOS

- Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar (Asesor)
- Br. Lisbeth Barrera González (Investigador)

7.3 RECURSOS INSTITUCIONALES

- Instituto de Investigación de Químicas Biológicas (IIQB).
- La Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala (DIGI).
- Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Dirección General de Energía y Minas
- Hospitales Nacionales (Zacapa y Chiquimula).

7.4 RECURSOS MATERIALES

RADIOINMUNOENSAYO:

- Tiras de poliestireno de 12 pozos recubiertas con antígenos de HCV
- (péptidos)
- Diluyente de muestra
- Tampón de lavado. (PBS 10 X 5% Tween 20)
- Diluyente del anticuerpo marcado
- Anti-IgG humana marcado con I¹²⁵
- Control positivo
- Control positivo de límite

- Control negativo

EQUIPO

- Micropipetas de 2 a 10 μ l y de 10 a 100 μ l de capacidad
- Puntas apropiadas para cada pipeta
- Pipetas graduadas de 10.0 ml
- Bomba de vacío o lavador automático de placas
- Tubos de plástico o vidrio 13x100 mm.
- Contador gamma
- Baño de maría
- Bases para 8 tiras de 12 pozos fondo plano.

7.5 PREPARACION DE REACTIVOS:

7.5.1 Preparación Diluyente de Muestra-Solución de Trabajo.

1. Disolver bien el contenido completo de un paquete de leche descremada en el total del volumen del diluyente de leche. Se guardó en refrigeración. La leche disuelta es estable por 15 días.
2. Mezclar 1 parte de la leche disuelta con 4 partes del diluyente de muestra (preparar diariamente). Ejemplos según el siguiente cuadro:

Cuadro 1: Volúmenes requeridos para la preparación del diluyente de muestra.

Número de Muestras (incluyendo controles)	Volumen de leche descremada disuelta (ml)	Volumen de diluyente de muestra (ml)
12	0.5	2.0
24	1.0	4.0
48	2.0	8
72	3	12
96	4	16

7.5.2. Dilución del anti IgG-humana marcada con I^{125}

Preparar una dilución de anticuerpo marcado según la indicación del lote. Se necesitan aproximadamente 10 ml de solución de anti IgG-humano para un placa de microtítulo de 96 pozos completa.

Ej: Si el lote indica una dilución de 1:200 y si se va a preparar 10 ml entonces:

Dividir volumen/dilución, $10 \text{ ml}/200 = 0.05 \text{ ml}$ o sea 50 ul .
Tomar 10 ml del diluyente para la proteína marcada y agregar 50 ul del Anti-IgG marcado con I^{125} .

7.6 PROCEDIMIENTO:

7.6.1. Procedimiento General:

1. Sacar los reactivos de la refrigeradora, permitiendo que alcanzaran la Ambiente. Si no se utiliza toda una tira se podía separar la cantidad de pozos necesarios y los no utilizados se guardaron nuevamente en refrigeración para utilizarse posteriormente.
2. Ordenar las tiras en el soporte.
3. Agregar 200 ul de diluyente de muestra ya preparado con la leche en cada pozo.
4. Agregar 10 ul de cada una de las muestras y controles (3 veces el control negativo, 2 veces el control positivo y 2 veces el control positivo de límite) en cada pozo.
5. Incubar la placa, en baño maría, $\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.
6. Aspirar el líquido con bomba de vacío dentro de un recipiente con hipoclorito de sodio (cloro comercial diluido 1:10). Lavar los pozos con la solución de lavado tres veces y 1 vez con sólo PBS. Después del último lavado se secaron bien.
7. Diluir el anticuerpo marcado en su respectivo diluyente, según lo indica el lote.
8. Agregar 100 ul de anti IgG-humana marcada con I^{125} diluida en cada pozo.

9. Incubar la placa a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.
10. Absorber el anticuerpo marcado dentro de un recipiente identificado como "material radiactivo", con hipoclorito de sodio. Se hizo el primer lavado sin que se rebalse el líquido sólo con PBS. Absorber dentro del mismo recipiente rotulado. Realizar tres lavados seguidos con PBS Tween 20 al 0.5% y una vez PBS 1X sólo.
11. Tomar las tiras y separar cada pozo, colocar dentro de un tubo plástico en el orden correspondiente.
12. Efectuar la lectura en el contador gamma.

7.7 CRITERIOS DE EXCLUSION:

1. Calcular el promedio de los controles negativos (CNX):

Ej: Control Negativo	CPM
No 1	86
2	95
3	48
Total	229

$$\text{CNX} = \text{Total cpm} / 3 = 76.3 \text{ cpm}$$

2. Calcular el rango 0.5 a 1.5 veces del valor del promedio de los controles negativos.

$$\text{Ej: } 0.5 \times 76.3 = 38.1 \quad 1.5 \times 76.3 = 114.4$$

Cualquier control negativo menor de 38.1 o mayor de 114.4 cpm debe ser eliminado, y si existe más de un valor fuera de rango, debe ser repetida la prueba.

3. Calcule el promedio de los controles positivos:

Ej: Control Positivo	CPM
No 1	4500
2	5200
Total	9700

$$\text{PCX} = \text{Total cpm} / 2 = 4850 \text{ cpm}$$

4. Calcular el rango 0.5 a 1.5 veces del valor del promedio de los controles negativos:

$$\text{Ej: } 0.5 \times 4850 = 2425 \qquad 1.5 \times 4859 = 7275$$

Si se llegara a descartar algún valor debe de calcularse nuevamente, sin incluir el valor eliminado, el promedio de las lecturas del control positivo (PCX) o del control negativo (NCX), de ser el caso.

5. El control positivo no debe dar lecturas menores a 2000 cpm, si esto sucede se debe repetir la prueba con una dilución menor del anticuerpo radiactivo.

6. Calcular del valor P/N:

Dividir el promedio de los controles positivos entre el promedio de controles negativos

$$P/N = PCX/NCX$$

$$P/N = 4850/76.3 = 63.5$$

Este valor debe ser al menos 10. Valores inferiores pueden sugerir deterioro de reactivos (controles, pozos) o dilución no adecuada del I^{125} , la prueba debe ser repetida.

7.8 CALCULO DEL CORTE E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

7.8.1 Cálculo del valor Límite:

1. Calcule el promedio de las lecturas de los controles negativos (NCX), sin los valores aberrantes.
2. Calcule el promedio de los controles positivos (PCX).
3. Multiplique el promedio de los controles positivos por 0.05 (5%) y sume el promedio de los controles negativos, así:

$$(PCX)(0.05) + (NCX) = (4850)(0.05) + 76.3 = 242 + 76.3 = 318.8$$

7.8.2 Interpretación de los resultados.

1. Valores superiores o iguales al valor límite deben tomarse como reactivos. Valores inferiores al valor límite deben tomarse como no reactivos.

2. Toda muestra reactiva debe repetirse para verificar el resultado. Valores muy cercanos al valor límite, se consideran dudosos y es necesario repetir la prueba.
3. Toda muestra positiva o dudosa debe ser reanalizadas y confirmadas por una metodología suplementaria antes de reportar el resultado.

7.8.2 Limitaciones de la Prueba

1. Por ser un método de tamizaje existen falsos positivos y falsos negativos.
2. Todo resultado positivo debe ser evaluado por una metodología de confirmación (método suplementario) antes de comunicarlo al individuo.

7.9 Inmunoensayo Enzimático:

7.9.1 Materiales:

1. Micropipetas y tips
2. Reloj con rango de 60 minutos
3. Papel absorbente
4. Microplacas para incubar en baño de maría a 37°C
5. Aparato para leer Micropozos a 450 nm. Y un filtro de 620-630 nm.
6. Lavador de microplacas.
7. Agua destilada.

7.9.2 Procedimiento:

1. Numerar los micropozos juntamente con el blanco.
2. Dispensar 200 μ l de control negativo y positivo en cada pozo en duplicado, no diluir los controles. 200 μ l de diluyente de muestra con 10 μ l de muestra en cada pozo mezclar. Incubar 45 minutos a 37°C.
3. Lavar la microplaca con un lavador automatico , aspirar 300 μ l del pozo con solución de lavado por 5 veces.
4. Pipetear 100 μ l del diluyente Enzima Conjugada, hechar al pozo excepto en el blanco, incubar la microplaca por 45 minutos a 37°C
5. Lavar los micropozos 3 veces.

6. Pipetear 100 μ l de TMB/H₂O₂ y hechar en cada pozo, incluir el blanco, incubar la microplaca en un cuarto a temperatura ambiente por 15 minutos.

7. Pipetear 100 μ l de solución de parada.

8. Leer a 450 nm.

7.9.10 Resultados:

Los resultados son calculados por el punto medio del cut-off, el valor se determina con la siguiente formula.

Control negativo punto medio OD450nm + 0.250

7.9.11 Interpretación de Resultados:

Los resultados son interpretados en proporción a la muestra OD450nm y el valor de cut-off o S/Co, conforme a la siguiente tabla.

S/Co	Interpretación
Menor de 1.0	Negativo
1.0-1.2	Equivocado
Mayor de 1.2	Positivo

7.10. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

MUESTREO:

1. Boleta de recolección de datos.
2. Tamaño de la muestra: 656 donadores

FORMA DE MUESTREO:

Todos los pacientes que asistieron como donadores a los bancos de sangre de los hospitales de Zacapa y Chiquimula.

VARIABLE A ESTUDIAR:

Presencia de anticuerpos contra Hepatitis C.

ANALISIS DE RESULTADOS:

1. Concordancia: Se analizó utilizando la técnica de Kappa o J. De Youden, tabla 2X2.

8. RESULTADOS

De 656 muestras 357 corresponden a Zacapa y 299 a Chiquimula, de las cuales 4 fueron positivos y 652 negativos para ambos métodos. No se obtuvieron resultados cruzados como positivos o negativos entre ambos métodos.

Los sueros positivos para ELISA dieron mayor de 1.2, el valor de referencia es mayor de 1.2, los positivos para IRMA fueron 200, 205, 199 y 216, siendo el punto de corte de 150, esto indica los altos títulos de anticuerpos contra HCV.

Se encontró un Índice de Concordancia de 1 (Kappa K), lo que demuestra el máximo acuerdo que existe entre los dos métodos, según la tabla Interpretación de varios valores de K.

INTERPRETATION OF VARIOUS VALUES OF K

K	INTERPRETATION
MENOR 0	NO AGREEMENT
0-0.19	POOR AGREEMENT
0.20-0.39	FAIR AGREEMENT
0.40-0.59	MODERATE AGREEMENT
0.60-0.79	SUBSTANTIAL AGREEMENT
0.80-1.00	ALMOST PERFECT AGREEMENT

Source: Landis and Koch (1977).

Siendo IRMA el método de referencia, se calculó la Sensibilidad, donde se obtuvo el 100 por ciento y una Especificidad de un 100 por ciento.

Se hizo una comparación de métodos en este estudio para determinar HCV, por medio de una tabla (Anexo 2).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Según el análisis de los resultados, los dos métodos ELISA e IRMA que fueron comparados en este estudio señalan que estas técnicas si tienen perfecta concordancia, debido a que el resultado del Índice de Concordancia es 1, esto se interpreto por medio de la tabla de varios valores de Kappa K.

Esto indica que se puede utilizar tanto una técnica como la otra, ya que las dos son específicas para la detección de HCV en este estudio, otro aspecto a evaluar es que se detectó solo positivos con altos títulos de anticuerpos.

Cada uno de estos métodos tiene una especificidad y sensibilidad, según estudios realizados se ha determinado que la prueba de ELISA es altamente sensible y específica para anti-HCV, pero esto depende el estado del paciente y la etapa en la que la hepatitis C se encuentra (22).

En lo que respecta a la sensibilidad y especificidad de la técnica IRMA determinada en este estudio es de 100 por ciento sensible, esto nos indica que va ha detectar casos falsos positivos debido a cualquier otra enfermedad, como casos verdaderos positivos y 100 por ciento específica, esto señala que el método es específico para detectar anti-HCV; estos datos se obtuvieron por medio del análisis de las 656 muestras.

Se hizo una comparación entre los métodos en este estudio, donde se puede analizar el precio, y accesibilidad con resultados similares, esto nos indica el alto grado de aceptación para la detección de anticuerpos con HCV, el tiempo es mejor en IRMA ya que cuenta con 1 hora y ELISA con 2 horas, con lo que respecta a la accesibilidad de reactivos y aparatos es más fácil ELISA por que cualquier casa comercial se vende en cambio IRMA es más difícil de conseguir en Guatemala (Anexo 2).

Es importante mencionar que el método IRMA se ha utilizado en varios estudios, para determinar la prevalencia de hepatitis C, entre estos podemos mencionar el trabajo realizado en los Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales San Juan de Dios y Roosevelt con una prevalencia de 0.60 y 0.2 por ciento respectivamente (38).

La investigación realizada en La Unidad Nacional de Atención al Enfermo Renal Crónico (UNAERC), con pacientes hemodializados reportó una prevalencia de 3 por ciento (40).

10. CONCLUSIONES

- En este estudio hubo perfecta concordancia entre los métodos de IRMA y ELISA en la determinación de hepatitis "C"
- Los métodos IRMA y ELISA en este estudio son útiles para el tamizaje de donadores de los Bancos de Sangre, debido a su alta sensibilidad y especificidad.
- El método de IRMA es poco accesible por el precio y el equipo utilizado, como para implementarlo en Hospitales Nacionales.

11. RECOMENDACIONES

- El método IRMA, se puede incluir como prueba de tamizaje en los Bancos de Sangre de los Hospitales Nacionales de la ciudad capital (Hospital Roosevelt y Hospital San Juan de Dios), donde existe una unidad de Energía Nuclear y contador Gamma, no así en los Hospitales Nacionales.
- Continuar utilizando el método ELISA por su fácil acceso en equipo y reactivos.
- Actualizar y capacitar al personal que trabaja en los Hospitales de Zacapa y Chiquimula sobre hepatitis "C"
- Dar a conocer los resultados de este estudio.

12. REFERENCIAS

1. Arana LF. Prevalencia de hepatitis C en donadores de Banco de Sangre del Hospital Roosevelt por el método ELISA. Tesis de Graduación. Facultad Medicina. USAC.1991;7-18.
2. Hadler Sc., et.al. La hepatitis en las Américas. Boletín de la Oficina Sanitaria de la Salud. OPS.103(3).1987;185-203.
3. Zuckerman A. The elusive hepatitis C virus. *British Med.* 299,1989;871-872.
4. Balows A., et al. Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991;652-653.
5. Jawetz E., et al. Microbiología Médica. 15 ed. México D.F.:Manual Moderno, 1996; 499-500.
6. Mendizabal, P.F. Aprendiendo Epi Info Versión 6: Universidad de San Carlos de Guatemala, (manual de estadística de la Facultad de Medicina.
7. <http://WWW.lebbyac.com/hepatiti.htm>
8. Abbott Diagnosticts Educational Services. Hepatitis. Detection and patient managment. 1990;(97):931;1-4.
9. Hojvat S. HCV learning guide. Abbott Diagnosticts Edicational Services.1992;41p.
- 10.<http://WWW.saludnutricion.com/scrips/salud.dll Hepatitis C.htm>.
11. Centers for disease control. Hepatitis C virus. A comprehensive strategy for elimininating transmission: Recommendations of the Inmunization Practices Advisory Committee (ACIP) MMWR 1991:40 (No.RR-13).
12. Scheing R hepatitis C: Who's at risk? *Med Asp Hum Sex* 1991; 22(4):19.
13. Margolis Hs, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis C: Envolving epidemiology and implications for control. *Sem Liv Dis* 1991;11:84-92.
14. Mcphee J., Schroedg S., Diagnostico Clínico y tratamiento. 20 ed México D.F.: Editorial Manual moderno, Vol.II, Núm.2,1993.541p.
15. Picazo JJ., Fuentes AO. Diagnóstico Serológico de Hepatitis C. Protocolos de Diagnóstico Serológico Clínico No.5 <http://WWW.fei.es/protocol/ser05.htm>. Diciembre 1998.5p.
16. Laine Cr., Hepatitis C, Diagnóstico General <http://WWW.hepato.com/espframes.htm>. Abril 1999.3p.
17. Martin P.Friedman L. Gastroenterology Clinics of North America: Viral hepatitis. USA:WB Saunders Company, 1994.619p.(p.603-611).
18. Mandell GL. Et al. Principles and Practice of Infections Diseases. 3 era. Ed. USA: Churchil Livingstone, 1990. 2340p (p1008-1023).
19. Ramiro M., Temas de Medicina Interna. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana, Vol. IV, Núm.2, 1996.462 p.
20. Mchutchison JG, et al. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high risk population. *Hepatology*.1992;15:19-25p.

21. Abbott División Diagnóstica. Antígeno del virus de la Hepatitis C folleto. 1991;82:1-6.
22. Alter H J, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non A, non B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
23. McFarlane I G, et al. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenic factor or false positive result? *Lancet* 1990; 335:754-757.
24. Alter, HJ. An Assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of Human Hepatitis C. *Science* 1989; 244:362-364.
25. Bisceglie A., et al. Recombinant Interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. *New Engl. J. Med.* 1989;30:321 (22):1506-1510.
26. Eddleston Adrian. Modern Vaccines: Hepatitis C. *Lancet*. 1990 May 12:1142-1143.
27. Balart Gl., et al. Interferon treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. The saga continues. *Gastroenterology*. 1990;98(5):1384-1387.
28. Conrad M. Prevention of post-transfusion hepatitis. *Lancet*. 1988 jul 23:217.
29. Alter MJ. Sampliner R E. Hepatitis C: And miles to go before we sleep. *N Engl Med* 1989;321:1538-1539.
30. Garson J A., et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990;335:1419-1422.
31. Quiñonez NF. Y Lemus G. Detección de anticuerpos contra HCV, frecuencia en el I.G.S.S. Memorias XI Congreso Centroamericano y Panamá Medicina Interna y X Nacional. 1992;29.
32. Luján J. Hepatitis C: Prevalencia en donadores en un Banco de Sangre de Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, (tesis de graduación, Facultad de Medicina). 1993:70p.
33. Crespo R. Prevalencia y factores de riesgo para la hepatitis C; en pacientes de una Clínica de enfermedades de transmisión sexual de la ciudad de Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, (tesis de graduación, Facultad de Medicina). 1994;57p.
34. Sánchez C M. Perfil clínico epidemiológico y marcadores serológicos del donador de sangre en el Hospital Roosevelt. Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, (tesis de graduación, Facultad de Medicina)
35. Moguel A F. Seroprevalencia de hepatitis C en el Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios utilizando pools de suero. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1994:31p.
36. Malouf A E. Seroprevalencia de hepatitis C en donadores del Banco de Sangre del Centro Medico Militar. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1993:63p.

37. Cruz M L. Detección de anticuerpos contra hepatitis C en donadores, que acuden a un Banco de Sangre en la Ciudad de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia)1995:56p.
38. Pérez Folgar J. Arias M. Díaz M. Cordón L. Estudio epidemiológico e implementación de pruebas de tamizaje de hepatitis C en bancos de sangre de los hospitales nacionales. Guatemala. (trabajo de investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia);2000:15p.
39. Matta, V.L., Reyes, L. De Ramírez M., Estrada F., y Nave, F. Estudio para la identificación de anticuerpos séricos en enfermedades de Chagas, Hepatitis en donadores de sangre reguladores de 15 áreas de salud en Guatemala. Guatemala: Departamento de citohistología, Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC, 1994.49-54.
40. Díaz M J. Prevalencia de anticuerpos del virus de la hepatitis C en sueros de pacientes hemodializados de la Unidad Nacional de Atención al Enfermo Renal Crónico (UNAERC). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia).2001:40p.

13. ANEXOS

Tabla 1

Hospital	Anti-HIV		HBsAg		Anti-HBc		VDRL		Anti-Chagas	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Chiquimula	46	0.0	41	2.4	37	8.1	46	2.1	52	7.7
Zacapa	52	0.0	51	2.0	52	7.7	52	5.7	52	3.8

(cita: Matta, V.L., Reyes, L. De Ramírez M., Estrada F., y Nave, F. Estudio para la identificación de anticuerpos séricos en enfermedades de Chagas, Hepatitis en donadores de sangre reguladores de 15 áreas de salud en Guatemala).

ENTREVISTA PARA DONADORES DE BANCO DE SANGRE

I. Datos personales

1. No. de muestra: _____ Fecha: _____
2. Nombre o Identificación: _____ No. expediente: _____
3. Sexo: M _____ F _____
4. Lugar de nacimiento: _____
5. Peso: _____ Talla: _____
6. Dirección: _____
Institución
País Estado Ciudad

II. Antecedentes

1. Donaciones previas: Si ___ No ___ Cuantas? ___ Hace cuanto tiempo? ___
2. Transfusiones: Si ___ No ___ Cuantas? ___ Hace cuanto tiempo? ___

III. Datos de laboratorio

1. Prueba de HCV en el Banco de Sangre _____
2. Prueba de HCV por RIA _____
3. Prueba confirmatoria de HCV por RIA _____
4. Otros _____

ENTREVISTA PARA DONADORES DE BANCO DE SANGRE

I. Datos personales

1. No. de muestra: _____ Fecha: _____
2. Nombre o Identificación: _____ No. expediente: _____
3. Sexo: M _____ F _____
4. Lugar de nacimiento: _____
5. Peso: _____ Talla: _____
6. Dirección: _____
Institución
País Estado Ciudad

II. Antecedentes

1. Donaciones previas: Si ___ No ___ Cuantas? ___ Hace cuanto tiempo? ___
2. Transfusiones: Si ___ No ___ Cuantas? ___ Hace cuanto tiempo? ___

III. Datos de laboratorio

1. Prueba de HCV en el Banco de Sangre _____
2. Prueba de HCV por RIA _____
3. Prueba confirmatoria de HCV por RIA _____
4. Otros _____

(ANEXO 2)

TABLA DE COMPARACIÓN DE METODOS EN ESTE ESTUDIO

	ELISA	IRMA
Costo de prueba	aprox. Q38.00	aprox. Q40.00
Tiempo de prueba	2 horas	1 horas
Cuidados especiales	no	Si (I^{125})
Reactivos	Fácil acceso	Difícil acceso
Equipo	Electro ELISA (fácil acceso)	Contador gamma (difícil acceso)
Sensible	100 %	100 %
Especificidad	100 %	100 %




Br. Doris Lisbeth Barrera González
Tesisista



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Asesor



Licda. Heidi Logemann Lima
Directora Escuela de Química Biológica



Licda. Hada Mariela Alvarado Beteta
Decana