



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Evaluación de la precisión diagnóstica del sistema Cobas 6800 para la detección de los niveles de viremia del virus de la hepatitis C a partir de muestras de gotas de sangre seca en papel de filtro



Lorena Gómez^a, Cristina Reygosa^b, Dalia Elena Morales-Arráez^b, Ruth Ramos^c, Antonia Pérez^a, Alberto Hernández^b, Enrique Quintero^b, Fernando Gutiérrez^c, Felicitas Diaz-Flores^a y Manuel Hernández-Guerra^{b,*}

^a Servicio de Laboratorio Central, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, España

^b Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, España

^c Servicio de Farmacia, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 15 de julio de 2019

Aceptado el 3 de octubre de 2019

On-line el 4 de diciembre de 2019

Palabras clave:

Análisis
Infección
Cirrosis
Carga viral

R E S U M E N

Introducción: La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es curable en la mayoría de los casos tratados, siendo actualmente una prioridad diagnosticar a todos los infectados. Para ello se necesitan, especialmente en poblaciones de difícil diagnóstico, métodos diagnósticos simples, como es el uso de muestras de gotas de sangre seca (GSS), como alternativa a la extracción de sangre mediante venopunción. Como paso previo para poder implantarlo como método diagnóstico de detección de pacientes con VHC dentro del Sistema Nacional de Salud se precisa evaluar la precisión diagnóstica en equipos de uso hospitalario habitual.

Metodología: Se evaluaron *in vitro* y en ensayo de campo muestras de GSS tras ser procesadas en el equipo Cobas 6800, estableciendo una correlación con el resultado obtenido con sangre completa. Se realizaron pruebas de correlación y de variabilidad intraensayo de la determinación con sangre completa y GSS para cuantificar la carga viral del VHC.

Resultados: En muestras de sangre completa, con una carga viral $\geq 3 \log_{10}$ UI/ml, se detectó viremia en todos los casos cuando se utilizaron eluciones de 2 gotas (94 detecciones de 95 eluciones de círculos). El rendimiento con 2 gotas fue menor en muestras con $< 3 \log_{10}$ UI/ml (7/20). La correlación entre la viremia determinada con sangre completa y con GSS fue excelente (máximo con 2 gotas, $r^2 = 0,906$; $p < 0,001$), con un coeficiente de variación del 0,05%. En práctica clínica habitual con muestras de pacientes analizados ($n = 61$) se obtuvo igualmente una excelente precisión diagnóstica.

Conclusión: La determinación de la carga viral mediante GSS, procesando al menos 2 gotas, es un método fiable para el diagnóstico de infección por el VHC. La estandarización del método es factible en nuestro equipo Cobas 6800 local, y nuestros resultados respaldan la incorporación de esta herramienta diagnóstica al Sistema Nacional de Salud para facilitar planes de microeliminación.

© 2019 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Diagnostic test accuracy of the cobas 6800 system for detection of hepatitis C virus viraemia levels from dried blood spots

A B S T R A C T

Introduction: Because hepatitis C virus (HCV) infection is curable in the majority of cases, the diagnosis of all infected patients has become a priority. In difficult-to-diagnose populations, simpler diagnostic methods are required such as the use of dried blood spots (DBS) as an alternative to blood drawn by venipuncture (VP). Before being able to include it as a HCV diagnostic detection method within the Spanish National Health System, the diagnostic accuracy of standard hospital equipment must be evaluated.

Keywords:

Screening
Infection
Cirrhosis
Viral load

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mhernand@ull.edu.es (M. Hernández-Guerra).

Methodology: DBS samples were evaluated *in vitro* and in a field test after being processed in the Cobas 6800 system, establishing a correlation with the result by VP. Performance with different viral loads and intra-assay variability was compared.

Results: In samples with a viral load of $> 3 \log_{10}$ IU/ml, viraemia was detected in all cases when at least two blood spot elutions were used (94 detections out of 95 spot elutions). The performance with 2 spots was lower in samples with $< 3 \log_{10}$ IU/ml (7/20). Correlation between VP and DBS viraemia was excellent (maximum with 2 spots, $r^2 = 0.906$, $P < .001$) with a coefficient of variation of 0.05%. In routine clinical practice with specimens from screened subjects ($n = 61$), excellent diagnostic accuracy was also observed.

Conclusion: Viral load detection using DBS of at least two spots is a reliable method for HCV diagnosis. The standardisation of the method is feasible and our results support the incorporation of this diagnostic tool in Spain's Public Health System.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las principales causas de morbimortalidad de etiología hepática a nivel mundial¹. Las repercusiones que tiene a largo plazo son muy variables, y van desde alteraciones mínimas hasta la aparición de cirrosis hepática descompensada y carcinoma hepatocelular².

La asistencia clínica a los pacientes con infección por el VHC ha mejorado considerablemente en los últimos años gracias fundamentalmente a los avances en el tratamiento. Estos permiten alcanzar respuesta viral sostenida y curación de la infección en la práctica totalidad de los pacientes, evitando la progresión de la enfermedad y la aparición de complicaciones³. Sin embargo, uno de los obstáculos para que los pacientes se beneficien del tratamiento es la falta de diagnóstico de la infección y derivación al especialista⁴. En colectivos como son los usuarios de drogas por vía parenteral otra de las limitaciones para el acceso por parte de los pacientes al tratamiento y, por tanto, a la curación, es el rechazo a someterse a una venopunción (VP) para extracción de sangre y el diagnóstico por el mal acceso venoso que presentan, dificultades para traslado al centro hospitalario por problemas económicos o estigmatización que complican el diagnóstico⁵.

Actualmente se pueden detectar anticuerpos frente al VHC y viremia a partir de una muestra de gota de sangre seca (GSS) sobre papel tras extracción por punción dactilar. Este test ha demostrado, con distintos kits comerciales, una alta sensibilidad y especificidad^{6–8}. La gran ventaja como método diagnóstico de este procedimiento es el escaso volumen de sangre que requiere (unas pocas gotas depositadas sobre papel y secadas al aire), la facilidad de transporte y conservación de las muestras hasta su procesamiento en el laboratorio. Además, no requiere personal con adiestramiento específico, es menos invasivo y es mejor aceptado, en especial en aquellos pacientes con poca accesibilidad venosa, como los usuarios de drogas por vía parenteral con antecedentes de flebitis⁹.

Un test diagnóstico de este tipo no solo facilita el diagnóstico, sino que, además, es más aceptable por parte del sujeto a cribar, 2 estrategias fundamentales para identificar a los pacientes infectados y facilitar su posterior evaluación terapéutica y curación.

El control de la infección por el VHC dentro del Sistema Nacional de Salud, según el actual Plan Nacional¹⁰, pasa necesariamente por diagnosticar y tratar colectivos tradicionalmente difíciles de vincular a la atención sanitaria. El diagnóstico descentralizado o fuera del centro hospitalario con recogida de muestra para test de GSS en el lugar donde se encuentra el individuo a diagnosticar, pero con gestión hospitalaria mediante procesamiento en el centro de referencia, ha demostrado ser útil como método de cribado oportunista en iniciativas puntuales^{11,12}. Sin embargo, para que se facilite y pueda instaurarse un cribado sistemático en estos colectivos se precisa de la implementación de este procedimiento en el Sistema

Nacional de Salud, como una herramienta equivalente a la determinación de viremia desde plasma por VP. A falta de un protocolo por el fabricante, la Organización Mundial de la Salud recomienda validar y estandarizar localmente este procedimiento. Con el fin de poder implementar este método diagnóstico en el circuito asistencial habitual, y a través de él diagnosticar el VHC, especialmente en aquellos en los que la VP resulta un obstáculo, este estudio evalúa la precisión diagnóstica de un protocolo aplicado sobre una muestra de GSS sobre papel en el equipo Cobas 6800 de nuestro centro hospitalario adscrito al Sistema Nacional de Salud.

Material y métodos

Muestras incluidas

Este estudio prospectivo constó de una evaluación *in vitro* a partir de muestras de GSS con sangre de sujetos infectados por VHC, y una evaluación en el ensayo de campo a partir de muestras obtenidas de sujetos incluidos durante el periodo de julio-septiembre de 2018, en un estudio iniciado en enero de 2017 que evalúa la eficacia de cribado voluntario de VHC en centros de atención al drogodependiente del área norte de la isla de Tenerife, con determinación de anticuerpos frente a VHC mediante GSS, recogidas por farmacéuticos y auxiliares de farmacia.

Para las 2 evaluaciones se dispuso de muestras de sangre total por VP en tubos EDTA-tripotásico para obtener valores de referencia, y se utilizó la misma muestra para cargar los círculos en la evaluación *in vitro* para obtener resultados de GSS. Ambas muestras fueron procesadas en el equipo Cobas 6800, que trabaja con el mismo volumen de muestra en ambos casos.

Estudio *in vitro*

Para el proceso de la validación *in vitro* se comparó el rendimiento diagnóstico y la variabilidad intraensayo sobre un total de 300 círculos cargados con muestras de 20 sujetos infectados por el VHC de los que se disponía de los datos de carga viral.

Para la recogida de las muestras se utilizaron tarjetas con papel tipo Whatman 903© (Merck, Alemania) de 5 círculos (fig. 1 A). Se emplearon un total de 5 tarjetas por paciente (100 tarjetas en total) que se cargaron de uno a 5 círculos (es decir, 15 círculos por paciente, y un total de 300 círculos) con 80 μ l de sangre anticoagulada con EDTA-tripotásico. Los resultados fueron expresados cuantitativamente (\log_{10} UI/ml) y cualitativamente como positivos si se detectaba viremia, o negativos estratificándose en 4 grupos: carga viral muy baja ($< 3 \log_{10}$ UI/ml); baja ($\geq 3-4 \log_{10}$ UI/ml); media ($> 4-6 \log_{10}$ UI/ml) y alta ($> 6 \log_{10}$ UI/ml).

Como la incidencia de pacientes con cargas virales muy bajas ($< 3 \log_{10}$ UI/ml) es muy reducida, para poder evaluar la precisión

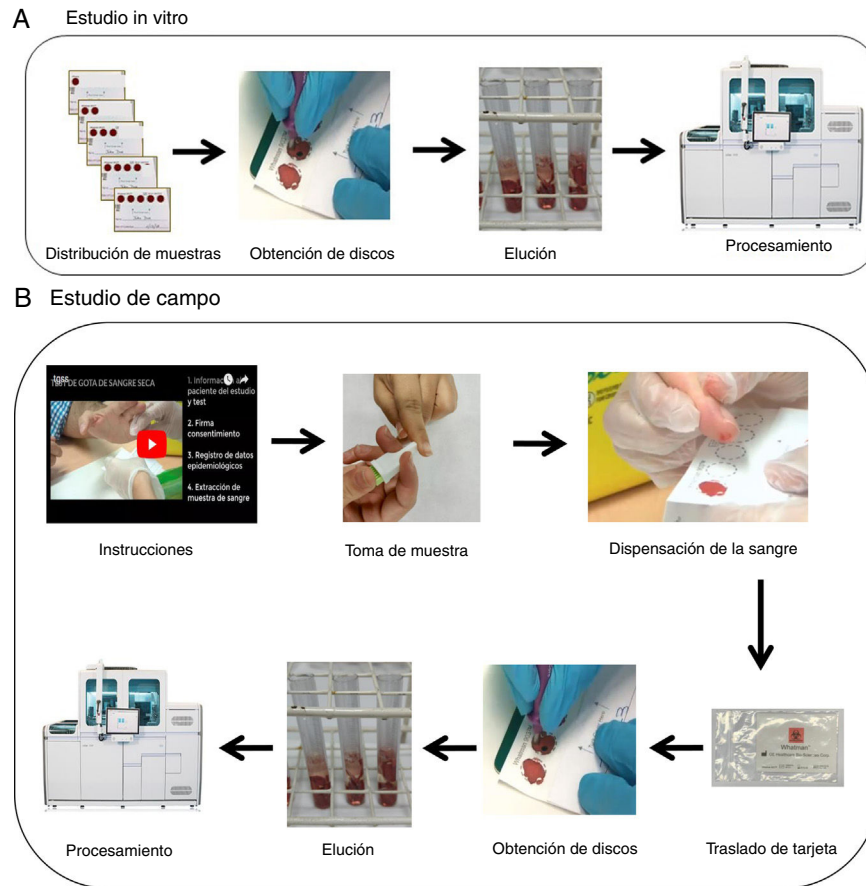


Figura 1. A. Esquema del plan de procesamiento de muestras de estudio *in vitro*. B. Esquema sobre el procedimiento utilizado en el ensayo de campo.

del test de GSS en este tipo de pacientes se diluyeron 1/10 o 1/100 muestras de sangre de 3 sujetos adicionales (con cargas virales conocidas) en suero fisiológico, hasta lograr valores en la muestra de $< 3 \log_{10}$ UI/ml, para su posterior dispensación en los círculos de papel.

Estudio de campo

Al personal encargado de obtener la muestra para el test de GSS se le formó en la obtención de la misma mediante previa entrevista y con entrega de material, entre el que estaba la visualización de un video on-line (<https://www.youtube.com/watch?v=Jagy918AXTc>) con la intención de que recogiera, tras el pinchazo con lanceta (MenaLancetPro®, 23G, Menarini), una muestra suficiente para completar hasta 5 círculos en cada tarjeta. Las tarjetas fueron trasladadas a temperatura ambiente (entre 22–23 °C) desde la extracción hasta el procesamiento con una mediana de 17,5 días (rango 14–21 días) (fig. 1 B).

Procesamiento de muestra y equipo

Las muestras desde el papel se obtuvieron manualmente de cada círculo delineado con ayuda de un sacabocados en pequeños discos, que se colocaron en tubos del equipo de Roche Diagnostics (tubo 5 ml PS 12 × 75 mm sin enrases, referencia: 30080.1, DeltaLab, Barcelona), se añadió 1.500 µl de reactivo de lisis para uso en equipos Cobas 6800/8800 (REF P/N: 06997538190) en aquellos tubos con 4 círculos o menos y 2.000 µl en aquellos en los que se pudo obtener 5 círculos. Se colocaron los tubos al baño María durante 15 minutos, agitándolos en vórtex a los 7–8 minutos. Se

separó el sobrenadante a un nuevo tubo y se introdujeron en el equipo Cobas 6800 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) para la posterior determinación de carga viral (\log_{10} UI/ml).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores absolutos, porcentuales, media y su desviación estándar. Se utilizó la «t» de Student para variables cuantitativas que siguieron la normalidad o U-Mann Withney para aquellos que no seguían una distribución normal, mientras que las variables cualitativas fueron comparadas mediante el test de la Chi-cuadrado. Se estudiaron correlaciones mediante coeficiente de Pearson y análisis de coeficientes de variación. Los resultados se expresaron en media \pm desviación estándar. El análisis de datos se realizó con SPSS 15. Diferencias con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Aspectos éticos

Este estudio, de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki, adoptada por la 18.^a Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, en 1964 y enmendada en Tokio (1975), Venecia (1983), Hong Kong (1989), Sudáfrica (1996), Edimburgo (2000), Washington (2002), Tokio (2004), Seúl (2008) y Brasil (2013); y las Leyes y Reglamentos vigentes en Europa y España, fue aprobado por el Comité ético del Hospital Universitario de Canarias, y a los pacientes se les entregó consentimiento informado y lo firmaron para la recogida de muestras.

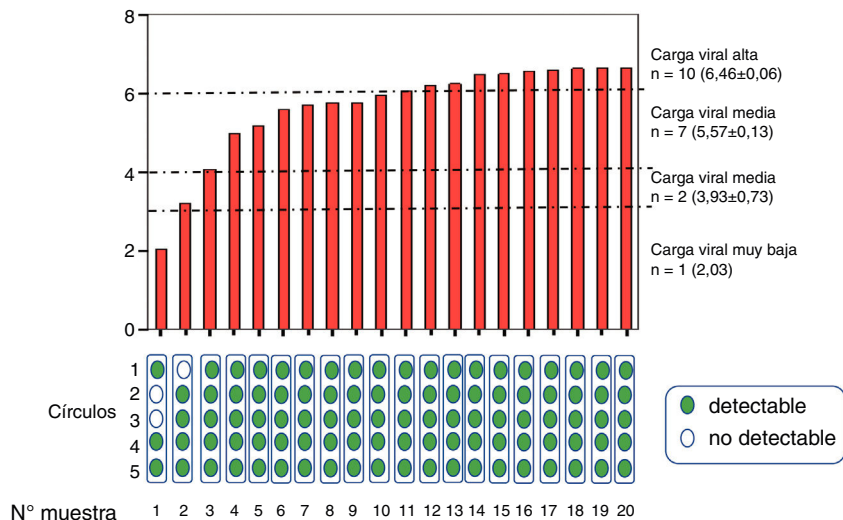


Figura 2. Viremia media determinada en muestras de venopunción de pacientes agrupadas según tuvieran carga viral muy baja, baja, media y alta. En la parte inferior se muestran los resultados de viremia detectable (verde) o indetectable (blanco), según el número de círculos empleados en la determinación tras su elución.

Resultados

Estudio in vitro

Las muestras una vez procesadas se agruparon en grupo con carga viral alta ($n = 10, 6,4 \pm 0,06 \log_{10}$ UI/ml), media ($n = 7, 5,5 \pm 0,3 \log_{10}$ UI/ml), baja ($n = 2, 3,9 \pm 0,7 \log_{10}$ UI/ml) y muy baja ($n = 1, 2,03 \log_{10}$ UI/ml) (fig. 2).

Se detectó viremia en el 100% de los círculos y promedios evaluados de muestras con al menos carga viral media. En muestras de un paciente que presentaba viremia baja ($3,21 \log_{10}$ UI/ml) se precisó del promedio de al menos 2 círculos para que fuera detectable, y en muestras de otro paciente con viremia muy baja ($2,03 \log_{10}$ UI/ml) se precisó de más círculos para que se pudiera detectar viremia de forma fiable. En muestras diluidas adicionales con viremia muy baja ($n = 3, 2,1 \pm 0,2 \log_{10}$ UI/ml) solo se detectó viremia (y en rango < 20 UI/ml) en 4 de las 15 diluciones de GSS, por lo que globalmente se detectó carga viral en 7 de 20 diluciones (tabla 1).

Se realizó la comparación entre la viremia detectada por VP con respecto a la obtenida procedente de GSS, obteniéndose una diferencia media de $-1,66 \log_{10}$ UI/ml (fig. 3 A). La correlación entre la viremia detectada en VP y en GSS fue elevada para cualquier promedio de círculos utilizados por tarjeta. La máxima correlación se obtuvo cuando se usaron 2 círculos ($r^2 = 0,906$; $p < 0,001$) (fig. 3 B). En cuanto a los coeficientes de variación (CV) se obtuvo un CV del 0,57%, 0,05% y 0,04% para viremia baja, media y alta, respectivamente (fig. 4).

Estudio de campo

Para la validación de las muestras en la práctica clínica real se testaron un total de 61 sujetos, 34 sujetos con carga viral positiva (mediana $6,41 \log_{10}$ UI/ml, rango $3,9-7,81 \log_{10}$ UI/ml), el 79,4% presentaba carga viral alta y 27 con carga viral indetectable. En el grupo que presentaba carga viral detectable la mayoría eran hombres, con una edad media en torno a los 50 años (tabla 2). En todos ellos se pudo obtener al menos 4 círculos durante la obtención de la muestra de GSS. Las tarjetas fueron trasladadas a temperatura ambiente

Tabla 1
Distribución de resultados de las muestras diluidas

Muestra	Dilución aplicada	CV (UI/ml)	Muestra, n.º círculos	N.º círculos	CV (UI/ml) en tarjeta
Muestra 1	1/10	108	3,1	1 círculo	< 12
			3,2	2 círculos	No detectable
			3,3	3 círculos	No detectable
			3,4	4 círculos	33
			3,5	5 círculos	< 12
Muestra adicional 1	1/10	213	1,1	1 círculo	No detectable
			1,2	2 círculos	No detectable
			1,3	3 círculos	No detectable
			1,4	4 círculos	No detectable
			1,5	5 círculos	No detectable
Muestra adicional 2	1/10	304	2,1	1 círculo	No detectable
			2,2	2 círculos	< 20
			2,3	3 círculos	< 20
			2,4	4 círculos	< 20
			2,5	5 círculos	No detectable
Muestra adicional 3	1/10	36	3,1	1 círculo	No detectable
			3,2	2 círculos	No detectable
			3,3	3 círculos	No detectable
			3,4	4 círculos	No detectable
			3,5	5 círculos	< 20

CV: carga viral.

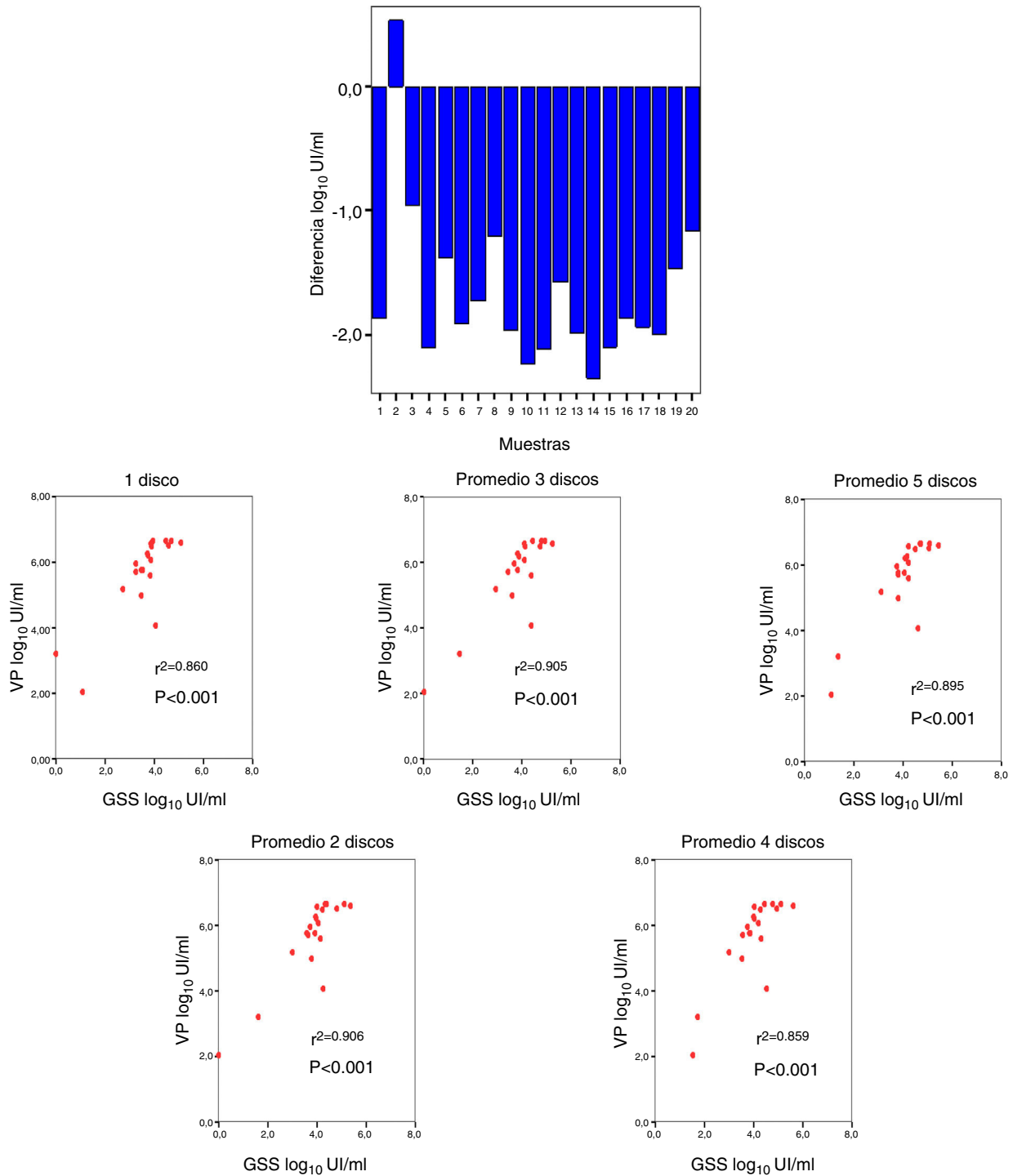


Figura 3. A. Diferencia media entre viremia detectada en muestras a partir de venopunción (VP) con respecto a la obtenida en gota de sangre seca (GSS). B. Correlación entre viremia en muestras de VP y en GSS.

Tabla 2

Distribución de resultados según cargas virales en sujetos con resultado positivo y características en el ensayo en práctica clínica real

	Carga viral baja n = 1	Carga viral media n = 6	Carga viral alta n = 27
Edad (media ± DE)	51	48 ± 9,54	50,1 ± 10,4
Sexo (hombre), %	0	40	92,6
Genotipo (1, 3, 4): %	1: 100	1: 33 3: 50 4: 17	1: 70,8 3: 12,5 4: 16,7
Carga viral log ₁₀ UI/ml (media ± DE)	3,9	5,62 ± 0,25	6,63 ± 0,45
Círculos evaluados (media ± DE)	5	4,67 ± 0,81	4,07 ± 1,17

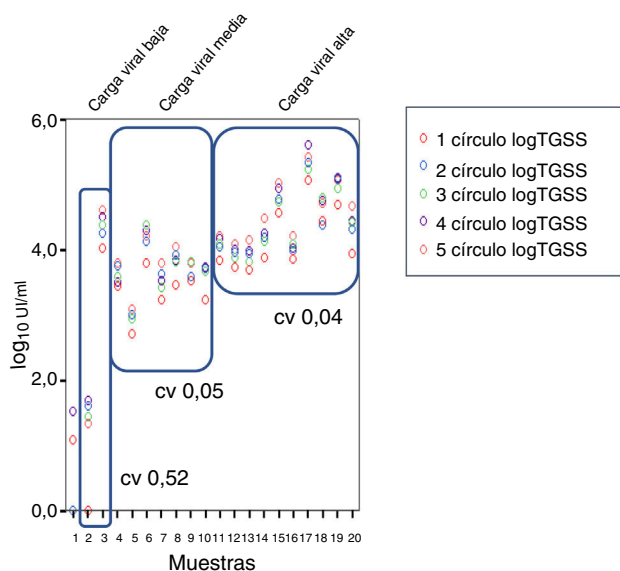


Figura 4. Coeficiente de variación (CV) en muestras de viremia baja, media y alta.

con una mediana de 17,5 días (rango 14–21 días) desde la extracción hasta el procesamiento.

La precisión diagnóstica obtenida demuestra una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del 100% en nuestra muestra de práctica clínica real (tabla 3).

Discusión

Nuestros resultados indican que a partir del protocolo descrito, y en el equipo utilizado Cobas 6800, la determinación de carga viral desde muestra de GSS, procesando al menos 2 círculos, es un método de expresión cualitativa fiable en la detección de la mayoría de pacientes con infección activa por el VHC.

Además de detectar correctamente la presencia de viremia con el protocolo utilizado, la correlación observada entre viremia obtenida por VP y en GSS fue excelente. En un estudio publicado en el que se utilizó un único disco impregnado con similares cantidades de muestra (50 µl de sangre) y en una tarjeta de equivalentes características a las utilizadas en este estudio, se encontró una correlación similar⁷. A pesar de esta observación, en la era de los antivirales de acción directa, en la que por sus características de alta eficacia pangenotípicas no sería preciso cuantificar ni genotipar, por cuanto no condiciona ni el tipo de terapia ni su duración, solo la presencia o no del virus, el valor de establecer una correlación

excelente entre ambos métodos, aun con la diferencia cuantitativa descrita o el excelente coeficiente de correlación entre muestras observado, parece por otra parte poco relevante¹³. Además, las pruebas de determinación de carga viral a lo largo del tratamiento actualmente están en desuso y circunscritas a la práctica para verificar el cumplimiento terapéutico³. De hecho, casi todos los sujetos obtienen cargas virales indetectables de manera temprana debido a los efectos directos de los nuevos tratamientos en la replicación viral. Es por ello que, en la monitorización de los nuevos tratamientos se podría prescindir de la cuantificación de ARN, y se podría empezar a sustituir por pruebas cualitativas que confirmen la infección al inicio del tratamiento y la respuesta viral sostenida tras la finalización del mismo¹³. En este sentido, en los últimos años se ha vuelto a utilizar la determinación del antígeno del core del VHC por resultar más económico y sencillo que determinar la viremia^{14,15}.

Nuestros resultados muestran que, en las condiciones analizadas, para pacientes con viremia media y alta es suficiente un solo círculo para obtener un resultado positivo; sin embargo, en aquellos pacientes con una viremia baja se precisan 2 círculos. Postulamos que esto puede estar condicionado por el almacenamiento de la muestra con una degradación de las pocas copias de ARN presentes en la GSS¹⁶. De hecho, en un estudio que comparó muestras almacenadas a temperatura ambiente con respecto a almacenamiento a -20°C , se objetivó una diferencia de hasta 3 veces en los niveles de ARN, después de 6 días de su extracción⁷. Sin embargo, otro estudio no observó diferencias de valor de ARN detectables después de cerca de un año, pero no se cuantificó para conocer si hubo disminución en los niveles de la carga viral¹⁷. Por último, un estudio más reciente no observó variaciones en la estabilidad del VHC en muestras de GSS durante el período de un año¹⁸. No obstante, esta limitación se reduciría aprovechando la facilidad de obtención de la muestra con la lanceta adecuada y utilizando en la determinación de la viremia el total de círculos disponibles en la tarjeta, que son hasta 5.

Tras la validación del método *in vitro* se realizó un estudio posterior de validación en la práctica clínica real en un programa de cribado en centros de atención a la drogodependencia, colectivo de alta prevalencia de infección y de difícil vinculación con la atención médica para el diagnóstico⁵. Estos centros o unidades en los que los pacientes son asistidos por facultativos médicos, psicólogos, asistentes sociales y farmacéuticos, son clave para el éxito de los planes que se pongan en marcha para diagnosticar, e incluso tratar, a estos pacientes sin hasta ahora asistencia del VHC. Sin duda, para la implementación de esta herramienta diagnóstica hará falta reajustes organizativos y dotación estructural, que no obstante, dada la simplicidad del test, serán menores. Además, la simplicidad permite que el test sea efectuado por distintos integrantes del centro. De hecho, en nuestro caso, fueron los

Tabla 3
Precisión diagnóstica obtenida con test de gota de sangre seca (GSS)

	Criterio de referencia (viremia en plasma por venopunción)		
	Positivo	Negativo	Total
<i>Resultado de viremia en GSS</i>			
Positivo	34	0	34
Negativo	0	27	27
Total	34	27	61
			IC 95%
		Límite inferior	Límite superior
Prevalencia de la enfermedad	55%	42,51%	68,24%
Pacientes correctamente diagnosticados	100,00%	92,62%	99,85%
Sensibilidad	100,00%	87,36%	99,73%
Especificidad	100,00%	84,50%	99,66%
Valor predictivo positivo	100,00%	87,36%	99,73%
Valor predictivo negativo	100,00%	84,50%	99,66%

farmacéuticos quienes colaboraron en la recogida de las muestras, como ocurre en otros lugares en los que se han puesto en marcha cribados mediante GSS¹⁹. Incluso es probable que en el futuro, al igual que se ha evaluado en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, sea el propio paciente quien recoja la muestra^{20,21}.

El test de GSS demostró ser un método sensible y específico para la cuantificación de ARN del VHC en comparación con los resultados obtenidos tras VP. De los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos observar una elevada precisión diagnóstica. Estos resultados son incluso superiores a los publicados en otros trabajos en los que obtiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95,8%¹⁸, y en otro estudio que demostró una sensibilidad del 98% y una especificidad del 94,3%²². Probablemente, esta mayor precisión que hemos descrito, con nuestro protocolo, provenga de la metodología de identificación. Los trabajos anteriormente citados emplearon la plataforma de extracción de Abbott M2000 y RT-PCR¹⁸, y una qPCR²² que posee un límite de detección del ARN del virus de 50 UI/ml, mientras que nuestro equipo tiene un límite de 12 UI/ml.

El hecho de que el test presente un valor predictivo negativo muy elevado, es especialmente importante en este colectivo de pacientes y en poblaciones de riesgo de infección, ya que se podría plantear como herramienta alternativa para diagnóstico y cribado en poblaciones de difícil acceso a diagnóstico convencional por VP, a pesar de presentar baja sensibilidad en aquellos pacientes con cargas virales muy bajas, ya que con ello se podría establecer un diagnóstico en un muy elevado número de pacientes (aunque no en su totalidad) que no se diagnosticarían de ninguna otra forma en nuestro sistema sanitario como tampoco ocurre en otros²³, con el propósito de poder alcanzar los objetivos propuestos por la Organización Mundial de la Salud para el año 2030 de elevar al 90% los diagnosticados y tratar a no menos del 80% en la estrategia global de eliminación de la hepatitis C²⁴. Esta debe estar focalizada en programas centrados en la eliminación de la infección en pacientes de centros de atención al drogodependiente, penitenciarios o centros de inserción social, entre otros. Recientemente, nuestro grupo evaluó la aceptación de este método para el diagnóstico de la infección por el VHC a través de la recogida de muestra dactilar, objetivando ser muy bien aceptado no solo en población general, sino en individuos en riesgo de exclusión social. Esto es particularmente interesante en este colectivo de alta prevalencia en viremia, en el que la detección de infección resulta fundamental y en el que este método acercaría el diagnóstico a estos pacientes, también reacios a utilizar el sistema sanitario para el diagnóstico de enfermedades mediante extracción de sangre¹². Cabe destacar que el test de GSS permite, como es en nuestro caso, en población con elevada seroprevalencia e infección activa por VHC (30-60%) determinar el ARN directamente. No obstante, en población general con una cifra de prevalencia menor (0,5-3%)^{25,26}, aun pudiéndose poner a punto la técnica para determinar anticuerpos desde una muestra de GSS y realizar el diagnóstico en un solo paso (en el caso de presencia de anticuerpo-VHC se realizaría el ARN), al ser menos ventajosa en esta población general el uso de GSS, prevalecería el empleo de la convencional extracción de sangre por VP, que también permite el diagnóstico en un solo paso ahorrando costes y pérdidas de pacientes^{27,28}.

Este método diagnóstico de la GSS en papel no es excluyente de otros métodos diagnósticos descentralizados, que por su rapidez en la obtención de resultados son una interesante herramienta aplicados en centros o lugares de atención (centros *point of care*) cuando interese especialmente un diagnóstico y asistencia inmediata, especialmente en colectivos de difícil vinculación con asistencia sanitaria convencional²⁹⁻³¹. Sin embargo el test de GSS, integrado en la rutina de análisis de muestras en un laboratorio de referencia, permite su lectura centralizada y gestión del resultado,

que es sin duda ventajoso desde el punto de vista de la salud pública a efectos de registros y estudios de epidemiología³².

Este estudio no está exento de limitaciones. Las muestras para el estudio de campo se obtuvieron de una población con una elevada prevalencia de VHC, como son los pacientes que acuden a los centros de atención al drogodependiente, y que no es representativa de la población general. No obstante, el objetivo de este apartado del estudio fue validar en práctica clínica real la viabilidad del test de GSS, y en ese sentido este estudio tiene más valor, pues es en esta población donde este test tiene una mayor aplicabilidad por las razones comentadas. Por otra parte, las cargas virales se evaluaron en muestras con genotipos mayoritariamente del tipo 1, que son los más prevalentes en población general, pero que contrasta con los porcentajes más elevados de genotipo 3 que tienen los pacientes asistidos por los centros de atención a las drogodependencias. Sin embargo, no se espera que el tipo de genotipo influya en el rendimiento de detección de carga viral^{23,33}. En cuanto a la correlación entre muestras por VP y GSS, aunque la correlación fue muy elevada, cabría esperar que la mayor correlación fuera cuando se utilizaran los 5 círculos. Sin embargo, en nuestras muestras fue máxima con 2 círculos. Esto pudiera ser debido a que quizás no se utilizó la cantidad de reactivo de lisis necesaria para permitir la completa elución del ARN del virus desde la totalidad de los 5 círculos, o a un impedimento físico, ya que quizás a mayor número de círculos, y por consiguiente de discos en el tubo, menor superficie del disco que entra en contacto con el reactivo de lisis y menor elución se produce. Por último, en aquellos pacientes que presenten viremias muy bajas (<0,01% de los casos en la práctica clínica)¹³ se precisaría de más estudios que confirmaran que la utilización de este test para la determinación de viremia es fiable. En este tipo de pacientes nuestro protocolo resulta ineficaz y cabría esperar la presencia de falsos negativos, sobre todo en población con coinfección por virus de la inmunodeficiencia humana en la que ha sido descrita una mayor frecuencia de pacientes con cargas virales muy bajas^{34,35}. En este sentido no debemos olvidar que en todo programa de cribado se asume una tasa de falsos negativos, que en este caso sería asumible, dada la baja frecuencia de individuos con cargas virales inferiores a 3 logaritmos. Además, en este y otros colectivos de difícil acceso sanitario, esta alternativa diagnóstica es la única vía de diagnóstico factible. Por último, quedaría por evaluar si la determinación de anticuerpos o antígeno del core¹⁶, en vez de viremia en estos casos, mejoraría el rendimiento.

En conclusión, el uso de muestra de GSS para la determinación de la viremia del VHC parece ser una alternativa al diagnóstico a partir de muestra por VP de elevada precisión diagnóstica. Por sus ventajas, especialmente en colectivos de alta prevalencia de infección y acceso diagnóstico complicado, la implementación de este método y su estandarización podrían permitir incorporar esta herramienta al Sistema Nacional de Salud para facilitar la implementación de planes de microeliminación en nuestro país.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos la labor y dedicación de los técnicos de laboratorio del Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias, a los investigadores de FUNCANIS Verónica Casañas, Sara García y Pablo Yanes, así como al personal de los Centros de Atención al Drogodependiente ANTAD y San Miguel Adicciones por su participación activa en el proyecto.

Bibliografía

- Hill AM, Nath S, Simmons B. The road to elimination of hepatitis C: Analysis of cures versus new infections in 91 countries. *J Virus Erad.* 2017;3:117–23.
- Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014;61 1 Suppl:S58–68.
- EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J Hepatol.* 2018;69:461–511.
- Cooke GS, Andrieux-Meyer I, Applegate TL, Atun R, Burry JR, Cheinquer H, et al. Accelerating the elimination of viral hepatitis: A Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019;4:135–84.
- Easterbrook PJ. WHO Guidelines Development Group who to test and how to test for chronic hepatitis C infection—2016 WHO testing guidance for low- and middle-income countries. *J Hepatol.* 2016;65 1 Suppl:S46–66.
- Poiteau L, Soulier A, Rosa I, Roudot-Thoraval F, Hézode C, Pawlotsky JM, et al. Performance of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus in whole blood collected on dried blood spots. *J Viral Hepat.* 2016;23:399–401.
- Tuaille E, Mondain AM, Meroueh F, Ottomani L, Picot MC, Nagot N, et al. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatol Baltim Md.* 2010;51:752–8.
- Saludes V, Folch C, Morales-Carmona A, Ferrer L, Fernández-López L, Muñoz R, et al. Community-based screening of hepatitis C with a one-step RNA detection algorithm from dried-blood spots: Analysis of key populations in Barcelona, Spain. *J Viral Hepat.* 2018;25:236–44.
- Hickman M, McDonald T, Judd A, Nichols T, Hope V, Skidmore S, et al. Increasing the uptake of hepatitis C virus testing among injecting drug users in specialist drug treatment and prison settings by using dried blood spots for diagnostic testing: A cluster randomized controlled trial. *J Viral Hepat.* 2008;15: 250–4.
- Secretaría General de Sanidad y Consumo Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (2018). Plan estratégico para el abordaje de la hepatitis C en el Sistema Nacional de Salud (PEAHC) [consultado 13 May 2019]. Disponible en: <https://www.msbs.gob.es/>.
- Arraez DM, Gutiérrez F, Quintero E, Casañas-Sánchez V, De Vera A, Gutiérrez LGS, et al. Poster: THU-141: Efficacy of a program based on on-site dried blood spot testing for hepatitis C to improve linkage to care and treatment uptake for people who injected drugs. París: EASL; 2018.
- Reygosa C. Aceptación de un cribado oportunista del virus de la hepatitis C (VHC) mediante test de gota de sangre seca (TGSS) en población general (PG) y en riesgo de exclusión social (REX). Póster presentado al 44.º Congreso anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado 2019, Madrid, España.
- Loggi E, Galli S, Vitale G, di Donato R, Vukotic R, Grandini E, et al. Monitoring the treatment of hepatitis C with directly acting antivirals by serological and molecular methods. *PLoS ONE.* 2017;12:E0187755.
- Aghemo A, Degasperi E, de Nicola S, Bono P, Orlandi A, D'Ambrosio R, et al. Quantification of core antigen monitors efficacy of direct-acting antiviral agents in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2016;14:1331–6.
- Cresswell FV, Fisher M, Hughes DJ, Shaw SG, Homer G, Hassan-Ibrahim MO. Hepatitis C core antigen testing: A reliable, quick, and potentially cost-effective alternative to hepatitis C polymerase chain reaction in diagnosing acute hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015;60: 263–6.
- Nguyen TT, Lemee V, Bollere K, Vu HV, Lacombe K, Thi XLT, et al. Confirmation of HCV viremia using HCV RNA and core antigen testing on dried blood spot in HIV infected peoples who inject drugs in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2018;18:622.
- Solmone M, Girardi E, Costa F, Pucillo L, Ippolito G, Capobianchi MR. Simple and reliable method for detection and genotyping of hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature. *J Clin Microbiol.* 2002;40: 3512–4.
- Bennett S, Gunson RN, McAllister GE, Hutchinson SJ, Goldberg DJ, Cameron SO, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in dried blood spots. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2012;54:106–9.
- Radley A, Melville K, Tait J, Stephens B, Evans JMM, Dillon JF. A quasi-experimental evaluation of dried blood spot testing through community pharmacies in the Tayside region of Scotland. *Frontline Gastroenterol.* 2017;8:221–8.
- Takano M, Iwahashi K, Satoh I, Araki J, Kinami T, Ikushima Y, et al. Assessment of HIV prevalence among MSM in Tokyo using self-collected dried blood spots delivered through the postal service. *BMC Infect Dis.* 2018;18:627.
- Hirshfield S, Teran RA, Jr. MJD, Chiasson MA, Tieu H-V, Dize L, et al. Quantification of HIV-1 RNA among men who have sex with men using an at-home self-collected dried blood spot specimen: Feasibility Study. *JMIR Public Health Surveill* [Internet]. 2018;4(4):e10847 [consultado: 24 Sep 2019]. Disponible en: <https://publichealth.jmir.org/2018/4/e10847/>.
- Santos C, Reis A, Dos Santos CV, Damas C, Silva MH, Viana MV, et al. The use of real-time PCR to detect hepatitis C virus RNA in dried blood spots from Brazilian patients infected chronically. *J Virol Methods.* 2012;179:17–20.
- Tait JM, Stephens BP, McIntyre PG, Evans M, Dillon JF. Dry blood spot testing for hepatitis C in people who injected drugs: Reaching the populations other tests cannot reach. *Frontline Gastroenterol.* 2013;4:255–62.
- OMS Informe mundial sobre las hepatitis, 2017 [Internet] [consultado 10 Jul 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017-executive-summary/es/>.
- Grupo de trabajo del estudio de prevalencia de la infección por hepatitis C en población general en España; 2017–2018. Resultados del 2.º Estudio de seroprevalencia en España (2017–2018). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social; 2019.
- Cuadrado A, Perello C, Llerena S, Escudero-García D, Gómez M, Estébanez Á, et al. THU-087 - Design and cost effectiveness of a hepatitis C virus elimination strategy based on an updated epidemiological study (ETHON cohort). *J Hepatol.* 2018;68:S164 [Internet] [consultado 24 Sep 2019].
- García F, Domínguez-Hernández R, Casado M, Macías J, Téllez F, Pascasio JM, et al. The simplification of the diagnosis process of chronic hepatitis C is cost-effective strategy. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed.* 2019;S2529993X19301728 [Internet] [consultado 24 Sep 2019].
- Crespo J, Eiros Bouza JM, Blasco Bravo AJ, Lázaro de Mercado P, Aguilera Guirao A, García F, et al. The efficiency of several one-step testing strategies for the diagnosis of hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig.* 2019;111:10–6.
- Llibre A, Shimakawa Y, Mottez E, Ainsworth S, Buivan TP, Firth R, et al. Development and clinical validation of the Genedrive point-of-care test for qualitative detection of hepatitis C virus. *Gut.* 2018;67:2017–24.
- Iwamoto M, Calzia A, Dublineau A, Rouet F, Nuhin J, Yann S, et al. Field evaluation of GeneXpert® (Cepheid) HCV performance for RNA quantification in a genotype 1 and 6 predominant patient population in Cambodia. *J Viral Hepat.* 2019;26:38–47.
- Pallarés C, Carvalho-Gomes Â, Hontangas V, Conde I, Di Maira T, Aguilera V, et al. Performance of the OraQuick hepatitis C virus antibody test in oral fluid and fingerstick blood before and after treatment-induced viral clearance. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2018;102:77–83.
- Lim MD. Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99:256–65 [Internet] [consultado 10 Jul 2019].
- Soulier A, Poiteau L, Rosa I, Hézode C, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky J-M, et al. Dried blood spots: A tool to ensure broad access to hepatitis C. Screening, diagnosis, and treatment monitoring. *J Infect Dis.* 2016;213:95–1087.
- Ivanova Reipold E, Easterbrook P, Trianni A, Panneer N, Krakower D, Ongarello S, et al. Optimising diagnosis of viraemic hepatitis C infection: The development of a target product profile. *BMC Infect Dis.* 2017;17 Suppl 1:707.
- Arribas JR, González-García JJ, Lorenzo A, Montero D, Ladrón de Guevara C, Montes M, et al. Single (B or C), dual (BC or BD) and triple (BCD) viral hepatitis in HIV-infected patients in Madrid, Spain. *AIDS Lond Engl.* 2005;19:5–1361.