



**“Variación en los niveles de anticuerpos del  
Virus C de Hepatitis en pacientes con falla renal  
terminal en hemodiálisis y su repercusión en el  
diagnóstico”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

Dr. Jaime Avilés Valverde

ASESOR

Dr. Rufino Menchaca Díaz

Tijuana, B.C., Noviembre de 2015

## INDICE

---

DATOS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES .....	3
I. TÍTULO .....	4
II. RESUMEN .....	5
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
INDICE .....	2
IV Resumen .....	5
IV. ANTECEDENTES .....	8
IX. METODOLOGÍA.....	18
IX.1 Tipo de estudio y diseño.....	18
IX.10 Medición de las Variables.....	20
IX.11 Análisis de datos .....	22
IX.2 Variables, definiciones conceptuales y operacionales .....	18
IX.3 Cálculo de Tamaño de la Muestra .....	19
IX.4 Muestreo.....	19
IX.5 Universo de Estudio.....	19
IX.6 Criterios de Inclusión .....	19
IX.7 Criterios de Exclusión.....	19
IX.8 Criterios de Eliminación.....	19
IX.9 Reclutamiento de Pacientes .....	20
V. OBJETIVOS .....	9
VI. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	10
VII. JUSTIFICACIÓN .....	11
VIII Hipótesis de investigación .....	10
VIII. MARCO TEÓRICO .....	12
VIII.1 DEFINICION Y GENERALIDADES.....	12
VIII.2 CARACTERISTICAS DEL VIRUS.....	12
VIII.3 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD Y FACTORES DE RIESGO .....	13
VIII.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VCH.....	15
VIII.5 METODOS INMUNOLOGICOS .....	16
VIII.6 METODOS MOLECULARES .....	16
X. RECURSOS.....	23
X.1 Recursos Humanos.....	23
X.2 Recursos Materiales .....	23
XI. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES .....	24
XII. RESULTADOS .....	25
XIII. DISCUSIÓN .....	29
XIV. CONCLUSIONES .....	30
XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
XVI. ANEXOS .....	33

## DATOS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES

---

Investigador Responsable: Jaime Avilés Valverde

Dirección: Belice 1938-4, Colinas de California, Delegación San Antonio de los Buenos, Tijuana Baja California.

Teléfonos: (664) 1881795

Correos electrónicos: [dravilesjaime@gmail.com](mailto:dravilesjaime@gmail.com), [jaime.aviles@imss.gob.mx](mailto:jaime.aviles@imss.gob.mx), [avil\\_esjimmy@hotmail.com](mailto:avil_esjimmy@hotmail.com)

Investigador Asesor o Tutor: Rufino Menchaca Díaz

Dirección: Paseo de los Héroes 10999 Zona Rio, consultorio 307. Tijuana Baja California.

Teléfonos: (664) 635 18 00, ext. 4308.

Correos electrónicos: [rufino\\_menchaca\\_diaz@hotmail.com](mailto:rufino_menchaca_diaz@hotmail.com)

## I. TÍTULO

---

**“Variación en los niveles de anticuerpos del  
Virus C de Hepatitis en pacientes con falla renal terminal en  
hemodiálisis y su repercusión en el diagnóstico”**

## II. RESUMEN

---

**Palabras Clave:** Hemodiálisis, Insuficiencia Renal Crónica Terminal, Infección por Virus C de Hepatitis, Anticuerpos contra Virus C de Hepatitis, Hemodilución, Ultrafiltración, Quimioluminiscencia.

### **Introducción:**

La infección por Virus C de Hepatitis (VCH) ocurre en el 3% de la población mundial, con variaciones en las poblaciones en riesgo como en los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT) en Hemodiálisis (HD) donde la prevalencia va del 3 al 47%. Existen diferentes factores relacionados a esta prevalencia como la proximidad de los pacientes durante la sesión de HD, la utilización de accesos vasculares, alta necesidad de hemotransfusiones. La determinación de niveles de anticuerpos del VCH es recomendada cada seis meses, o en caso de incremento en el valor de las transaminasas. Los niveles de transaminasas pueden estar modificados por la hemodilución del paciente por retención de volumen en pacientes con oliguria, estos se modifican posterior a la sesión de HD en relación con el volumen ultrafiltrado, por lo que su determinación previa a la sesión de HD puede subestimar su valor. La variación en los niveles de anticuerpos de VCH no se ha determinado, pudiendo modificarse estos y comprometer su validez diagnóstica si son determinados previo a la sesión de HD.

### **Resultados.**

Se realizó un estudio transversal analítico en la unidad de HD del Hospital General Regional No. 20 durante el periodo de agosto a octubre del 2012.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Tijuana.

Se reclutaron 65 pacientes con IRCT en manejo sustitutivo de la función renal en HD que incluía en total de la población, se eliminaron 15, se obtuvo información de 50 pacientes (N) que se completó la evaluación, el 50% fueron hombres y 50% mujeres, la edad promedio fue de  $49 \pm 16.3$  años (rango de 12 a 77 años). La ultrafiltración por la HD en promedio fue de  $3,360 \pm 802$  cc (con rango de 1,500 a 5,000 cc), la determinación de anticuerpos anti VCH por Quimioluminiscencia (CLIA) previo a la HD con un promedio de  $1.19 \pm 3.40$  unidades (rango de 0.02 a 12.25 u) y los anticuerpos posterior a HD con promedio de  $1.21 \pm 3.38$  u (rango de 0.03 a 12.26 u).

La variación promedio en los valores de los Anti VCH por CLIA fue de  $-12.60 \pm 26.02$  % (rango de -66.67 a 37.5 %).

### **Conclusiones.**

En el presente estudio no se encontraron variaciones en el valor de los anticuerpos del VCH con la HD que fueran estadística y clínicamente significativas.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema sanitario a escala mundial que afecta a más 170 millones de personas, lo que representa una prevalencia del orden del 2,5% de la población mundial. Más de 53.700 muertes al año pueden ser directamente atribuibles al VHC, lo anterior por datos obtenidos en estudios de escrutinio en donadores de sangre, pero la prevalencia de casos confirmados por estudios de Inmunoensayo Enzimático (ELISA) presenta grandes variaciones que va de menos del 0.1% en el norte de Europa a 0.1 a 0.5% en el Oeste de Europa<sup>1</sup> y el 2% en el Norte de América, en América Central, Sudamérica y Australia<sup>2</sup>. En estudios de prevalencia en México han variado de 0.7% a 2% en donadores de sangre<sup>3</sup>.

De las infecciones transmitidas por vía hematológica, la infección por VCH es la más común entre los pacientes con Hemodiálisis (HD) crónica con una prevalencia 5 veces mayor a la población general. La prevalencia general es del 13% pero varía del 3% en Alemania y El Reino Unido a 47% en Brasil, India y Arabia Saudita<sup>2, 4, 5</sup>. En México se ha reportado una prevalencia entre el 6.7% y el 10.2%<sup>3</sup>. La transmisión del VCH se da principalmente a través del contacto con fluidos biológicos, en las unidades de HD es favorecida por la proximidad física de pacientes bajo procedimientos que requieren de accesos vasculares con punciones frecuentes así como la alta tasa de prevalencia de la infección por VCH en esta población<sup>3-6, 7</sup>.

Los métodos para la detección del VCH involucran la detección de anticuerpos y dentro de estas la técnica de ELISA es la más utilizada, recientemente se ha introducido la Quimioluminiscencia (CLIA) como método de lectura para la determinación de reacciones enzima-sustrato como el realizado por ELISA que utiliza un sustrato capaz de emitir luz al realizarse la reacción antígeno anticuerpo. La KDIGO (*del inglés Kidney Disease Improving Global Outcomes*) recomienda la detección de anticuerpos del VCH por ELISA a todos los pacientes en HD, y en caso

de negatividad, realizar un ELISA para VCH cada 6 a 12 meses, en el caso de pacientes con elevación inexplicable de las aminotransferasas se recomienda realizar la Detección de Ácido Nucleico (NAT del inglés *Nucleic Acid Test*) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasas (PCR del inglés *Polimerasa Chain Reaction*) y, cuando exista sospecha de que los casos nuevos sean nosocomiales, realizar NAT a todos los pacientes que pudieron estar expuestos<sup>1,3,8</sup>.

En estudios que comparan la sensibilidad del ELISA y la determinación de PCR del VCH, sugieren que en pacientes con falla renal terminal, así como en pacientes inmunocomprometidos se puede subestimar la prevalencia de infección para pacientes en HD en los que solo se realice un escrutinio serológico<sup>8</sup>. La inmunosupresión parcial de estos pacientes puede generar una pobre respuesta de anticuerpos y ser un factor contribuyente, sin embargo, el significado real en estos paciente aún no se ha determinado<sup>9, 10</sup>. Como otro factor importante en este tipo de pacientes es la modificación en los niveles de aminotranferasas, las cuales pueden ser modificadas durante la HD, principalmente presentan una disminución en sus valores asociados a la hemodilución con la que ingresan los pacientes al procedimiento, esto fue analizado por Lopes y Cols. que corroboraron la reducción en las transaminasas al tomar la muestra previa a la sesión de HD y encontraron un incremento en las transaminasas relacionado al volumen ultrafiltrado posterior a la sesión de HD. La variación en los niveles de AC de VCH no se ha determinado en este tipo de pacientes ni durante el procedimiento de HD por lo que una variación en su valor pudiera afectar la validez diagnostica de esta prueba<sup>11</sup>.

## IV. ANTECEDENTES

---

En 1992, Pereira y Cols. compararon el ELISA de primera y segunda generación con la detección del VCH por PCR en pacientes receptores de trasplante de donadores con infección conocida por VCH, encontrando una subestimación de la detección de la infección con anticuerpos por ELISA en comparación con PCR. Reportaron una sensibilidad del PCR para la detección del Ácido Ribonucleico (ARN) del HVC del 100% y para la detección de anticuerpos anti VCH por ELISA de primera generación del 62 %<sup>9</sup>. Lok y Cols. en 1993 realizaron un estudio para comparar sensibilidad del ELISA de segunda generación y PCR para la detección de VCH en pacientes inmunocomprometidos con infección conocida por VCH y encontraron una sensibilidad mayor con la determinación de PCR, especialmente en pacientes trasplantados de médula ósea y riñón<sup>10</sup>.

Lopes y Cols. en 2009 reportaron fluctuaciones en los niveles de transaminasas en los pacientes en HD y encontraron una asociación de estas en relación al estado de volemia del paciente, que puede ser más bajo antes de la sesión de HD debido a hemodilución y puede incrementarse posterior a la sesión, dependiendo del volumen ultrafiltrado durante la diálisis<sup>11</sup>. Las fluctuaciones en los niveles anticuerpos y la viremia del VCH no se ha documentado, y ésta puede estar modificada por la absorción del virus por la membrana del dializador, por modificaciones en la volemia y niveles bajos de anticuerpos en pacientes con IRC ya que estos pacientes son considerados como inmunocomprometidos.

## V. OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL.

Demostrar que los anticuerpos para VCH disminuyen por hemodilución en los pacientes con falla renal crónica y se modifican después de la hemodiálisis, comprometiendo su validez diagnóstica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Demostrar que los niveles de anticuerpos contra VCH disminuyen por hemodilución.

Demostrar que los niveles de anticuerpos contra VCH incrementan posterior a la sesión de hemodiálisis.

## VI. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

---

Los marcadores serológicos para VCH (anticuerpos para VCH por CLIA,) en pacientes con insuficiencia renal crónica se modifican con la hemodiálisis, comprometiendo su validez diagnóstica.

### HIPÓTESIS ALTERNA

Los anticuerpos para VCH en pacientes con IRC se encuentran diluidos y posterior a sesión de HD se modifican.

### HIPÓTESIS NULA

Los anticuerpos para VCH no presentan modificación por hemodilución ni cambios posterior a sesión de HD

## VII. JUSTIFICACIÓN

---

La infección por el VCH es la infección transmitida por vía hematológica más frecuente en los pacientes en HD, sin embargo puede pasar inadvertida por causas diversas; dentro de ellas la sensibilidad de las pruebas empleadas, siendo menor para el ELISA de segunda y tercera generación, además de que existen condiciones que pueden modificar la respuesta inmunológica al considerarse a estos pacientes con inmunosupresión, con bajos niveles de anticuerpos, así como hemodilución por sobrecarga de volumen previo al procedimiento dialítico.

La detección y amplificación de las partículas de ARN viral por PCR presenta una mejor sensibilidad y especificidad, pero puede modificarse por hemodilución del paciente previo a sesión de HD o por absorción del virus en la membrana dialítica modificando su valor posterior y, con esto, pasar inadvertidos con el riesgo de contaminación nosocomial y sin posibilidad de un manejo adecuado.

Las recomendaciones internacionales por la KDIGO sugieren el escrutinio para la detección de infección por VCH mediante la detección de anticuerpos por ELISA y solo en situaciones especiales determinar los niveles de ARN, en México para determinar la presencia de infección por VCH se basa en la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA3-2010 recomienda únicamente la determinación de anticuerpos al ingreso y cada seis meses.

No existen publicaciones que comparen los niveles de anticuerpos en pacientes con IRCT ni variación en el nivel de anticuerpos dados por la sesión de hemodiálisis, y teniendo en cuenta que es una población especial queda la interrogante abierta. La finalidad del presente estudio es la de determinar si existen variación en los niveles de anticuerpos, y al documentarlo solicitar modificaciones en las recomendaciones en el estudio de los pacientes con falla renal en HD.

## VIII. MARCO TEÓRICO

---

### VIII.1 DEFINICION Y GENERALIDADES

La hepatitis C es una infección viral del hígado ocasionada por un virus RNA, miembro de la familia flaviviridae, genero hepacivirus, que se replica de forma preferente en los hepatocitos y aunque no tiene actividad citopatica directa se asocia a una infección crónica y persistente. Puede ocasionar una infección aguda con evolución fulminante con una frecuencia similar a la infección por el virus B de la hepatitis<sup>2</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la prevalencia global de la infección por Virus C de Hepatitis (VCH) es alrededor del 3%, cerca de 170 millones de personas en todo el mundo, lo anterior por datos obtenidos en estudios de escrutinio en donadores de sangre, pero la prevalencia de casos confirmados por estudios de Inmunoensayo Enzimático (ELISA) presenta grandes variaciones que va de menos del 0.1% en el norte de Europa a 0.1 a 0.5% en el Oeste de Europa<sup>1</sup> y el 2% en el Norte de América, en América Central, Sudamérica y Australia<sup>2</sup>. En estudios de prevalencia en México han variado de 0.7% a 2% en donadores de sangre<sup>3</sup>.

Más de 53.700 muertes al año pueden ser directamente atribuibles al VHC, aunque la OMS estima que más de 308.000 muertes al año son probablemente debidas al cáncer de hígado causado por el VHC, junto a una proporción significativa de 785.000 muertes por cirrosis. En conjunto, estos datos sugieren que el VHC es responsable de aproximadamente un millón de muertes al año<sup>1-2</sup>.

### VIII.2 CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El VCH es una cadena de ARN de hélice única y pequeña, con una envoltura lipídica (E) que contiene glucoproteínas (E1 y E2) y un núcleo con un genoma que consiste de 95,000 nucleótidos. Los componentes del VCH son estructurales (núcleo, E1 y E2) y no estructurales (NS; P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). Los genes no estructurales codifican varias enzimas que incluyen una polimerasa que es la responsable para su replicación<sup>1</sup>. Después de la identificación del Virus de la Hepatitis B (VBH) en los 1960s, se hizo aparente la presencia de casos pos

transfusionales que no podían ser explicados, siendo nombrados hepatitis no A no B, el agente causal no se conoció sino hasta 15 años después, cuando se identificó el ARN de un chimpancé infectado con suero de un paciente con hepatitis no A no B, un clon reactivo de un virus que fue nombrado VCH. Esto condujo al desarrollo de la prueba de ELISA de primera generación que detecta anticuerpos contra una proteína estructural del VCH (C100-3)<sup>8</sup>.

### VIII.3 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD Y FACTORES DE RIESGO

#### TRANSMISIÓN PARENTERAL

La vía de transmisión más frecuente es la vía parenteral percutánea siendo el uso de drogas por vía intravenosa la principal forma de transmisión del VHC en el momento actual en el que más del 50% de los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) son anti-VHC positivos.

También se puede transmitir a pacientes que reciben una transfusión sanguínea o de hemoderivados (esta vía casi desapareció tras la aparición de la aplicación de pruebas de escrutinio anti-VHC en 1992, 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 1 caso por cada 100.000 unidades transfundidas)<sup>16</sup>.

Otras vías de transmisión parenteral incluyen la hemodiálisis, el trasplante de órganos (antes de 1992), al igual que los tatuajes, la acupuntura y los piercing, si bien estos últimos están solo implicados ocasionalmente.

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

### Transmisión nosocomial

La 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)<sup>16</sup>.

Este tipo de transmisión puede ocurrir de paciente a paciente (documentado en salas de hemodiálisis, hematología y hepatología<sup>40</sup>), 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). También se ha descrito la transmisión del VHC en relación con colonoscopias, especialmente si se efectúan biopsias.

## TRANSMISIÓN NO PARENTERAL

### Transmisión sexual

El riesgo de transmisión a largo plazo en relaciones monógamas heterosexuales es menor del 5%. El riesgo se incrementa hasta el doble si el paciente mantiene relaciones sexuales sin protección (sin preservativo) con múltiples parejas sexuales. No existen evidencias que sustenten la transmisión del VHC a través del sexo oral.

### Transmisión vertical o perinatal

El riesgo de transmisión vertical es del 5% de promedio, porcentaje que se triplica en los niños nacidos de madres coinfectadas por VIH. La lactancia materna no ha sido implicada a largo plazo en la transmisión del VHC al recién nacido, excepto en casos de grietas en el pezón con sangrado.

### Transmisión horizontal

La transmisión intrafamiliar entre contactos domésticos, siempre que no haya relaciones sexuales o contacto sanguíneo, es prácticamente inexistente o excepcional. Por tanto, el virus de la hepatitis C no se transmite por abrazar, besar, o compartir utensilios para comer.

Los pacientes en HD tienen un mayor riesgo para las infecciones transmitidas por vía hematológica como VCH, VBH y Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección por el VCH es la infección por vía hematológica más común entre los

pacientes con hemodiálisis crónica en Estados Unidos, con una prevalencia 5 veces superior a la población general. La transmisión del VCH en las unidades de HD es favorecida por la proximidad de los pacientes, así como las múltiples punciones, la alta tasa de hemotransfusión y de prevalencia de VCH en esta población<sup>4, 12-14</sup>.

Por lo anterior, la KDIGO recomienda la detección del VCH a todos los pacientes en HD, y en caso de negatividad realizar un ELISA cada 6 a 12 meses, en el caso de pacientes con elevación inexplicable de aminotransferasas realizar las NAT y, en sospecha de que los casos nuevos sean nosocomiales, realizar NAT a todos los pacientes que pudieron estar expuestos<sup>1</sup>.

Existe una fuerte indicación que los estudios de pacientes en hemodiálisis en los que solo se realice un escrutinio serológico se puede subestimar la prevalencia de infección por VCH<sup>9, 10, 15</sup>. La inmunosupresión parcial de estos pacientes resulta en una pobre respuesta de anticuerpos y puede ser un factor contribuyente.

#### VIII.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VCH

La presencia de anticuerpos para VCH indica una infección presente o pasada, sin embargo, cuando hay positividad para VCH por PCR, indica infección activa por detección de la presencia de ARN del VCH en la sangre. La frecuencia en la elevación de alanino aminotransferasa (ALT) en pacientes infectados con VCH y con falla renal crónica que requieren HD ha sido reportada entre 4 y 67%. Por otro lado, entre el 54 y 75% de pacientes con anticuerpos para infección por VCH sin falla renal tiene elevados niveles de ALT. En base a esta consideración, el nivel de ALT es un pobre predictor de daño hepatocelular en la población en HD crónica.

### VIII.5 METODOS INMUNOLOGICOS

La infección por el VCH es por rutina diagnosticada y monitorizada por detección de anticuerpos y/o ARN del VCH en plasma o suero. Los métodos de detección han ido evolucionando desde la detección del VBH en los 1960s con el desarrollo de ELISA de primera generación para la detección de la proteína C100-3; posterior a esto, los estudios de *Inmunoblots* y ELISA fueron desarrollados para la detección en contra de múltiples proteínas no estructurales, así como el núcleo del VCH<sup>1, 8</sup>. El incremento en la sensibilidad de las pruebas de tercera generación para VCH ha hecho que los de primera generación sean obsoletos, eso además causó una reducción del riesgo de transmisión del VCH por componentes sanguíneos y reduciendo el tiempo entre la adquisición y el desarrollo de anticuerpos anti VCH (periodo ventana). Durante determinadas reacciones químicas, la luz generada por este fenómeno constituye una alternativa conveniente y muy sensible para las mediciones de absorbancia en ELISA. Los tipos de ELISA que recurren a la quimioluminiscencia (CLIA) utilizan un sustrato que genera luz, en lugar del sustrato cromógeno de las reacciones ELISA ordinarias. Tales son los casos de la oxidación del compuesto luminol por peróxido de hidrógeno y la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que producen luz.

La luz que se genera en dichas reacciones puede detectarse gracias a su capacidad de sensibilizar una película fotográfica. La medición cuantitativa de la emisión de luz puede hacerse mediante el uso de un luminómetro. La ventaja de las pruebas de quimioluminiscencia sobre las cromógenas es la mejoría de la sensibilidad. En general, el límite de detección puede aumentarse al menos diez veces si se cambia un sustrato cromógeno por uno que emita luz, y más de doscientas veces cuando se adicionan agentes potenciadores.

### VIII.6 METODOS MOLECULARES

Las NAT se basan en la detección cualitativa o cuantitativa de RNA del VCH y en la amplificación del ARN usando Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) siendo convencional, PCR en tiempo real o Amplificación Mediada por Transcripción (TMA del inglés Transcription Mediate Amplification). Todos los ensayos comerciales

disponibles pueden detectar  $50\text{UIml}^{-1}$  del RNA del VCH e incluso menos y son igual de sensibles para cualquier genotipo<sup>1</sup>.

En algunas unidades de HD la detección del VCH se basa en el monitoreo de los niveles de ALT; sin embargo, se ha encontrado una fluctuación de estos en relación al estado de volemia del paciente, puede ser bajo antes de la sesión de HD debido a hemodilución y puede incrementarse posterior a la sesión, dependiendo del ultra filtrado durante la diálisis. Las fluctuaciones en los niveles del VCH no se han documentado y esta puede estar modificada debido a la absorción por la membrana en el dializador, cadenas de VCH no virulentas. El presente trabajo se basa en la determinación de los niveles de anticuerpos del VCH previo y posterior a la sesión de HD para determinar si existen variaciones significativas en su valor y con esto comprometer su validez diagnóstica.

## IX. METODOLOGÍA

### IX.1 Tipo de estudio y diseño

Se realizó un estudio observacional, transversal, abierto, analítico, monocéntrico

### IX.2 Variables, definiciones conceptuales y operacionales

Tabla 1. Definición conceptual y operacional de las principales variables.					
Variable	Tipo de variable	Nivel de medición	Definición conceptual.	Definición operacional	Unidades de medida
Anticuerpos contra el VCH por CLIA	Independiente Cuantitativa Continua	Razón	Es la determinación de anticuerpos contra fragmentos estructurales y no estructurales del VCH determinado por CLIA.	El valor obtenido por el analizador de ELISA por Quimioluminiscencia del suero del paciente expresada como la relación entre señal/valor de corte (S/CO)	Unidades
Edad	Independiente Cuantitativa Discreta	Intervalo	Es la edad del paciente en años cumplidos	Se obtuvo la edad registrada en el expediente clínico en base al número de seguridad en años cumplidos a partir de su nacimiento.	Años.
Sexo	Independiente Cualitativa	Nominal Dicotómica	Es la condición fenotípica determinada por los cromosomas sexuales.	Se obtuvo el sexo registrado en el expediente clínico del paciente	Femenino o Masculino
Peso	Independiente Cuantitativa Continua	Intervalo	Es la fuerza ejercida por la masa y gravedad de cuerpo	El valor obtenido por la báscula de grado medico calibrada	Gramos
Tiempo en HD	Independiente Cuantitativa Discreta	Razón	Periodo de tiempo desde el inicio de la HD a la fecha del estudio	Tiempo que marca el expediente clínico del inicio de la HD a la fecha del estudio	Meses
Ultrafiltrado	Independiente Cuantitativa Continua	Intervalo	Constituye el volumen del líquido que es extraído del paciente por diferencia de presión y es eliminado	Se considera al valor que muestra el dializador como valor negativo al final de la sesión de HD	Litros.

### IX.3 Cálculo de Tamaño de la Muestra

Se determinó una muestra por conveniencia que incluya a todos los pacientes del Hospital General Regional No. 20 en terapia dialítica que cumpla con los criterios de inclusión

### IX.4 Muestreo

Por las características del estudio se consideró un muestreo no probabilístico, se incluyó a los pacientes de todos los turnos de forma progresiva, matutinos en máquinas numeradas de 1 a 9.

### IX.5 Universo de Estudio

El universo del estudio incluyó a todos los pacientes del Hospital General Regional No. 20 en terapia de HD

### IX.6 Criterios de Inclusión

Los criterios de inclusión fueron los siguientes

- Hombre o mujer de 18 años o más
- Encontrarse bajo tratamiento en la Unidad de Hemodiálisis
- Tener al menos 6 meses en HD
- Aceptar su participación voluntaria en el estudio

### IX.7 Criterios de Exclusión

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con exacerbación de sus enfermedades que cause respuesta inflamatoria sistémica
- Cursar con evento infeccioso al momento de la toma de muestra
- Pacientes que no autoricen el consentimiento

### IX.8 Criterios de Eliminación

Los criterios de eliminación fueron:

- Pacientes con datos incompletos

### IX.9 Reclutamiento de Pacientes

Se realizó una plática informativa a los pacientes de HD, 30 minutos antes de su sesión para los 4 turnos, donde se informará el motivo, objetivo del estudio, criterios de inclusión, exclusión y eliminación, especificando los datos que se requieren y el número de muestras que se tomarían, se resolvieron las dudas planteadas y se firmó el consentimiento bajo información.

### IX.10 Medición de las Variables

A continuación se especifica la forma como se midieron cada una de estas variables.

**Edad:** Edad del paciente, cuantificada en años. Se realizó una revisión del expediente clínico y en base al número de seguridad social que especifica el año de nacimiento, se calculó la edad en años al día de la evaluación.

**Peso y talla:** Se determinaron las medidas antropométricas de peso en kilogramos y talla en metros previa evacuación de intestino y vejiga, en bata hospitalaria y sin calzado con báscula de piso con estádmetro marca Pyro Rey de grado medico calibrada según recomendaciones del fabricante. Se realizó la determinación del peso inmediato previo a la sesión de HD e inmediato posterior al término.

**Ultrafiltrado:** Constituye el volumen del líquido que es extraído del paciente por diferencia de presión y es eliminado. Todos los parámetros de la hemodiálisis fueron realizados en base a la indicación del médico tratante y el ultrafiltrado se realizó en base al peso del paciente y de su peso seco. El resultado de la ultrafiltración es reportado por la máquina de hemodiálisis al término del procedimiento

**Anticuerpos contra VCH por CLIA:** La determinación de los anticuerpos por quimioluminiscencia del VCH se realizó con el equipo Beckman Coulter modelo ACCESS (Beckman Coulter Ireland, Inc.). La determinación de anticuerpos por este método consiste en un análisis inmunoenzimático indirecto. La muestra (suero, plasma o control) se introduce en una cubeta de reacción con partículas

paramagnéticas revestidas con un péptido que imita los epítopes inmunodominantes de la región cápside, y proteínas recombinantes (NS3 y NS4). Durante la incubación tanto el IgG como el IgM presentes en la muestra son capturados por la fase sólida.

Tras la incubación, se recoge la fase sólida mediante un campo magnético y se retiran los materiales no unidos por medio de una serie de lavados. En el segundo paso, el conjugado (anticuerpos de cabra anti IgG humano, marcados con fosfatasa alcalina) se añade a la cubeta de reacción. Tras la incubación, otra serie de lavados elimina el exceso del conjugado. Se añade un substrato quimioluminiscente, Lumi-Phos\* 530, y se miden con un luminómetro los fotones generados por la reacción enzimática. Los resultados se expresan como señal/valor de corte (S/CO) expresado en unidades con un rango de medición que va desde 0.01 a 50, considerando positivo o reactivo al  $S/CO \geq 1$  y negativo o no reactivo  $\leq 0.9$ . Se reporta como zona gris al valor de S/CO entre 0.9 y 1. La sensibilidad de la detección de anticuerpos para VCH por esta prueba es de 99.7% y la sensibilidad del 99.83% (99.7 a 99.9% con 95% de intervalo de confianza). La precisión de la prueba se refiere con una reproducibilidad intraensayo inferior al 5% y la reproducibilidad interensayo inferior al 10% de variación. Se realizó la determinación de Ac para VCH en dos muestras, la primera al realizar la conexión del paciente al filtro del dializador por el puerto para toma de muestras y la segunda al término de la sesión de HD por el mismo puerto.

**Tiempo en HD:** se determinó como tiempo en hemodiálisis al periodo de tiempo en meses entre el inicio de la terapia de sustitución con HD al día de la recolección de datos. Esto obtenido del expediente clínico.

**Sexo:** Se determinó durante la entrevista en base a las características fenotípicas del participante y se refiere como femenino o masculino.

### IX.11 Análisis de datos

Se realizó la descripción de las medias, mediana, desviaciones estándar y rango intercuartílico para las variables numéricas y frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas en el análisis univariado. Se comparó los niveles de anticuerpos contra VCH por CLIA, el peso y ultrafiltrado antes y después de hemodiálisis en los pacientes. Se realizó el análisis de las medias por la prueba de T para muestras relacionadas. Se determinó significancia estadística con p estableciendo un alfa de .05 a una cola e intervalos de confianza al 95% para los estimadores.

## X. RECURSOS

---

### X.1 Recursos Humanos

- Investigador Principal 1
- Investigador Tutor 1
- Personal médico 1
- Enfermera 2
- Químico 1

### X.2 Recursos Materiales

- Unidad de Hemodiálisis
- Oficina
- Tubos de ensayo 120 unidades
- Jeringas de 10cc 120 unidades
- Agujas calibre 22 120 unidades
- Torundas 5 paquetes
- Guantes de látex 200 pares
- Computadora de escritorio 1
- Computadora portátil 1
- Hojas de papel 500 unidades
- Lápices 1 caja
- Plumas 1 caja
- Programa de computadora Excel y SPSS
- Báscula de piso con escala métrica y estadímetro 1

## XI. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

---

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud, título segundo, capítulo I, artículo 17, sección II, investigación con riesgo mínimo, se anexa hoja de consentimiento informado (Anexo 1). El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Baja California.

## XII. RESULTADOS

El estudio se realizó en la unidad de HD del Hospital General Regional No. 20 durante el periodo de agosto a octubre del 2012.

Es estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Tijuana.

### Estadísticos

		edad	sexo	duracionHD	ultrafiltrado	pesopreHD	pesopostHD	CLIppe	CLIpst	tiempoHD
N	Válido	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Perdidos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Media		49.1400		2.5880	3360.0000	67.5180	64.2680	1.1940	1.1978	35.5200
Desviación estándar		16.29450		.23681	802.03822	15.39001	15.47869	3.40229	3.38384	31.63584
Mínimo		12.00		2.00	1500.00	34.30	32.00	.02	.03	6.00
Máximo		77.00		3.00	5000.00	106.00	102.70	12.25	12.26	156.00

Tabla 1, de frecuencias, se presentan media, desviación estándar, máximos y mínimos. N=50.

Se reclutaron 65 pacientes con IRCT en terapia sustitutiva de la función renal en programa de HD que incluía en total de la población, se eliminaron 3 por incapacidad para la determinación del peso (pacientes con amputación supra condílea bilateral), 5 pacientes que no firmaron el consentimiento informado y 7 de los cuales no se completaron la determinación de los anticuerpos para VCH. De los 50 pacientes (N) que se completó la evaluación, el 50% fueron hombres y 50% mujeres, la edad promedio fue de  $49 \pm 16.3$  años (rango de 12 a 77 años). La duración promedio de la terapia dialítica fue de  $2.58 \pm 0.23$  hrs (rango de 2 a 3 hrs).

La pérdida de líquido mediante ultrafiltración por la HD en promedio fue de  $3360 \pm 802$ cc (con rango de 1500 a 5000cc), el peso promedio previo a la sesión de HD fue de  $67,518 \pm 15,390$  grs (rango de 34,300 a 106,000 grs) y el peso promedio posterior a HD fue de  $64,268 \pm 15.478$  grs (rango de 32,000 a 102,700 grs) y la determinación de anticuerpos anti VCH por CLIA previo a la HD con un promedio

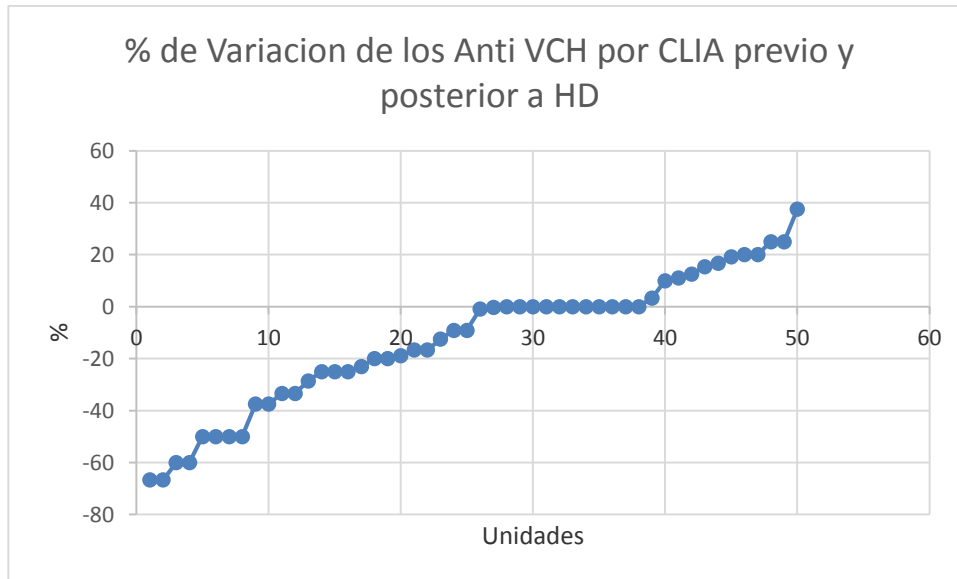
de  $1.19 \pm 3.40$  unidades (rango de 0.02 a 12.25 u) y los anticuerpos posterior a HD con promedio de  $1.21 \pm 3.38$  u (rango de 0.03 a 12.26 u). (Tabla 1)

**Prueba de muestras emparejadas**

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par pesopreHD - 1 pesopostHD	3.25000	1.33833	.18927	2.86965	3.63035	17.171	49	.000
Par CLIppe - CLIpst 2	-.00380	.06138	.00868	-.02124	.01364	-.438	49	.663

Tabla que muestra la comparación de medias del peso previo y posterior a la sesión de hemodiálisis, así como la diferencias de las medias del valor de los anticuerpos anti VCH previos y posterior a la sesión de hemodiálisis.

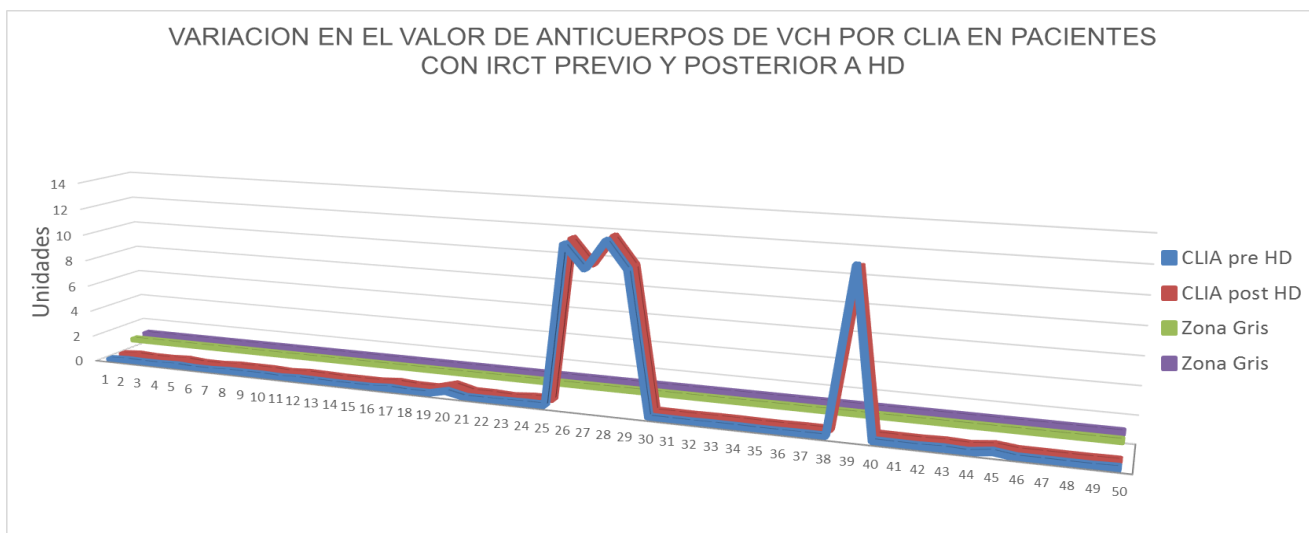
Al realizar el análisis de las medias por la prueba de T para muestras relacionadas en los valores del peso previo y posterior a HD se obtuvo una media de  $3.25 \pm 1.33$  con un rango de 2.86 a 3.63 con un intervalo de confianza del 95% y un valor de  $p < 0.01$  considerando estadísticamente significativa y para la determinación de los niveles de los anticuerpos anti VCH por CLIA la media fue de  $-0.038 \pm 0.061$  con un rango de -0.021 a 0.013 con un intervalo del 95% y un valor de  $p < 0.663$  considerando sin significancia estadística. (Tabla 2)



Grafica 1. Muestra el porcentaje de variación del valor de los anticuerpos del VCH por CLIA antes y después de la sesión de HD.

El porcentaje de variación promedio en los valores de los Anti VCH por CLIA fue de  $-12.60 \pm 26.02$  % (rango de -66.67 a 37.5 %), con valores pos HD sin cambio 13, valores menores 25 y superiores 12. Como se muestra en la gráfica 1.

La variación en el nivel de anticuerpos para VCH previo y posterior a la sesión de HD, como se observa en la gráfica 2, estos no mostraron cambios significativos que pudieran considerarse significativos ya que estas modificaciones no se acercaron al punto de corte de la zona gris y mucho menos al cambio de un valor previamente negativo o inferior a 0.9 a un valor positivo, mayor de 1, ni en sentido inverso



Grafica 2. Muestra la variación en el valor de los anticuerpos anti VCH por CLIA antes y después de la sesión de HD y el valor de corte para considerar zona gris y determinar si existe la suficiente variación para poder modificar el resultado

### XIII. DISCUSIÓN

---

El presente estudio muestra que al ser tomados en su totalidad los pacientes en el programa de HD no hay concordancia la modificación en el valor de los anticuerpos anti VCH con los resultados obtenidos por otros autores donde se asegura que hay variación en los niveles de transaminasas las cuales sufrieron modificaciones posterior a la hemoconcentración, manifestada esta por el volumen perdido durante la ultrafiltración y corroborada por la disminución de peso del paciente al término de la sesión de HD. El nivel de anticuerpos anti VCH no presento cambios clínicos y estadísticos significativos en comparación con Lopes y Cols<sup>11</sup>. La variación presentada en nuestros pacientes fue en ambos sentidos, siendo mayores, menores e incluso iguales a los valores basales con un porcentaje de variación fue negativo, con valores que no presentaron cambio en 13 pacientes, el valor fue menor en 25 pacientes y superiores 12 pacientes. El porcentaje de variación si se considera superior al reportado por el fabricante que oscila entre  $\pm 10\%$  del valor basal. Las modificaciones en los valores no son suficientemente importantes en la práctica clínica ya que ningún valor se modificó lo suficiente para lograr acercarse a la zona gris, considerada entre 0.9 a 1.0 unidades, y mucho menos de presentarse un valor inferior a 0.9 o superior a 1.0 unidades virar a un sentido contrario por lo tanto no presentan repercusión clínica.

## XIV. CONCLUSIONES

---

Con los resultados obtenidos en el presente estudio podemos sustentar las siguientes conclusiones;

La ultrafiltración realizada a los pacientes en la sesión de HD que en promedio fue de 3,360cc demuestra la hemodilución con la que ingresan los pacientes con IRCT a sesión de HD, de forma similar a lo obtenido por Lopes y Cols.

Los niveles de anticuerpos determinados por CLIA durante la etapa pre dialítica, donde es considerada una etapa de hemodilución no se modifican posterior a la ultrafiltración que conlleva la hemoconcentración, esto determinado por la diferencia de medias que muestra una  $p < 0.663$  por lo que es considerada sin significancia estadística.

El porcentaje de variación en los niveles de anticuerpos del VCH fue en promedio de  $-12.60 \pm 26.02$  % con un amplio rango que va desde un valor negativo de  $-66.67$  a un valor positivo de  $37.5$  %, siendo muy superior a lo referido por el fabricante quien propone una variabilidad inter prueba del  $\pm 10\%$ , sin embargo no existe un patrón toda vez que se reportan valores de anticuerpos inferiores, similares y superiores al valor basal.

La diferencia en la variación de los niveles de anticuerpos no es suficiente para llevar a valores pre dialíticos y pos dialíticos acercarse a la zona gris y mucho menos virar de un valor negativo a un valor positivo o viceversa.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio contrastan con los obtenidos por otros autores en relación a la modificación de los valores de transaminasas relacionadas a la hemodilución en el momento pre dialítico asociado a un incremento en el volumen circulante, y su concentración posterior a la sesión de HD con la ultrafiltración y hemoconcentración, en este caso los niveles de anticuerpos anti VCH no mostraron un patrón específico aunque si una tendencia a incrementar posterior a HD pero sin significancia estadística ni clínica por lo que podría ser seguro la determinación de estos anticuerpos previos o posterior a la sesión de HD.

## XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Abboud O, Becker G, Bellorin-Font E, et al. KDIGO clinical practice guidelines on hepatitis C in chronic kidney disease acknowledged by ISN. *Nat Clin Pract Nephrol*. Dec 2008;4(12):648-649.
2. Morris S, Stephen S, Kelly B, et al. Management of chronic hepatitis C: Consensus guidelines. *Can J Gastroenterol*. 2007;21(C):25-34C.
3. Valdespino J, Conde-Gonzalez C, Olaiz-Fernandez G, Palma O, Kershenobich D, Sepúlveda J. Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente? *salud pública de méxico* 2007;49(suplemento 3):S395-S403.
4. Tu AW. Prevalence and incidence of hepatitis C virus in hemodialysis patients in British Columbia: Follow-up after a possible breach in hemodialysis machines. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009;20(2):19-23.
5. Chou R, Clar EC, Helfand k. Screening for Hepatitis C Virus Infection: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*. 2004;140(6):462-464.
6. AM SM, JD SF. Infection by the hepatitis C virus in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis in Mato Grosso state, central Brazil: a cohort study. *BMC Public Health*. 2007;7:32.
7. Panduro A, Escobedo-Meléndez G, Fierro N, Ruiz-Madrigal B, Zepeda-Carrillo E, Román S. Epidemiología de las hepatitis virales en México. *salud pública de méxico*. 2011;53(suplemento):s37-s45.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. *MMWR* 2001;50(No. RR-5).
9. Pereira B, Milford E, Kirkman R, et al. Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. *N Engl J Med*. 1992;327(13):910.
10. Lok A, Chien D, Choo Q, et al. Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology*. 1993;18(3):497.
11. Lopes EP, Sette LHBC, Sette JBC, et al. SERUM ALANINE AMINOTRANSFERASE LEVELS, HEMATOCRIT RATE AND BODY WEIGHT CORRELATIONS BEFORE AND AFTER HEMODIALYSIS SESSION. *CLINICS* 2009;64(10):941-945.
12. Hugo-Weclawiak, Kamar N, Ould-Mohamed A, Cardeau-Desangles I, Izopet J, Rostaing L. Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection in Dialysis Patients: An Update. *Hepatitis Research and Treatment*. 2010:6.
13. Fabrizi F, Lunghi G, Aucella F, et al. Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients. *J Clin Microbiol*. Jan 2005;43(1):414-420.

14. Marco LD, Gillio-Tos A, Fiano V, et al. Occult HCV Infection: An Unexpected Finding in a Population Unselected for Hepatic Disease. PLoS ONE. 2009;4(12):8128.
  15. Barril G, Castillo I, Arenas MD, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol. Dec 2008;19(12):2288-2292.
  16. Restrepo JC, Toro AI. Hepatitis C. Medicina y Laboratorio 2011, Vol. 17, Números 9-10.
-

## XVI. ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento bajo información

	<b>INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>
<b>CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN</b>	
Nombre del estudio:	Modificación de los marcadores serológicos para Virus C de Hepatitis (VCH) en pacientes con falla renal en hemodiálisis (HD): repercusión potencial en su validez diagnóstica.
Patrocinador externo (si aplica):	
Lugar y fecha:	Tijuana, Baja California, a los X días de x mes de 2012
Número de registro:	Pendiente.
Justificación y objetivo del estudio:	Determinar si existe una diferencia entre los niveles sericos de Anticuerpos del VCH determinados por CLIA antes y después de la sesión de Hemodialisis
Procedimientos:	Toma de muestra de sangre venosa periférica, entrevista para obtener datos generales, determinación del peso.
Posibles riesgos y molestias:	Los inherentes a la venopunción.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Detección oportuna de infección del VCH
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Se informara a cada paciente de los resultados obtenidos en los estudios de laboratorio y de forma confidencial
Participación o retiro:	Su participación no le hace acreedor a ningún beneficio económico. Su retiro o no aceptación no afectara su tratamiento médico.
Privacidad y confidencialidad:	Se garantiza la confidencialidad de los datos personales.
En caso de colección de material biológico (si aplica):	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
No autoriza que se tome la muestra.	Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.	
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	No hay beneficio directos derivados del estudio.
Beneficios al término del estudio:	
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	Dr. Jaime Aviles Valverde dravilesjaime@gmail.com
Investigador Responsable:	Dr. Rufino Menchaca Díaz.
Colaboradores:	
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: <a href="mailto:comision.etica@imss.gob.mx">comision.etica@imss.gob.mx</a>	
Nombre y firma del sujeto	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma
Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio	

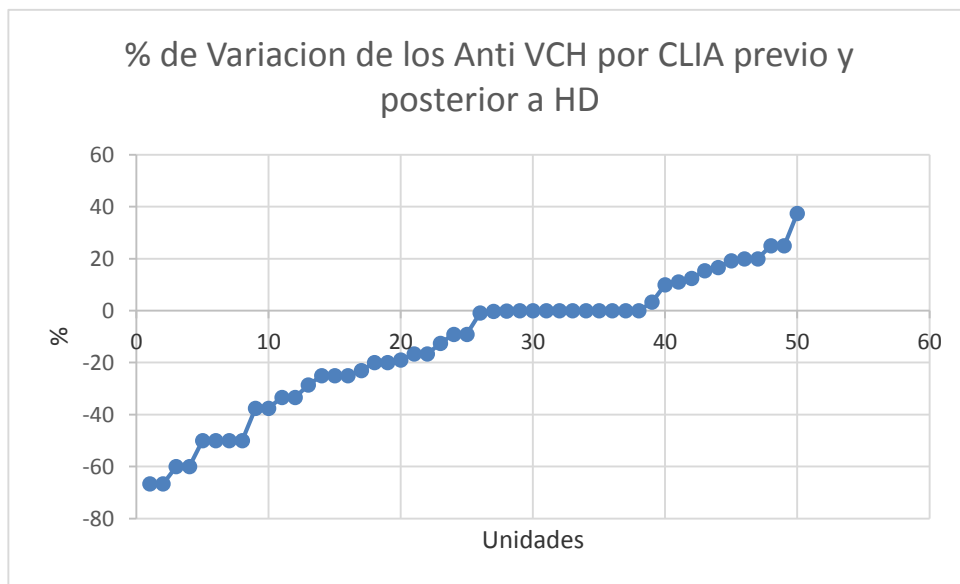
Tabla 1

Estadísticos		edad	sexo	duracionHD	ultrafiltrado	pesopreHD	pesopostHD	CLlpre	CLlpost	tiempoHD
N	Válido	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Perdidos	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Media	49.1400		2.5880	3360.0000	67.5180	64.2680	1.1940	1.1978	35.5200
	Desviación estándar	16.29450		.23681	802.03822	15.39001	15.47869	3.40229	3.38384	31.63584
	Mínimo	12.00		2.00	1500.00	34.30	32.00	.02	.03	6.00
	Máximo	77.00		3.00	5000.00	106.00	102.70	12.25	12.26	156.00

Tabla 2

Prueba de muestras emparejadas		Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	pesopreHD - pesopostHD	3.25000	1.33833	.18927	2.86965	3.63035	17.171	49	.000
Par 2	CLlpre - CLlpost	-.00380	.06138	.00868	-.02124	.01364	-.438	49	.663

Grafica 1



Grafica 2

