

EVALUACION DE UN NUEVO ELISA DE TERCERA GENERACION PARA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Blanco-Rivero, M. C., Medrano, G. C., García, M. D., Capriotti, G. A.; y Torruella, M.
Centro de Investigación y Biotecnología, Wiener lab., Rosario, Argentina.
mblanco@wiener-lab.com.ar

El presente estudio evalúa la sensibilidad, especificidad y precisión de un kit ELISA de 3ª generación para la detección de HCV, que utiliza reactivos coloreados para permitir el monitoreo de la adición de muestra y el control de procesos. Para esto, se evaluaron paneles de seroconversión, de performance y de sensibilidad para diferentes genotipos de HCV y muestras de pacientes infectados con diferentes genotipos de HCV, así como muestras conteniendo sustancias potencialmente interferentes y muestras de individuos supuestamente sanos. Los resultados obtenidos mostraron que el kit en ensayo presenta una performance adecuada para el diagnóstico de la infección por HCV en el laboratorio serológico y en el tamizaje de donantes de sangre.

Introducción

El virus de la hepatitis C (HCV) es un ARN virus envuelto, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, y se transmite por vía parenteral, causando enfermedad hepática aguda y crónica. El genoma del HCV codifica para una poliproteína que es fragmentada en las siguientes proteínas funcionales: core (proteína de la nucleocápside), E1 y E2 (glicoproteínas de la envoltura), NS3 (serina proteasa y ATP helicasa), NS4 (cofactor de NS3) y NS5 (ARN polimerasa dependiente de ARN).

Después de la exposición al virus, el período de incubación oscila entre 2 y 26 semanas. La fase inicial de la enfermedad por el HCV se denomina infección aguda y normalmente desaparece después de 2-12 semanas. El 80-85 % de las

personas inicialmente infectadas no eliminan el virus de su organismo y permanecen crónicamente infectadas. Sin embargo, la mayoría no presenta síntomas y posee una vida normal. En el 10-25 % de los infectados la enfermedad sigue progresando durante un período de 10-40 años, lo cual puede ocasionar graves daños hepáticos como cirrosis, cáncer de hígado e incluso la muerte.

La hepatitis C es una enfermedad que raramente es diagnosticada antes de la aparición de sus complicaciones crónicas. Desde la caracterización molecular del virus C en 1989 y su identificación como el principal agente etiológico de las hepatitis no-A no-B, se han desarrollado una variedad de pruebas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos anti-HCV.

El primer ensayo serológico para la de-

tección de anticuerpos contra el virus C, comercializado en 1989, consistió en un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto, que empleaba un único antígeno derivado de la región NS4 y fusionado a superóxido dismutasa. Este sistema de primera generación mostró baja sensibilidad (80 %), baja especificidad, y realizaba el diagnóstico serológico de la infección con un retraso de aproximadamente 150 días. Este largo período de ventana permitía que aún se transmitiera HCV en transfusiones.

En 1991 fueron introducidos los ELISA de segunda generación, y los antígenos constituyentes correspondieron a las regiones core, NS3 y NS4. Esta nueva versión incrementó la sensibilidad de detección a 95 %, mejoró la especificidad, y redujo el período de ventana a aproximadamente 80 días.

Desde 1993 se emplean ELISA de tercera generación, que emplean antígenos de HCV de las regiones core, NS3, NS4 y NS5. Estos inmunoensayos presentan una notable mejora en la sensibilidad y especificidad respecto a las versiones anteriores. La mayor sensibilidad del ELISA de tercera generación es atribuida principalmente a la reconfiguración de los antígenos core y NS3, antes que a la incorporación de NS5. El período de ventana con esta última generación se reduce a aproximadamente 58-72 días. No obstante, éste es aún lo suficientemente elevado como para que donantes seronegativos transmitan HCV en transfusiones y causen una hepatitis postransfusional. Por otra parte, a pesar del aumento en la especificidad en esta nueva generación de inmunoensayos, la presencia de falsos positivos, más notoria en poblaciones de baja prevalencia como los donantes de sangre, sigue siendo una de las ventajas de los ELISA para hepatitis C. Algunos autores consideran que la sensibilidad de las distintas marcas comerciales de los equipos de 3ª generación es comparable. Sin embargo, otros argumentan lo contrario y atribuyen la diferencia fundamentalmente a la distinta capacidad de reacción de los anticuerpos contra la región NS3.

Recientemente, Wiener lab. desarrolló un nuevo ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus C, **HCV ELISA 3ª generación**. Está constituido por una policubeta con pocillos recubiertos con antígenos recombinantes core, NS3, NS4 y NS5. Los reactivos son coloreados, para permitir el monitoreo de la adición de muestras y el control de procesos. El conjugado es un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana, y el revelador es listo para usar. A fin de determinar sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, este kit se evaluó con paneles de seroconversión y performance internacionales, con muestras de pacientes infectados con diferentes genotipos y subtipos de HCV, con muestras no reactivas provenientes de poblaciones de alto y bajo riesgo, y con muestras con potencialidad de desarrollar reacciones cruzadas. Además, se evaluó su aplicabilidad en el laboratorio serológico y en el control de unidades de donantes en bancos de sangre.

Descripción del kit

El kit en estudio contiene una policubeta sensibilizada, con pocillos recubiertos con antígenos recombinantes de las regiones core, NS3, NS4 y NS5 del HCV, un diluyente de muestra (color violeta), un conjugado concentrado (color rojo), un diluyente de conjugado, reveladores A y B, buffer de lavado concentrado (color verde), stopper y controles positivo y negativo.

Los pocillos de la policubeta están recubiertos con antígenos recombinantes derivados de la región estructural (core) y de la no estructural (NS3, NS4 y NS5) del virus de la hepatitis C. La muestra diluida se incuba en un pocillo. Si los anticuerpos contra el virus están presentes en la muestra, éstos se unen a los antígenos del pocillo. El material no unido es removido por lavado. En el paso siguiente se agrega el conjugado, que consiste en un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Éste se une a los complejos antígeno-anticuerpo, formados previamente. El conjugado no unido se remueve por lavado. Posteriormente, se agrega una solución conteniendo tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno. Las muestras reactivas desarrollan color celeste que vira al amarillo cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico.

Descripción de la técnica

Se dispensan 100 ul del diluyente de muestra en cada pocillo. Posteriormente, se adicionan 20 ul de las muestras o controles, sembrándose el control negativo por triplicado y el control positivo por duplicado. La policubeta se cubre con cinta autoadhesiva y se incuba durante 60 minutos a 37°C en estufa seca. Después de la incubación, se realizan 5 ciclos de lavado en un lavador automático de microplacas Stat Fax 2600, con 350 ul/pocillo/ciclo de una dilución 1/25 del buffer de lavado concentrado. A continuación se agregan 100 ul de conjugado (preparado por dilución 1/10 del conjugado concentrado con el diluyente de conjugado), se cubre la policubeta con cinta autoadhesiva, y se incuba durante 30 minutos a 37°C en estufa seca.

Luego de la incubación, se realizan nuevamente 5 ciclos de lavado como se explicó anteriormente, y se dispensan 100 ul de revelador. La policubeta se incuba 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), protegiéndola de la luz.

Finalmente se detiene la reacción con el agregado de 100 ul de stopper. Dentro de los 10 minutos, se determina la absorbancia de la solución de los pocillos con un espectrofotómetro Stat Fax 2100 con lectura bicromática a 450/630 nm.

Se considera reactiva toda muestra cuya absorbancia supere el valor de corte, determinado por 0,150 más la absorbancia del promedio de los controles negativos.

Resultados

Sensibilidad en paneles de performance:

En el estudio realizado con diferentes paneles comerciales internacionales, se obtuvieron los siguientes resultados, resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1

Panel	Muestras reactivas	Muestras detectadas
PHV 103	14	14
PHV 105M	12	12
PHV 106	14	14
PHV 205	23	23
PHV 206	23	23
PP 0404	16	16
PP 0405	16	16
PP 0406	16	16

Sensibilidad en paneles de seroconversión:

En el estudio realizado con paneles de seroconversión de BBI (USA) se obtuvieron los siguientes resultados, que se resumen en la Tabla 2.

Sensibilidad a diferentes genotipos:

En la evaluación del Worldwide HCV Performance Panel WWHV 302 BBI, USA, se detectaron las 14 muestras reactivas (correspondientes a los 6 genotipos existentes). Además, se detectaron 14 muestras del genotipo 1, 5 del genotipo 2 y 4 del genotipo 4 de un panel interno.

Tabla 2

Panel	Nº muestras	HCV ELISA 3ª generación*	RIBA*	Patrón de seroconversión	Genotipos
PHV 901	11	9 (97)	9 (97)	NS3-NS4	1a
PHV 906	7	5(7)	7 (0)	NS3-NS4	1b
PHV 910	5	3 (8)	3 (8)	core	1b
PHV 912	3	1 (7)	1 (7)	core	2b/3
PHV 920	10	7 (13)	7 (13)	core-NS3	1a

* Se indica el número de muestras reactivas con cada método. El número entre paréntesis indica el número de días entre el sangrado inicial y la primera muestra reactiva.

Sensibilidad clínica en paneles de muestras reactivas anti-HCV:

En un estudio realizado sobre 190 muestras con infección por HCV, confirmada por diferentes métodos, se encontraron reactivas con el kit HCV ELISA 3ª generación la totalidad de las muestras. En otro estudio con 356 muestras reactivas provenientes de diferentes instituciones hospitalarias, se detectaron 355 muestras. La sensibilidad en la totalidad de las muestras evaluadas fue 99,82%. En la Tabla 3 se muestra un resumen de la sensibilidad obtenida con las diferentes poblaciones y paneles.

Tabla 3

Paneles	Nº muestras	Sensibilidad
Performance	134	99,25%
Genotipos	37	100%
Interno	190	100%
Institución hospitalaria	356	99,72%
Total	719	99,72%

Sensibilidad analítica:

El término sensibilidad analítica se emplea para expresar la mínima cantidad detectable de un analito para el ensayo en consideración. Se analizó la sensibilidad analítica de este nuevo ensayo con muestras en dilución. Se detectaron diluciones de hasta 1/3200, dependiendo del título inicial de la muestra. La mayoría de las muestras fuertes fue detectada hasta un título de 1/400. No se observaron diferencias entre la dilución en suero vacuno o matriz humana negativa.

Los anticuerpos sintetizados en la fase temprana de la seroconversión y los que aparecen en la fase tardía de la enfermedad pueden diferir en sus propiedades funcionales. Por lo tanto, es importante destacar que estas diluciones artificiales de sueros altamente reactivos (con anticuerpos tardíos) no equivalen a sueros naturales con bajo título. Estos últimos son preferidos para estudiar la sensibilidad clínica o diagnóstica, ya que reflejan el cuadro serológico real en la fase temprana de la infección por HCV.

Especificidad:

La especificidad debe ser ensayada separadamente en poblaciones de alto y bajo riesgo, ya que la proporción de falsos positivos aumenta en la población de baja prevalencia. En este caso, la especificidad fue evaluada en muestras frescas provenientes de banco de sangre

Tabla 5

Condición clínica	Nº muestras	Falsos positivos
Embarazadas	46	-
Hemodializados	58	-
Autoanticuerpos ^a	72	1
Enfermedades virales ^b	209	6
Enfermedades bacterianas y parasitarias ^c	171	2
Total	556	9

^a con autoanticuerpos AGA, AMA, ACA, ATA, FAN, factor reumatoideo y otros

^b con anticuerpos contra HAV, HBV, EBV, CMV, HSV, VZV, HIV, HTLV y otros virus

^c con anticuerpos contra *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Toxocara canis*, *Trypanosoma cruzi* y otros microorganismos

(baja prevalencia de HCV), y de 2 centros hospitalarios con alta prevalencia de hepatitis C. Todas las muestras discrepantes que se presentaron fueron confirmadas con 2 ensayos HCV ELISA de competencia, y en caso de persistir la discrepancia se realizó Inno-LIA HCV Score. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 4.

Además, se estudió la posible aparición de reactividad cruzada evaluando 556 muestras provenientes de individuos con diferentes condiciones clínicas que po-

Tabla 4

Población		Número de muestras	Especificidad
Banco de sangre		1364	99,41%
Hospitalaria	Centro 1	969	99,69%
	Centro 2	691	99,42%
Total		3024	99,50%

drían ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo HCV ELISA 3ª generación. La especificidad obtenida para esta población fue de 98,38%. Los resultados detallados se resumen en la Tabla 5.

Precisión:

Se evaluó la precisión de la prueba siguiendo el protocolo EP5-A recomendado por la CLSI. Los ensayos fueron realizados con los controles y con muestras de diferentes niveles de reactividad en el ELISA. Se realizaron 2 ensayos diarios evaluando cada muestra por duplicado y durante el transcurso de 20 días (n = 80). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Muestras	Media de absorbancia	Intraensayo		Interensayo	
		D.S.	C.V.	D.S.	C.V.
Muestra 1	0,330	0,026	7,92%	0,038	11,42%
Muestra 2	0,405	0,031	7,73%	0,050	12,37%
Muestra 3	0,579	0,044	7,53%	0,075	13,02%
Muestra 4	0,976	0,076	7,76%	0,102	10,42%
Muestra 5	0,516	0,049	9,48%	0,077	14,95%
Control Positivo	1,297	0,082	6,30%	0,164	12,64%
Control Positivo (2)	1,295	0,109	8,38%	0,158	12,23%
Control Negativo	0,047	0,004	9,38%	0,007	14,86%
Control Negativo (2)	0,047	0,005	11,43%	0,007	15,72%

D.S.: desvío standard; C.V.: coeficiente de variación

(2) Los controles fueron ensayados por duplicado

Discusión

La detección de anticuerpos contra el virus C es importante en la identificación de individuos infectados con HCV y en el tamizaje de donantes de sangre. La presencia de estos anticuerpos indica infección reciente o pasada por este virus, pero no permite diferenciar entre una infección aguda, crónica o resuelta. En las últimas décadas el riesgo de transmisión postransfusional de HCV ha disminuido dramáticamente. Con la introducción del primer ensayo para detectar anti-HCV el riesgo de transmisión por cada unidad de sangre transfundida se redujo de 0,45 % a 0,03 %. Las generaciones crecientes de ELISA han ido reduciendo notablemente el período de ventana serológica, y con ello, disminuyó aún más el riesgo de transmisión transfusional de HCV. Sin embargo, debido al tiempo prolongado que transcurre entre la infección y la seroconversión, los niveles de anti-HCV pueden ser indetectables en las fases tempranas de la infección. Así, un resultado negativo en un ELISA no excluye la posibilidad de infección por HCV, y es necesario recurrir a pruebas de detección de ácidos nucleicos para obtener una mayor seguridad transfusional.

Wiener lab. ha desarrollado un nuevo HCV ELISA 3ª generación para la detección de anticuerpos contra las regiones core, NS3, NS4 y NS5 del virus C. Presenta un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana como conjugado, revelador

listo para usar, y reactivos coloreados, para permitir el monitoreo de la adición de muestras y el control de procesos. En este trabajo se realizaron estudios para determinar la sensibilidad, especificidad y precisión de este HCV ELISA 3ª generación.

Este nuevo ensayo presentó una especificidad de 99,50% en muestras clínicas y de donantes, mientras que en una población con diferentes condiciones clínicas que podrían causar reacciones inespecíficas la especificidad fue de 98,38 %. Los resultados falsos positivos pueden deberse a un aumento de gammaglobulinas (mieloma, factor reumatoideo), enfermedades hepáticas y autoinmunes, sífilis y otras infecciones virales (HIV, HBV).

La sensibilidad fue de 99,72% en 719 muestras reactivas ensayadas, incluyendo muestras de paneles, de instituciones hospitalarias y de diferentes genotipos de HCV. Esto indica que los antígenos core, NS3, NS4 y NS5 incluidos en este HCV ELISA 3ª generación, contienen suficientes epitopes para reaccionar con los distintos genotipos. Asimismo, el comportamiento en paneles de seroconversión fue similar al observado para otros HCV ELISA de tercera generación.

En los estudios de precisión realizados según el protocolo EP5-A, recomendado por la CLSI, se observó que el coeficiente de variación interensayo con este nuevo ELISA osciló entre 10 y 15%, para muestras reactivas débiles y medianas,

mientras que el intraensayo fue menor al 10%.

Todas estas características de performance están de acuerdo con las descritas en la bibliografía para reactivos de 3ª generación. En Argentina, es importante el uso de técnicas sensibles para el tamizaje de HCV para garantizar la calidad de los bancos de sangre, ya que las donaciones altruistas repetidas son excepcionales y la mayoría de ellas son donaciones de reemplazo.

En resumen, este nuevo HCV ELISA 3ª generación desarrollado por Wiener lab., presenta sensibilidad, especificidad y precisión adecuadas para el diagnóstico de la infección por HCV y en el control de unidades de donantes en bancos de sangre. Asimismo, muestra robustez en su técnica y seguridad operativa, basado fundamentalmente en la calidad y coloración de los reactivos.

Bibliografía

- Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 39(1): 5-19.
- Gómez-Cordero I, Álvarez-García M. (2003) Biología y métodos diagnósticos de la hepatitis C. *Revista Biomédica*, 14: 253-268.
- Majid AM, Gretch DR. Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. (2002) *Microbes and Infection*, 4: 1227-1236.
- Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. (2001) Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepatitis*, 8(2):87-95.
- Lok ASF, Gunaratum NT. (1997) Diagnosis of hepatitis C. *Hepatology*, 26 (suppl 1): 48S-56S.
- Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A 19/2 (1999) National Committee for Clinical Laboratory Standards.