

Nuevas estrategias para el diagnóstico y seguimiento de la Hepatitis C. Evaluación de las Técnicas de laboratorio RT-PCR y EIA

New strategies in the diagnosis and treatment of hepatitis C. Evaluation of RT-PCR and EIA laboratory techniques

Bladimir Colquillo Aysallanque ¹, Rolando Sanchez Montaña ¹, Patricia Terceros Almanza ²

¹Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

²Departamento de Virología, Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud - SELADIS, Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

Dirección para correspondencia: Lic. Bladimir Colquillo A. Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Mayor de San Andrés. Campus Universitario, Zona de Cota Cota calle 27 s/n. La Paz, Bolivia.

Tel: + 591-2791117; + 591-74009072

E mail: gencab@walla.com; gencab@hotmail.es

Recibido para publicación en 30/07/09

Aceptado en 4/12/09

RESUMEN

La hepatitis causada por el Virus de la Hepatitis C (VHC) es un problema emergente en salud pública. Los métodos diagnósticos aún presentan ciertas limitantes como falta de sensibilidad y/o especificidad, tal es el caso de los métodos serológicos. Por otro lado, pese a la alta especificidad en ensayos moleculares, los mismos no se aplican por su costo elevado. Este estudio tiene por objetivo establecer el diagnóstico molecular del VHC a través del RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa) mediante monitorización a través de la técnica ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas) o EIA. En nuestro estudio, 56 muestras reactivas para VHC referidas entre los años 2006 al 2007 fueron analizadas por dos técnicas diferentes: una molecular (RT-PCR) y otra serológica (EIA) de Tercera (3.0) y Cuarta (4.0) Generación. Los resultados mostraron un 32,14% de casos positivos por RT-PCR, mientras que la reactividad obtenida por EIA 4.0 fue del 73,21% en comparación a EIA 3.0 con un 28,3%, no obstante, la concordancia para ambos EIA no es significativa [$K= 0,07$; IC 95% (0.0031,0.1387)]. Finalmente, cuando se compararon los resultados de muestras RT-PCR positivas con los de EIA, se observó mayor concordancia con EIA 4.0 (66,7%) que con EIA 3.0 (37,5%). Se evidencia claramente la necesidad de implementar ensayos de EIA 4.0 para el *screening* en todos los laboratorios de rutina y bancos de sangre por mostrar mayor sensibilidad y concordancia con RT-PCR. Así mismo, la evaluación del RT-PCR en esta población establece la necesidad de contar con pruebas de laboratorio que tengan diferentes blancos de detección para permitir un

apropiado diagnóstico y monitorización de la infección.

Palabras Clave: Virus de la Hepatitis C, Hepatitis C, diagnóstico, RT-PCR, EIA, Anti-VHC, tercera generación, cuarta generación, screening, extracción.

ABSTRACT

Hepatitis C caused by Hepatitis C Virus (HCV) is one of the main emerging health problems. The diagnostic methods currently in use still have certain limitations, such as the poor sensitivity of serological methods; and, despite the high specificity of molecular assays, these methods are not applied due to their high cost.

This aim of this study is to establish molecular diagnosis of HCV using RT-PCR (Reverse Transcription of the viral RNA by Polymerase Chain Reaction) through monitorisation using ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) also referred as EIA.

Fifty six reactive anti-HCV samples referred during the years 2006 and 2007 in Bolivia were evaluated using RT-PCR as well as third and fourth generation EIAs (EIA 3.0 and EIA 4.0) and the study found 32.14% positive cases by amplification and a greater reactivity to EIA 4.0 (73.21%) in comparison to EIA 3.0 (28.3%). Nevertheless, consistency for both EIAs is insignificant [$K= 0.07$; IC 95% (0.0031, 0.1387)]. Finally, when the positive samples of RT-PCR were compared with EIAs a greater consistency was observed with EIA 4.0 (66.7%), in contrast with EIA 3.0 (37.5%). It is clearly evident that there is a need to implement EIA 4.0 assays for screening purposes in routine laboratory tests, as well as in blood banks. Also, the implementation and evaluation through RT-PCR in this

population requires laboratory tests with different detection targets, to allow an appropriate diagnosis and treatment of the infection.

Key Words: Hepatitis C virus, Hepatitis C, diagnosis, RT-PCR, EIA, Anti-VHC, third-generation, fourth-generation, screening, extraction

INTRODUCCIÓN

Estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud indican que, al menos 170 millones de personas, que representa más del 2.8 por ciento de la población mundial padecen infección crónica por el Virus de la Hepatitis C (VHC)¹, siendo ésta una de las mayores causas emergentes de morbilidad y mortalidad en el mundo. Estas cifras constituyen casi cinco veces el número de personas infectadas por VIH. A pesar de una importante respuesta inmunológica humoral y celular, la enfermedad progresa en la mayoría de los casos a cronicidad (85%) y su ciclo natural termina en cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular después de un curso asintomático que puede extenderse por dos o tres decenios. Es así que la prevención y control de las enfermedades virales represente actualmente una de las prioridades de la salud pública².

Históricamente la transmisión del VHC se ha asociado predominantemente con transfusiones de sangre, aunque también puede contagiarse por otras “vías parenterales inaparentes” (relaciones sexuales, transmisión perinatal, vía intravenosa en drogo-dependientes e inhalatoria), pero el conocimiento actual de su genoma ha permitido el desarrollo de Ensayos Inmunoenzimáticos (EIA) y moleculares para su detección. Debido a que no se ha podido conseguir un sistema de cultivo celular eficiente para el VHC, a la fecha, se han desarrollado cuatro generaciones de EIA basados en la producción de antígenos recombinantes para la detección de anticuerpos contra el VHC (Anti-VHC) con un marcado aumento en la Sensibilidad y Especificidad³, esto mejoró sustancialmente la eliminación del periodo ventana. Por este motivo, en la actualidad los EIA son utilizados como ensayos de *screening o tamizaje*^{1,4} en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico viral. Sin embargo muestras dudosas o que presenten reactividad serológica para anticuerpos contra VHC deben ser sometidas a pruebas de confirmación de viremia utilizando ensayos suplementarios como el RT-PCR. A pesar de su relativo costo económico, esta técnica tiene la ventaja de tener una mayor especificidad, hecho que aumenta el beneficio costo-efectividad al lograr un diagnóstico confiable y oportuno⁵.

El presente estudio, tuvo como objetivo evaluar simultáneamente ensayos serológicos y moleculares con la finalidad de establecer el diagnóstico molecular de la Hepatitis C, a través del RT-PCR mediante monitorización

a través del EIA. Así mismo, se evaluó el grado de concordancia Intra e Interensayo. Finalmente se evaluaron tres métodos de extracción propuestos para la extracción del genoma ARN-VHC (ARN del Virus de la Hepatitis C). La aplicación de estos ensayos, permitiría establecer de una forma más precisa una relación que coadyuve al diagnóstico del VHC. Hasta el momento, en Bolivia son pocos los trabajos sobre Hepatitis C que evalúen simultáneamente técnicas serológicas y moleculares de detección del VHC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población. En el período comprendido entre febrero del 2006 a junio del 2007, se analizaron 56 muestras de suero sanguíneo provenientes de pacientes con diagnóstico reactivo para Anti-VHC que acudieron a centros hospitalarios públicos y privados de la ciudad de La Paz: Banco de Sangre de Referencia Departamental de La Paz (BSRDL), Laboratorios LA PAZ, e Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS).

Estudio Serológico. Todas las muestras fueron sometidas a análisis para la detección de Anti-VHC a través del EIA de tipo Captura de Tercera (3.0) y Cuarta Generación (4.0). El estuche de diagnóstico para el EIA 3.0 utilizado fue el kit comercial InmunoLISA™ VHC Ab Screening de *ORGENICS Labs*. (Yavne, Israel). En el caso del EIA 4.0 se usó un kit comercial ETI-AB-VHCK-4 de *DiaSorin Labs*. (Alcobendas, Madrid - España), los kits se usaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección de Genoma Viral. Se evaluaron y optimizaron 3 métodos de extracción para ARN-VHC. Por otro lado, todas las muestras fueron analizadas por RT-PCR para determinar la presencia del genoma viral.

A) Evaluación y Validación de los Protocolos de Extracción

Para este propósito se analizaron 15 muestras: 10 muestras reactivas para Anti-VHC y 5 muestras no reactivas procedentes de la seroteca del laboratorio, éstas fueron confirmadas por los laboratorios emisores de la muestra y validadas en el laboratorio de SELADIS, por EIA antes del presente estudio. A continuación, se evaluó y validó la calidad del *target* del extraído de RNA por RT-PCR, determinando la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Los protocolos de extracción utilizados fueron: **(1) TRIZOL LS (TLS):** 400 µL de TRIZOL LS fueron adicionados a 200 µL de suero e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente, se añadió 400 µL de agua libre de nucleasas y 400 µL de cloroformo mezclando por inversión durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos, la fase acuosa fue recolectada y los ácidos nucleicos precipitados con 600 µL de isopropanol dejando en reposo a -20 °C toda la noche. El pellet fue obtenido por centrifugación a 14000 rpm por 20 minutos

al cual se añadió 200 µL de etanol (100%) y disolvió por pipeteo. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet secado a 37°C. El pellet final obtenido fue resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas.

(2) Powder Glass (PG): 200 µL de Buffer Lisis [6 mol/L Isotiocianato de Guanidina, 10 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5), 200 g/L Triton X-100 (pH = 4.4)] y 10 mmol/L de urea, fueron añadidos a 200 µL de suero, a continuación se añadió 40 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) y 10 µg de polvo de vidrio. Se incubó por 10 minutos a 72 °C, se añadió 100 µL de isopropanol y centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. El sobrenadante fue descartado y al pellet se añadió 100 µL de solución de lavado [20 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH = 7.5), y 1000 mL/L de etanol absoluto]. Se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, el sobrenadante que contiene los ácidos nucleicos fue separado y centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto, se separó el sobrenadante el cual fue centrifugado a 13000 rpm por 10 segundos y el pellet final obtenido fue secado a 37 °C y disuelto en 50 µL de agua libre de nucleasas. **(3) Fenol/Cloroformo (F/C):** 200 µL de Guanidina [4M Isotiocianato de guanidina, Citrato de sodio 25 mM (pH = 7,0) y 0,1 M β-mercaptoetanol] fueron añadidos a 200 µL de suero. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto y desechó el sobrenadante. Al pellet se añadió

20 µL de acetato de sodio 2,0 M (pH = 4,0) y 200 µL de Fenol. Se añadió 60 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) e incubo en hielo por 10 minutos. La mezcla fue centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos, la fase acuosa fue recolectada a la que se añadió 200 µL de Fenol:Cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1). Tras centrifugación (12000 rpm por 5 minutos) la fase acuosa fue recolectada y los ácidos nucleicos precipitados con un volumen igual de isopropanol (100%), se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos, el pellet obtenido fue lavado con 200 µL de etanol (70%) por 30 minutos a -20 °C. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos, eliminó el sobrenadante y el pellet fue secado a 37 °C y disuelto en 50 µL de agua libre de nucleasas.

B) Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa

Se detectó una secuencia conservada de la región 5' UTR del genoma del VHC. Para este propósito se usó un kit comercial VHC 240/440 IC de *SACACE Biotechnologies* (San Carlo, Caserta, Italia) siguiendo las instrucciones y programa de amplificación del fabricante (Tabla 1). Tras las etapas de Reverso Transcripción de los extraídos ARN-VHC y Amplificación del ADNc obtenido, el producto de 240 pb esperado fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Tabla 1. Programa de Amplificación VHC 240/440 IC (*SACACE Biotechnologies*)

Termociclador: "PTC-100" (<i>MJ Research</i>) <i>BioRad</i> , <i>Biometra</i>			
Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	Pausa	
2	95°C	5 min	1
3	95°C	1 min	42
	67°C	1 min	
4	72°C	1 min	1
	72°C	1 min	
5	10°C	Conservación	

RESULTADOS

Estudio Serológico.

A. Comparaciones Intraensayo en Ensayos Inmunoenzimáticos 3.0 y 4.0

Un total de 53 muestras fueron analizadas utilizando el kit EIA 3.0, debido a que en tres muestras no fue posible determinar la reactividad por cantidad insuficiente de las mismas, el porcentaje de reactividad para Anti-VHC fue del 28,3% (15/53). En cambio con EIA 4.0, un total de 56 muestras fueron analizadas, obteniéndose una reactividad del 73,21% (41/56).

Así mismo, se incluyeron muestras sucesivas de dos pacientes (Paciente A: Muestras A1 y A2. Paciente B: B1 y B2) en etapa de infección. Respecto al Paciente A: la 1° muestra fue obtenida luego de la orden médica, y la 2°

muestra luego de luego de 3 días. En el caso del Paciente B: la 1° muestra igual que con el paciente A, y la 2° muestra luego de 45 días, según monitoreo médico. El análisis de las muestras por EIA 3.0, no mostraron seroconversiones tras estos periodos de tiempo ($ISR \leq 0,15$ para la 1° y 2° muestra en ambos pacientes). Cuando se empleó el EIA 4.0, en el análisis de la 1° muestra de los pacientes A y B se pudo detectar reactividad inicial ($ISR: 1,31$ y $1,6$ respectivamente). Así mismo, se verificó un incremento de la reactividad en la 2° muestra de ambos casos ($ISR: 1,47$ y $2,81$ respectivamente).

Estudios Moleculares

A. Validación de los Protocolos de Extracción para ARN-VHC

La tasa de amplificación positiva para ARN-VHC fue mayor para el protocolo de extracción (3) F/C (6/10)

muestras). Mientras que cuando se utilizaron los otros dos protocolos de extracción se evidenció amplificación para 4/10 de las muestras en el protocolo (2) PG, y solo 2/10 con el protocolo (1) TLS. Con esto se demostró que, la Sensibilidad (S) del protocolo (3) F/C para la detección del ARN-VHC fue del 60% (6/10) (verdaderos positivos). Mientras que la Especificidad (E) fue del 100% (5/5) (verdaderos negativos). De acuerdo a estos resultados, todas las muestras fueron extraídas mediante el protocolo (3) F/C (Fenol/Cloroformo) para la extracción de genoma viral.

B. RT-PCR para la detección del ARN-VHC

En los casos positivos se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa una banda de amplificación de 240 pb (Figura 1). El porcentaje de positividad Intraensayo encontrado para ARN-VHC por RT-PCR fue del 32,14% (18/56).

También se incluyeron las muestras pertenecientes a los pacientes ya descritos (Pacientes A y B): En el Paciente A se pudo detectar en la 1° muestra negatividad para ARN-VHC (RT-PCR negativo), sin embargo luego de un período de 3 días (2° muestra) se detectó presencia de producto de amplificación (RT-PCR positivo). En el Paciente B no se evidenció este hecho (RT-PCR negativo para la 1° y 2° muestra).

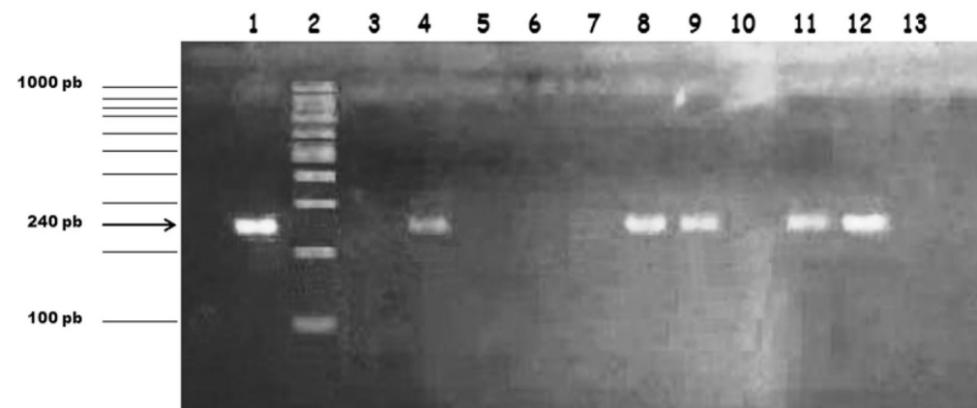


Figura 1. Electroforesis en Gel de agarosa de los productos de RT-PCR para el VHC. Carriles: 1, 12: Control Positivo VHC-ADNc. 2: Marcador de Longitud Molecular de 100 pb. 3, 5, 6, 7, 10: Muestras Negativas. 4, 8, 9, 11: Muestras Positivas. 13: Control Negativo

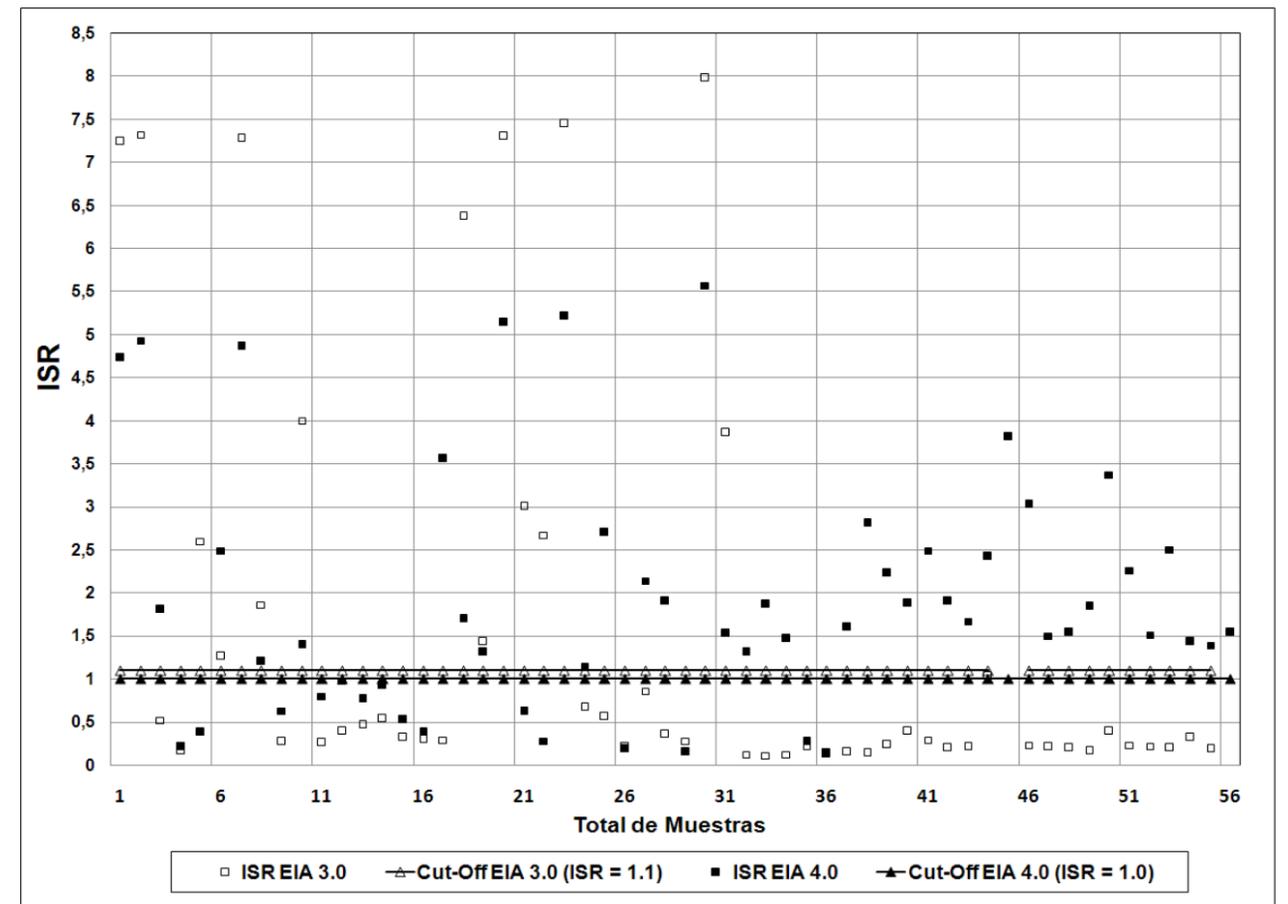
Comparación de los Resultados Inmunoenzimáticos y Moleculares.

A. Comparación Interensayo de EIA 3.0 y 4.0

El grado de concordancia interensayo para los ensayos EIA 3.0 y 4.0 fue del 45,28% de acuerdo a la proporción de acuerdos observados. No obstante, de acuerdo a la valoración propuesta por Landis y Koch⁶, la concordancia estadística es catalogada como Insignificante [K= 0,07; IC 95% (0.0031,0.1387)], es decir, no existe concordancia.

Distribución de valores ISR para Anti-VHC por EIA 3.0 y 4.0.

Considerando los valores Cut-Off (ISR ≥ 1,1 en EIA 3.0 y ≥ 1,0 en EIA 4.0), hubo una mayor distribución de reactividad para el EIA 4.0 el cual mostró 73,21% (41/56) de reactividad para Anti-VHC. Sin embargo, una menor distribución de reactividad fue encontrada en el EIA 3.0 con sólo 28,3% (15/53) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución de ISR para Anti-VHC en EIA 3.0 y 4.0 en el total de muestras analizadas. ISR: Índice de Reactividad Serológica (S/Co = D_{Om}/Cut-Off). D_{Om}: Densidad Óptica muestra. R: Reactividad (Un resultado es considerado reactivo si EIA 3.0 ISR > 1,1; y para EIA 4.0 ISR > 1.0)

B. Comparación Interensayo de resultados Moleculares e Inmunoenzimáticos

El resumen de la comparación Interensayo de resultados de muestras por RT-PCR con los resultados por EIA 3.0 y 4.0 se encuentra en la Gráfica 2. Tomando en cuenta los valores Cut-Off (1,1 y 1,0) para EIA 3.0 y 4.0 respectivamente, se pudo observar una mayor concordancia de resultados de “Reactividad Serológica versus Amplificación positiva por

RT-PCR” para el EIA 4.0 que muestra un 66,7% (12/18) de reactividad para Anti-VHC y positivos en RT-PCR (Verdaderos positivos). No obstante, para EIA 3.0 sólo el 37,5% (6/16) de muestras fueron reactivas en esta prueba y positivos por RT-PCR (Verdaderos positivos). El restante de muestras reactivas en EIA 3.0 y 4.0 [62,5 (10/16) y 33,3% (6/18)] se consideraron muestras discordantes en relación a los resultados negativos obtenidos por RT-PCR.

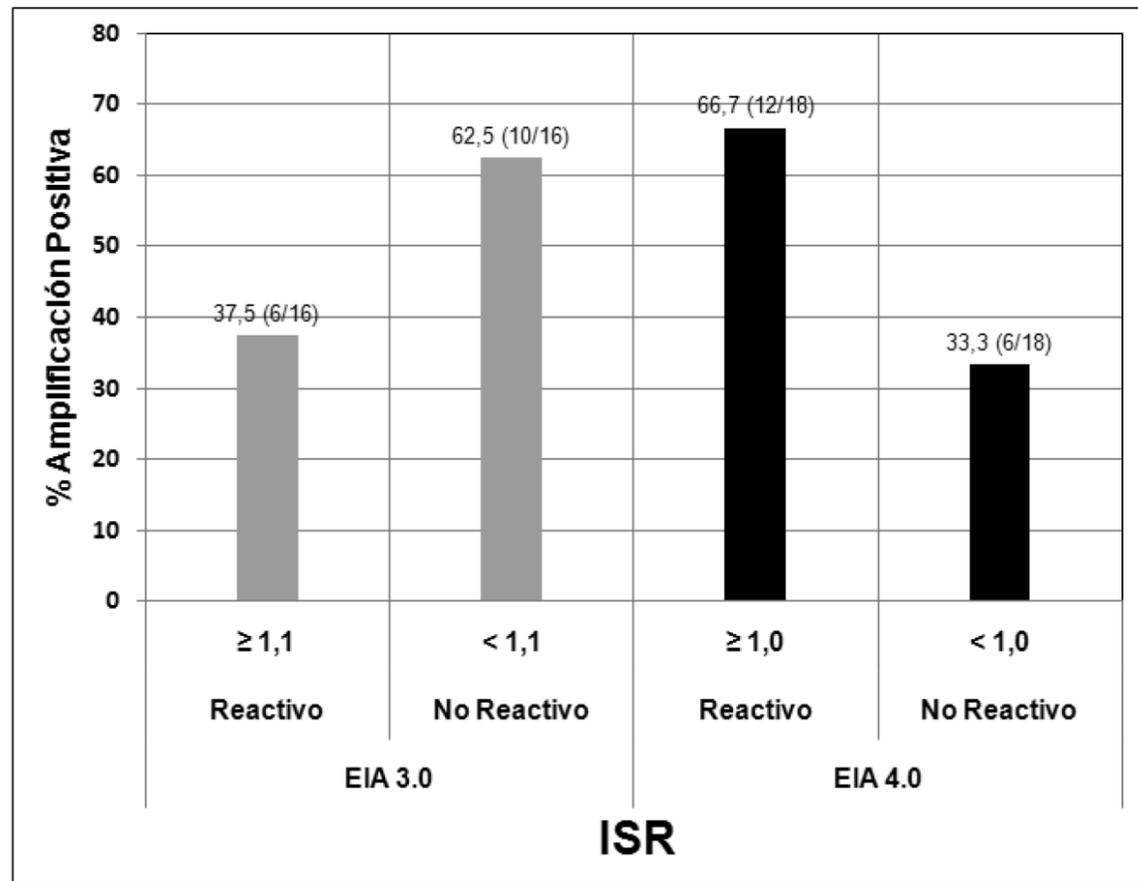


Gráfico 2. Reactividad Serológica por EIA 3.0 y 4.0 en muestras RT-PCR positivas. ISR: Índice de Reactividad Serológica (S/Co = DOM/Cut-Off). DOM: Densidad Óptica muestra. EIA 3.0: EIA de Tercera Generación. EIA 4.0: EIA de Cuarta Generación. Cut-Off EIA 3.0: ≥ 1.1 . Cut-Off EIA 4.0: ≥ 1.0

DISCUSIÓN

Las políticas actuales sugieren que debe realizarse en todos los donantes de sangre tamizaje de anticuerpos contra VHC, debido a que éste comparte eficientemente esta vía de transmisión. La prueba con mayor disponibilidad en el mercado y de acuerdo a la complejidad tecnológica son los EIA de Tercera (3.0) y Cuarta (4.0) Generación, los cuales demuestran una mejorada Sensibilidad y Especificidad. No obstante, la presencia de Anti-VHC no indica necesariamente infección activa del VHC ni tampoco brinda información acerca de la actividad replicativa viral, aspecto que tiene interés dada la tendencia del VHC a establecer infección crónica en un alto porcentaje de casos¹. Por ello, son necesarios ensayos confirmatorios adicionales como el RT-PCR, considerando además que, en la hepatitis C al igual que otras infecciones, el periodo ventana es el mayor problema a descartar antes de una donación de productos sanguíneos o derivados⁷. La evaluación entre los EIA 3.0 y 4.0 en las 56 muestras analizadas, muestra

un grado de discordancia, el cual podría deberse a una de las siguientes razones: 1º) Aumento de la Sensibilidad y Especificidad de EIA. El incremento en el número de los antígenos recombinantes introducidos en el EIA 4.0 supone una mejor interacción de los anticuerpos contra diferentes epítopes del VHC, la carencia de estos antígenos en EIA 3.0 conllevaría a una falta de sensibilidad para epítopes que podrían ser inmunogénicos. Además, el EIA 4.0 posee la ventaja adicional, de que los antígenos NS3 y NS4 fueron derivados de los genotipos 1a, 1b, 2 y 3, haciendo que el espectro de genotipos detectados sea más amplio⁸. 2º) Presencia de genotipos VHC circulantes diferentes al genotipo 1. Los EIA desarrollados hasta la Tercera Generación (EIA 1.0, 2.0 y 3.0) tienen como prototipo de desarrollo al Genotipo 1 del VHC debido a su amplia distribución en el mundo. De hecho, estudios previamente realizados demostraron que la mayoría de las muestras con resultados indeterminados mediante ensayos de segunda generación (EIA 2.0) correspondían a genotipos 2, 3, 4 y 5, por lo que el diagnóstico en pacientes con estos genotipos

puede ser menos eficiente, sobre todo en áreas en las que los genotipos más prevalentes estén filogenéticamente distanciados del prototipo 1a y se empleen EIA 2.0º. A esto se suman los resultados obtenidos por un grupo de investigadores en Argentina⁸, quienes encontraron una inesperada alta prevalencia del genotipo 2, seguido del 1b y 3 en una región en donde se creía que el principal genotipo era el 1. Esto indica que pueden existir diferencias regionales en la distribución de genotipos VHC, situación que debe ser considerada en nuestra región⁸. 3º) Títulos de anticuerpos por debajo del Límite de detección del EIA 3.0. De hecho, existe evidencia científica que señala que el VHC puede modular la respuesta inmunológica¹⁰, esto podría evitar la detección de anticuerpos Anti-VHC por ensayos de tercera generación debido a que posee una menor sensibilidad que el EIA 4.0.

En la población analizada, se contó con dos pacientes (Pacientes A y B) en quienes se determinó la reactividad por EIA en muestras sucesivas. En ninguno de los casos se detectaron seroconversiones cuando se utilizó el kit EIA 3.0. En cambio, con el kit EIA 4.0, establecida la reactividad inicial, existe una tendencia creciente para los valores ISR los cuales aumentan en función al tiempo. Los resultados por RT-PCR mostraron amplificación positiva sólo para el primer paciente (Paciente A), la razón de estos resultados puede deberse a: 1º) El ensayo 3.0 no es capaz de acortar el período de seroconversión antes del día 45. En este contexto, y de acuerdo a la literatura, los ensayos EIA 3.0 tienen la capacidad de disminuir el período ventana a partir del día 26, y los ensayos 4.0 a partir del día 22¹⁰.

2º) Títulos de Anti-VHC por debajo del límite de detección del ensayo 3.0; y 3º) Carga viral por debajo del límite de detección del RT-PCR. Esta razón supone la negatividad por RT-PCR para la primera muestra. No obstante, en la segunda muestra la positividad del RT-PCR supondría un incremento de la carga viral debida a la actividad replicativa en función al tiempo del VHC a niveles detectables por los ensayos moleculares.

Para el Paciente B, la ausencia para ARN-VHC (RT-PCR negativo) con reactividad para EIA 4.0 podría deberse a: 1º) Recuperación de la infección con presencia de memoria inmunológica. De acuerdo a algunos estudios, un 15% de los pacientes infectados por VHC, resolverían la infección de manera espontánea⁴. 2º) Modulación de la Respuesta Inmunológica y de los Niveles de ARN-VHC. De hecho, anticuerpos específicos Anti-VHC contra antígenos de la envoltura glicoproteica del VHC pueden neutralizar la infectividad in vivo llegando a modular los niveles de ARN-VHC⁴. También debe considerarse que el VHC puede dar lugar a una infección intermitente e inclusive el ARN-VHC puede ser detectable tras un largo período de ausencia. Por esto, es recomendable realizar un seguimiento de todos los pacientes infectados aún en ausencia de sintomatología clínica. En resumen, se ha

observado que el tiempo transcurrido entre la exposición al virus, la etapa de la infección crónica o aguda y el estado inmunológico del paciente, influirá en la detección de los niveles de Anti-VHC.

La comparación Interensayo de muestras con amplificación positiva por RT-PCR en comparación a los resultados por EIA 3.0 y 4.0 es tomado independientemente de sus resultados reactivos o no para Anti-VHC. La finalidad de esta comparación se realizó para determinar si muestras reactivas por EIA 3.0 o 4.0 son concordantes a los resultados obtenidos por RT-PCR, esto obviamente evitaría la expansión de la infección, puesto que los EIA se han constituido como ensayos de *screening* en el diagnóstico de rutina. La concordancia de resultados de "Reactividad Serológica versus Amplificación positiva por RT-PCR" se da a favor del ensayo EIA 4.0. En otras palabras, estos resultados obtenidos a partir de muestras RT-PCR positivas por ensayos Inmunoenzimáticos, establecerían muestras confirmadas con infección por VHC (Verdaderos positivos). El restante de muestras cuyos valores ISR están por debajo del Cut-Off para EIA 3.0 y 4.0, y son RT-PCR positivos serían consideradas muestras discordantes (muestras No reactivas para anticuerpos Anti-VHC). Diferimos con los reportes citados en otras regiones, en donde se señala que estas situaciones serían poco frecuentes. Concordamos con las aseveraciones de otros autores en que este grupo de personas serían aceptados como donantes a pesar de estar infectados⁵.

Dos tipos de resultados discordantes son encontrados cuando se comparan EIA y el RT-PCR: 1) Pacientes EIA reactivos/RT-PCR negativos. Estos resultados podrían deberse a diferentes factores: 1º) Activación de la memoria inmunológica que conserva largo tiempo el título de anticuerpos, mientras que la viremia puede desaparecer. De hecho en estudios previos se ha demostrado que los títulos de anticuerpos caen si los niveles de ARN-VHC son eliminados y donde pueden desaparecer muchos años después de la infección. En dos estudios de largo término, 24-46% de individuos infectados con VHC fueron inicialmente negativos por RT-PCR. Así mismo 15-30% de estos pierden la reactividad para Anti-VHC cuando fueron testados 20-30 años después de la exposición inicial³. 2º) Viremia intermitente, en el curso de una infección crónica. 3º) Carga viral por debajo del límite de detección del RT-PCR. Esta situación podría a su vez estar influenciada por factores como: la presencia de infección reciente, respuesta inmunológica, respuesta al tratamiento, entre otros. 2) Pacientes EIA No reactivos/RT-PCR positivos. Nuestros resultados comparados a estudios previos realizados por un grupo de investigadores el 2002¹¹, difieren en cuanto existe un elevado número de muestras con resultados EIA No reactivos con un RT-PCR positivo. Por otro lado, algunos investigadores han evidenciado que los anticuerpos Anti-VHC no sólo podrían no aparecer tempranamente

después del ingreso del virus al huésped, sino también no se presentaría una seroconversión en todo el transcurso de la infección¹². En adición, es bien sabido que los EIA tienen una mayor sensibilidad diagnóstica comparada a los ensayos moleculares quienes poseen en contraste una mayor especificidad, este hecho podría responder a la presencia de resultados falso positivos en serología y la necesidad de confirmación por RT-PCR. Por otro lado, en contraste a los EIA utilizados, los cebadores utilizados para el diagnóstico pueden amplificar secuencias de todos los genotipos del VHC.

De acuerdo a los resultados, se evidencia la necesidad de implementar el diagnóstico molecular del VHC como prueba confirmatoria en muestras cuyo resultado serológico por ensayos Inmunoenzimáticos por EIA 4.0 sea reactivo, y adicionalmente en pacientes cuyo cuadro e historial clínico apoye el diagnóstico de infección por VHC. Los resultados obtenidos demuestran claramente la necesidad de contar con una batería de herramientas diagnóstica completa. El Virus de la Hepatitis C así como otras infecciones de origen viral presentan una capacidad inmunomoduladora que altera claramente la detección de anticuerpos. Por tanto es importante contar con una visión integrada de cada caso, tanto la clínica, la respuesta antiviral del paciente y la replicación viral son parámetros que permitirán realizar un diagnóstico, un tratamiento y un seguimiento de la infección de forma más adecuada.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Katuska Gonzáles; a la Dra. Vanesa Tellería del Banco de Sangre de Referencia Departamental La Paz; y a la Dra. Katty Terrazas del Laboratorio de Virología del Instituto de Servicios de Diagnóstico e Investigación en Salud, por la colaboración en la realización del presente estudio.

REFERENCIAS

1. Thomas D, Stanley M. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5^a ed. New York: Churchill Livingstone. 2000.
2. Terrés-Speziale AM. Hepatitis C. Historia natural y estado actual de su manejo. *Rev Mex Patol Clin.* 2003; 50 (4): 179-189.
3. Dufour D, Talastas M, Fernandez M, Harris B, Doris B, Strader, Seeff L. Low-Positive Anti-Hepatitis C Virus Enzyme Immunoassay Results: An Important Predictor of Low Likelihood of Hepatitis C Infection. *Clinical Chemistry.* 2003; 49(3) 479–486.
4. Jiménez Hernandez N. Evolución del Virus de la Hepatitis C en Muestras Hospitalarias de la Comunidad Valenciana [tesis Doctoral]. Valencia: Servei de Publicacions, Universidad de Valencia; 2005.
5. Mansilla P. Banco Regional de Transfusiones, Boletín Informativo, Santa Cruz – Bolivia; 2002
6. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159-174.
7. Re V, Lampe E, Fumiko C, Mendes de Oliveira J, Lewis-Ximenez L, Spinsanti L, *et al.* M. Hepatitis C Virus Genotypes in Cordoba, Argentina. Unexpected High Prevalence of Genotype 2. *Medicina.* 2003; 63: 205-210.
8. Maertens G, Vorsters A, Royens B, Dekeyser F and Zrein M. A fourth generation assay for the screening of VHC Antibodies. The European Association for the Study of the Liver: 34th Annual Meeting, Naples (Italy); April 8-12 1999. Hepatitis Program, Innogenetics NV, Gent, Belgium; 1999.
9. Maroto M, García F. Variabilidad Genética del Virus de la Hepatitis C. Departamento y Servicio de Microbiología. Granada: Facultad de Medicina y Hospital Universitario San Cecilio; 2005.
10. Forns X, Payette PJ, Ma X, Satterfield W, Eder G, Mushahwar IK *et al.* Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the Hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology.* 2000; 32(3): 618–625.
11. Colina R, Mogdasy MC, Cristina J, Uriarte MR. Caracterización molecular del virus de la hepatitis C en Montevideo-Uruguay. *Rev Med Uruguay.* 2002; 18: 76-82.
12. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infection. *Nature Reviews Immunology.* 2005; 5: 215-229.