

METODOS DIAGNOSTICOS EN HEPATITIS C

*Isabel Massin Bocca * y Félix Toro***

* Laboratorios Géminis, C.A. ** Instituto de Inmunología, U.C.V.

(Charla presentada durante el VI Congreso Venezolano de Bioanálisis)

(aceptado para su publicación: 6 agosto 1993)

INTRODUCCION

Luego del desarrollo de metodologías diagnósticas para detectar los dos tipos de Hepatitis más frecuentes, la hepatitis A y la hepatitis B, se observó que persistía un grupo de pacientes que presentando una hepatitis viral, no respondían a ninguna de estas pruebas serológicas. Básicamente, estas hepatitis No A No B (Hep. NANB), pueden dividirse en tres grupos. Uno, de transmisión oral-fecal, identificado como hepatitis E. El segundo típicamente transfusional, se ha denominado hepatitis C. En cuanto al tercero, aún no se ha identificado el agente y su etiología sigue siendo desconocida. El virus de la hepatitis C, es responsable de la mayoría de las hepatitis transfusionales. Esto se descubrió cuando al eliminar la sangre contaminada con hepatitis B, el 5 al 10% de los receptores de trasfusiones continuaban contrayendo hepatitis. Las personas contaminadas, desarrollan en un 50 a 70% cronicidad, con el concomitante riesgo de pasar a un carcinoma hepático (DeLeys, 1993).

El virus de la hepatitis C, HCV, tiene como material genético una molécula de ARN con una longitud aproximada de 9400 nucleótidos, que codifican unos 3000 aminoácidos. Estos aminoácidos proteínicas estructurales o proteínicas funcionales como proteasas, etc., llamadas proteínicas no estructurales. Un esquema del virus se presenta en la Fig. 1 (DeLeys, 1993). Es un virus de envoltura lipídica, con un diámetro de

aproximadamente 30 a 60 nm., y que en base a sus semejanzas estructurales con los géneros flavivirus y pestivirus se considera un miembro de la familia flaviviridae (Houghton et al, 1991).

Dada la importancia de este virus, se hacía perentorio el desarrollar un método para identificarlo. La identificación por "inmunoscreening" usando un clon de DNA complementario (clon 5-1-1) que codifica un polipéptido antigénico, la subsecuente utilización de este clon para obtener otras fracciones de DNA complementario solapadas y descifrar así el genoma, y por último la demostración de que el virus realmente existía y la designación oficial como HCV fueron aportes muy importantes de la corporación Chiron, quienes hicieron posible el desarrollo del primer kit diagnóstico (DeLyes, 1993).

METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS PARA HCV:

Hasta el presente se utilizan tres metodologías básicas para diagnosticar la presencia del HCV:

1. Métodos Elisa:

Son hasta el presente los métodos utilizados para el despistaje primario de la infección, corrientemente empleados en Bancos de Sangre y laboratorios. Existen dos corrientes importantes: las versiones basadas en la patente de Chiron y las versiones basadas en los desarrollos de Innogenetics.

2. Métodos Inunoblot:

Para verificar los resultados obtenidos por ELISA, los fabricantes antes mencionados desarrollaron métodos inmunoblot (con antígenos ligados en bandas a una superficie sólida, celulosa o nylon) más sensibles y específicos.

3. Técnicas de PCR:

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, la cual detecta la presencia de material genético específico, se ha estado utilizando para identificar viremia y en muchos casos como método alternativo en casos dudosos o contradictorios obtenido por los anteriores.

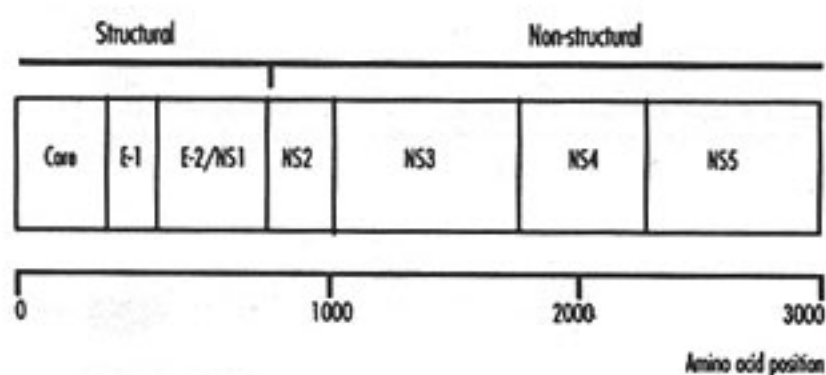


Fig.1 Esquema del genoma del HCV y de las posiciones de los aminoácidos que codifica (De Leys, 1993)

MÉTODOS DE ELISA:

Como ya mencionamos existen dos corrientes básicas en el desarrollo de pruebas de ELISA para el diagnóstico de la hepatitis C:

1. Chiron Corporation: Esta compañía desarrolló el primer kit diagnóstico para HCV en 1989 (Kuo, Choo, Alter et al, 1989) utilizando el antígeno c100-3, una proteína no estructural. Este antígeno ha sido utilizado por las marcas Ortho Diagnostics y Abbott Laboratories, de manera que ambos detectan los mismos anticuerpos. Para el desarrollo del producto se utilizó la tecnología de antígeno recombinante.

Esta primera versión resultó pobre en sensibilidad y especificidad, dando sobretodo un elevado número de falsos positivos, por lo cual se desarrolló una segunda versión en la que se incluyen además del c100-3, otra proteína no estructural la c200 y una proteína estructural la c-22-3, a fin de mejorar la calidad del kit (Nakatsuji et al, 1992). Esta nueva versión también utiliza antígenos recombinantes.

Los resultados sin embargo aún no son del todo satisfactorios, pues el número de positivos falsos es aún elevado, por lo que Chiron está por desarrollar una tercera versión de su ELISA.

2. Innogenetics N.V.: Esta compañía belga desarrolló en 1991 su primer kit diagnóstico para HCV, utilizando una tecnología diferente a Chiron. En primer lugar, incluyeron desde su primera versión proteínas estructurales del core, junto con dos proteínas no estructurales diferentes al c100-3, correspondientes a las regiones NS4 y NS5. En segundo lugar, esta compañía utiliza péptidos sintéticos en vez de antígenos recombinantes.

La primera versión del kit contenía 1 péptido para las proteínas del core, 1 péptido para NS4 y 2 péptidos para NS5. La segunda versión mejoró sensiblemente su sensibilidad y sobre todo su especificidad aumentando 3 péptidos para NS4 y 3 péptidos para NS5.

MÉTODOS INMUNOBLOT:

1. Chiron Corporation: al igual que en sus versiones de ELISA, los inmunoblots de Chiron utilizan antígenos recombinantes dispuestos sobre una tira de

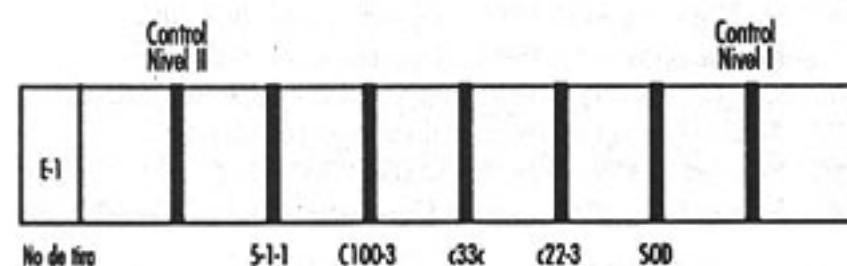


Fig. 2 Tira de Chiron Riba HCV Test System

nitrocelulosa. Una primera versión del producto comercial, RIBA de Ortho Diagnostics, incluía una banda para c-100-3 y una banda para 5-1-1. En la segunda versión incluyeron las proteínas de las que ya hemos hablado en el ELISA. El esquema de la tira que está disponible actualmente se representa en la Fig. 2., tal y como aparece en el inserto del producto. como puede verse existen dos bandas de control para el suero y una para la superoxidodismutasa. La interpretación de los resultados se hace por comparación con estas bandas.

2. Innogenetics N.V.: También en los inmunoblots, Innogenetics utiliza péptidos sintéticos, ligados en cambio a una malla de nylon para hacer las bandas más claras. Desde su primera versión, fueron incluidas 4 bandas para proteínas no estructurales del core (c1, c2, c3, c4) y dos para proteínas no estructurales NS4 y NS5. Se incluían cuatro bandas de control a objeto de hacer más precisa la identificación. Las proteínas no son corridas electroforéticamente y luego trasladadas al soporte, sino que los péptidos están ligados directamente al nylon para lograr bandas más nítidas (Pollet et al, 1991).

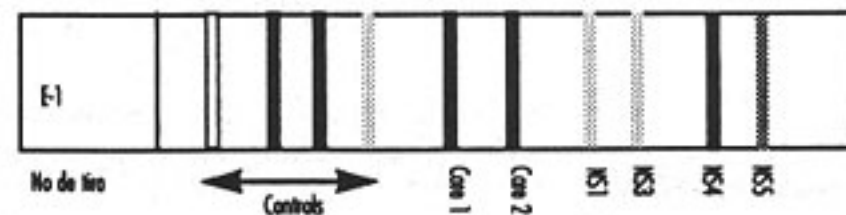


Fig. 3 Tira de Innolia HCV, tercera versión. El control blanco es un control de Estreptavidina, los tres siguientes de suero. Las bandas de core mantienen dos péptidos cada una (c1, c2 y c3, c4 respectivamente)

Una nueva versión acaba de ser lanzada este año incluyendo péptidos nuevos. Un esquema de la banda se muestra en la Fig. 3, tomada del inserto del producto. Los 4 péptidos del core se preservan, ubicándose c1 y c2 en una banda y c3 y c4 en otra. Los péptidos nuevos incluidos son el E2/NS1 (estructural) y el NS3 (no estructural), con el objeto de incrementar la sensibilidad y hacer detección temprana en la seroconversión respectivamente, según lo indica el fabricante.

Dado que las características que utilizan estas casas son diferentes, con frecuencia se presentan discrepancias en los resultados entre las distintas corrientes tanto de ELISA como de inmunoblot. Esto puede ser debido a que los antígenos que se utilizan difieren tanto en número como en la naturaleza misma del antígeno. Para ejemplarizar esta situación, en la Fig. 4 podemos ver los diferentes antígenos que se

utilizan en los inmunoblot citados, en correspondencia con la región peptídica del virus que evalúan.

Por otra parte, los antígenos no son del mismo origen. Los recombinantes son extraídos de células a las que se les ha insertado una región de material genético que codifica para una determinada proteína del virus. En el caso de RIBA, por ejemplo, los 5-1-1- y c33c son producidos en *E. coli* y el c100-3, c22-3 y SOD son producidos en levaduras. Se ha publicado que pueden darse reacciones inespecíficas del suero de los pacientes que puedan contener anticuerpos contra las proteínas de estas células resultando falsos positivos. Los péptidos sintéticos son sintetizados químicamente y en

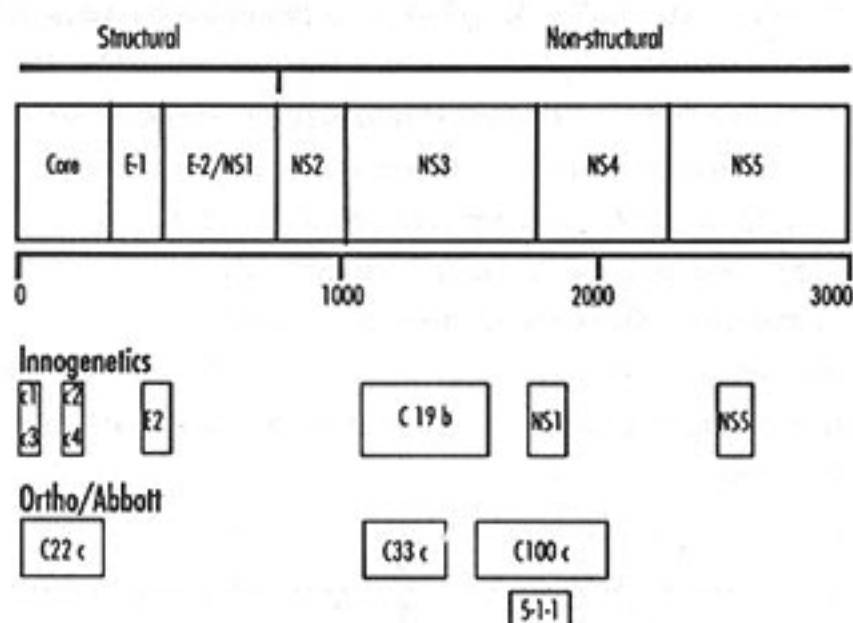


Fig. 4 Ubicación de los antígenos detectados por Innogenetics y Chiron (Ortho, Abbot) en relación al genoma del HCV

consecuencia son mucho más puros, teniendo menos probabilidad de producirse una reacción inespecífica (Valerie, 1991).

Hay que tener en cuenta también que el hallazgo del HCV es relativamente reciente. Si tomamos en cuenta que el primer kit fue desarrollado en 1989, podríamos hacer un paralelismo y pensar que estamos en una situación equivalente al empleo de los kits de HIV en 1986. Aunque el desarrollo en la tecnología molecular es acelerado, todavía tendremos que esperar un tiempo hasta alcanzar para los métodos diagnóstico en HCV, la sensibilidad y especificidad a la que estamos acostumbrados en otros parámetros como HIV o Hepatitis B. A esto se suma que estamos ante un virus difícil, de alta tasa de mutación y del que ya se han descubierto varios subclases (Chan, Simmonds et al, 1991).

Una de las características de la infección por HCV es la baja viremia reportada en individuos crónicamente infectados por el virus (Chuthbert, 1990). La incorporación de técnicas de detección de ácidos

nucleicos, tan sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido evaluar con más detalle el proceso de infección del HCV, lográndose la identificación de secuencias virales específicas en etapas tempranas de la misma.

Es así como dicha estrategia metodológica es considerada hoy en día (por algunos) el único método práctico con el que se demuestra viremia en individuos infectados con HCV (Garson et al, 1990, Inchauspe et al, 1991, Bukh et al, 1992). La técnica de PCR permite identificar cantidades verdaderamente ínfimas del virus mediante un proceso de amplificación enzimática del ARN viral.

La amplificación es llevada a cabo a través de una serie de reacciones que involucran una primera etapa de síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa y la posterior amplificación de regiones específicas presentes en la secuencia de ADNc. El estudio de la biología molecular del HCV ha permitido identificar secuencias altamente conservadas de la región 5 no codificante del genoma viral que resulta sumamente útiles para el diagnóstico de la infección mediante técnicas de biología molecular (Inchauspe, 1991; Bukh, 1992).

La introducción de variantes metodológicas como la PCR en dos etapas o "ested PCR" ha permitido evaluar aún más el nivel de detección del ARN viral presente en sangre, permitiéndose con esta estrategia la visualización, mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción de bromuro de etilo, de las secuencias virales amplificadas (Inchauspe et al, 1991). Actualmente, la prueba de PCR para el HCV es empleada únicamente como una herramienta importante de estudio de esta infección viral. Su uso como técnica de diagnóstico rutinario resulta bastante compleja debido a lo laborioso y extenso del ensayo, así como al cuidado y rigurosidad que se exige en la manipulación de las muestras que van a ser analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beenhovwer et al. 1992. *Voc Sang* 63: 198-203
2. Bukh J. et al 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 187-191.
3. Chan S.; Simmonds P. et al 1991. *Lancet* 38:1391.
4. Cuthbert J.A. 1990. *Am J Med Sci.* 299:346-355.
5. DeLeys r. 1993. *Current Drugs LTD.* Mayo.
6. Houghton M. et al 1991. *Hepatology* 14: 381-388.
7. Inchauspe G. et al 1991. *Hepatology* 14: 595-600
8. Kuo G.; Choo Q.L. et al 1989. *Science* 244: 362-305.
9. Nakatsuji Y. et al 1992. *Hepatology* 16: 300-305.
10. Pollet et al 1991. *Clin Chem* 37: 1700-1707.
11. Valery N.L. 1991. *Clinical Chemistry* 37: 1667-1668.

NUEVAS TECNICAS DE ELISA APLICADAS AL DIAGNOSTICO DEL TORCH

Isabel Massin Bocca

Laboratorios Géminis C.A.

Resumen del taller presentado durante el VI Congreso de Bioanálisis en Margarita

(aceptado para su publicación: 6 agosto 1993)

Como todos sabemos, los agentes infecciosos, en su mayoría virales, agrupados bajo las siglas anglosajonas de Torch (Toxoplasmosis, Others, Rubeola, Citomegalovirus, Herpes) son responsables de cuadros patológicos que pueden estar desde la inocuidad del portador silencioso hasta cuadros muy graves si se presentan durante la gestación o cuando el organismo tiene comprometido su sistema inmunológico (1). El diagnóstico de estas afecciones resulta cada día más importante y por ello las técnicas para detectarlos deben afinarse en el tiempo.

Usualmente estos agentes no se detectan de manera directa buscando las partículas infecciosas, antes bien se detectan los anticuerpos que el mismo organismo produce ante la presencia del agente.

Como se sabe, la sola presencia de anticuerpos en la muestra de un paciente no es indicativo de enfermedad, ya que muchos pueden haber tenido contacto con la partícula infecciosa sin que por ello se desarrolle ninguna patología. Lo que es indicativo de enfermedad es por un lado la presencia de IgM, que indica una infección reciente o por otro lado una gran cantidad de anticuerpos IgG, que significa que la infección es aguda, o una reactivación, y que por lo tanto los anticuerpos IgM ya han desaparecido. La capacidad de poder distinguir entre estas situaciones es lo que da a las diferentes metodologías una mayor capacidad diagnóstica.

Las técnicas tradicionales han tratado de resolver este problema haciendo diluciones de las muestras positivas hasta encontrar aquella donde desaparece la positividad, o lo que es lo mismo, hallar el título de la muestra. Sin embargo, las técnicas de titulación tienen algunas desventajas, se ha demostrado que pueden verse afectadas significativamente por errores de pipeteo y por muestras no homogéneas, inconvenientemente mezcladas (2). Es por ello que deben aceptarse para este tipo de técnicas un error entre 1 a 2 diluciones (3). Estas circunstancias hacen

de los métodos que utilizan las titulaciones métodos semicuantitativos, puesto que el resultado es una aproximación a la cantidad de anticuerpos presentes.

Las titulaciones se utilizan corrientemente en las técnicas que detectan anticuerpos totales, como la hemaglutinación y la fijación de complemento, que si bien son útiles, sencillas y económicas, no tienen la capacidad de diferenciar tipo de anticuerpo ni tienen la sensibilidad de otras técnicas como la inmunofluorescencia y el ELISA. Estas diferencian tipos de anticuerpos, tienen una mayor sensibilidad, pero resultan más costosas y el pretender hacer títulos o curvas de referencia por la más sensible de todas ellas, el ELISA, era hasta 1992 un procedimiento poco factible en la rutina.

En 1992 se desarrolló en Alemania, un procedimiento que permite detectar el título de una muestra en una sola dilución, utilizando la metodología ELISA. La misma pertenece a la firma Behring Diagnostika, representada en Venezuela por Laboratorios Géminis y se denomina método alfa, por ahora se aplica a la cuantificación de los títulos o concentraciones de los anticuerpos IgG.

El método se basa en la estandarización por parte del fabricante de cada lote de reactivo mediante la utilización de dos constantes ∂ y β . A partir de la revisión de los resultados de cada lote frente a curvas de calibración realizadas con cambios de variables controlados, los valores de ∂ y β son calculados por un procedimiento matemático, un método iterativo basado en la estrategia de mutación-selección (Meyer y Doptaka, en preparación, citado en 4).

El título se obtiene a partir de la fórmula:

$$\log_{10} \text{ título} = \partial \cdot OD^{\beta} \quad (*)$$

Donde ∂ y β son las constantes dadas por el fabricante para cada lote, y que se incluyen dentro de cada kit, y OD es la densidad óptica de cada muestra,

de manera que a a partir de la lectura de un solo pozo, se obtiene el título del paciente, sin necesidad de diluir.

Ese mismo año, Dopatka y Giesendorf, compararon los resultados de muestras obtenidos a partir del método alfa con aquellos logrados por ELISA utilizando diluciones y curvas de referencia. Los resultados no solo fueron equivalentes, sino que además los del método alfa mostraron un coeficiente de variación menor. Los autores concluyen que los resultados por este método son equivalentes a la titulación con ELISA en exactitud y superiores en precisión, economizando tiempo y dinero (4).

Otras ventajas del método alfa sobre las titulaciones, es que el comportamiento de los resultados es continuo y no discreto, como puede observarse en la Fig. 1 (tomada del folleto promocional "Single Point Quantification de Behringwerke, Marburg, Alemania), lo que ubica el resultado del paciente en un valor puntual y no en un intervalo de valores. Esto permite detectar diferencias pequeñas en los valores del paciente, que no son apreciables por titulación, como se ilustra en la Fig. 2 (tomada del folleto promocional "Single Point Quantification de Behringwerke, Marburg, Alemania).

El método tienen un control interno por paciente para descartar la presencia de la mayoría de los falsos positivos. Como se sabe, los virus no tienen la capacidad de reproducirse por si solos, y para su cultivo deben utilizarse células a partir de las cuales se multiplica. Si eventualmente el paciente ha desarrollado inmunidad contra la célula utilizada en el cultivo tendremos un positivo que no se debe al virus, la cual es la principal causa de los resultados falsos

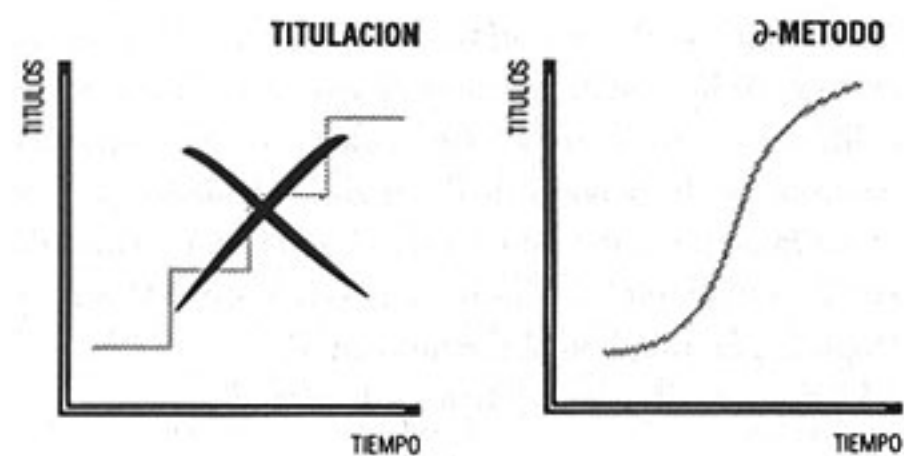
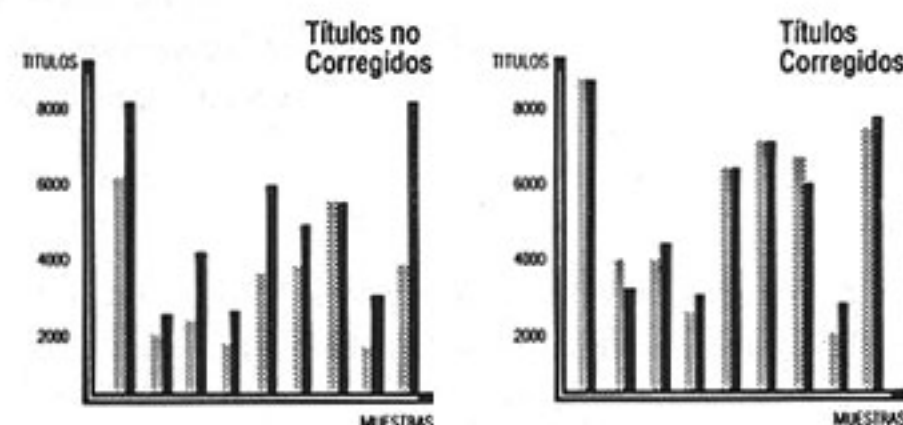


FIGURA 1 NUEVAS TECNICAS DE ELISA APLICADAS AL DIAGNOSTICO DEL TORCH

positivos en los ELISA aplicados a la detección viral. Esta metodología utiliza un pozo recubierto con las proteínas virales para atrapar los anticuerpos contra el

virus y un pozo de control recubierto con las proteínas celulares. La absorbancia de la muestra es la diferencia entre estas lecturas.

FIGURA 2



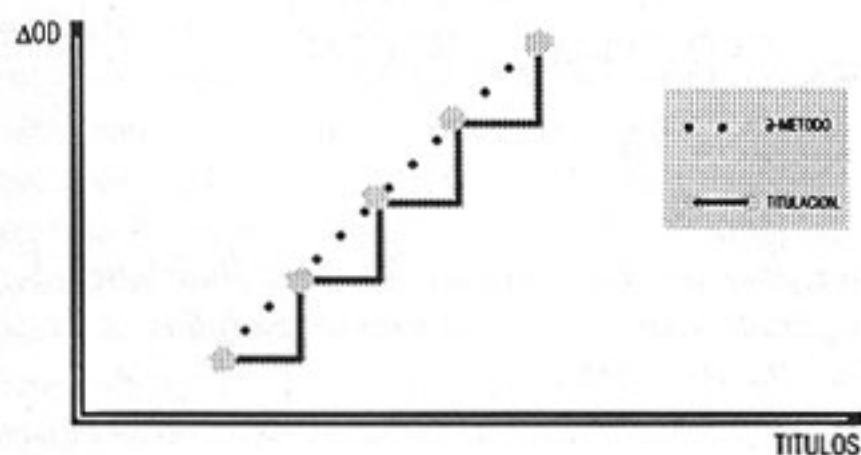
Otra estrategia de control la constituye la presencia del control positivo en el kit, lo cual tiene múltiples propósitos. En primer lugar es el control positivo del ensayo en sí en el sentido usual de todo ELISA. En segundo lugar, lleva el control de calidad, puesto que sus absorbancias deben colocarse entre un intervalo dado por el fabricante (como si se tratara de un control comercial). Por último, la absorbancia del control obtenida en el ensayo se compara con la absorbancia nominal obtenida por el fabricante, para lograr un factor de corrección para las muestras (*).

Este factor de corrección es muy importante, porque permite disminuir las diferencias que por efecto de factores externos como las temperaturas, operarios, instrumentos, entre otros, puedan presentarse en las densidades ópticas, tanto intra laboratorios como inter laboratorios, haciendo que los resultados de diferentes instituciones puedan ser comparables, como se ilustra en la Fig. 3 (tomada del folleto promocional "Single Point Quantification de Behringwerke, Marburg, Alemania).

Las técnicas son homogéneas entre las distintas pruebas, tanto en el número como en la duración de las incubaciones, de manera que pueden realizarse simultáneamente, por ejemplo: Toxo IgG e IgM, CMV IgG e IgM y Rubéola IgG e IgM, juntas como si fuera una sola prueba. Para ello los reactivos son universales: un solo buffer de lavado, un solo sustrato, un mismo conjugado para las IgG y otro para las IgM, un mismo buffer de dilución para las IgG y otro para las IgM, haciendo la diferencia los antígenos ligados a la placa.

El poder llegar a determinar el título o las concentraciones en UI/ml de una muestra desconocida empleando tan solo un micropozo de ELISA y un

FIGURA 3



control, es toda una innovación en el diagnóstico del TORCH. El poder detectar certeramente la cantidad de IgG, junto con la presencia o ausencia de IgM, utilizando la metodología más sensible de la que disponemos para el TORCH, da una mayor visión diagnóstica en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Krugman S.; Katzman S.; Gershon A.; Wilfert C. 1985. *Enfermedades Infecciosas*. 8ª Edición. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.
2. Husson-van Vliet I.; Roussel P. 1988. "Pipeting Errors in viral titration: A useful approach". *J Virol. Methods* 22: 183-190.
3. De Savigny D.; Voller A. 1980. "The communication of ELISA data from laboratory to clinician". *J. Immunoassay* 1:105-128.
4. Dopatka H.D.; Giesendorf B. 1992. "Single Point Quantification of Antibody by ELISA without Need of a Reference Curve". *J Clin Lab Analysis* 6: 147-492.

(*) El fabricante puede proveer de una calculadora especial para facilitar el cálculo.