

## Fiabilidad de la técnica de ELISA2 frente a la PCR en el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C en pacientes en hemodiálisis

E Muñoz de Bustillo, F.J. Torralba, R. Llobregat, C. Iborra, C. Muñoz\*, M.L. de la Sen\*, A. Llopis.  
Servicio de Nefrología, Clínica Vistahermosa. Servicio de Inmunología, Hospital General\*. Alicante (España)

### Resumen

La prevalencia de infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en hemodiálisis (HD) es alta, alcanzando un 20% en nuestro medio con técnica de ELISA2. Con objeto de conocer la prevalencia real de viremia, así como la sensibilidad (S) y especificidad (E) de las técnicas de screening habitual, se han estudiado mediante PCR 116 pacientes de una misma unidad de HD, 19 de los cuales se dializaban en unidad especial por presentar anticuerpos frente al VHC por ELISA2 (16,3%). RESULTADOS: Todos los pacientes negativos por ELISA2 (97) resultaron PCR (-). Seis pacientes antiVHC positivos presentaron PCR negativa (31,6%). La S y E del test ELISA2, considerando la PCR como gold standard fue del 100% y 94,1%, respectivamente (VPP 68,4%; VPN 100%). Ocho pacientes resultaron genotipo 1b, 3 pacientes 1a, 1 paciente 2b y otro 2a/2c. El grupo de pacientes ELISA2 anti VHC(+)/PCR(+) presenta un mayor porcentaje de mujeres (53,8% vs. 16,6%;  $P < 0,1$ ), y GOT y GPT más elevadas (diferencias no significativas) siendo la GGT más elevada en el grupo PCR(-). El resto de variables estudiadas no mostró diferencias significativas. Concluimos que la técnica ELISA2 sigue siendo un test extremadamente útil para el diagnóstico de la infección VHC en pacientes en diálisis. Existe un estimable porcentaje de pacientes que a pesar de presentar anticuerpos frente al VHC, no presentan viremia activa por PCR, pero las transaminasas no sirven para su detección en nuestra experiencia.

### Abstract

The prevalence of infection due to the hepatitis C virus (HCV) in haemodialysis (HD) is high, reaching 20% in our field with the ELISA2 technique. In order to discover the real prevalence of viraemia as well as the sensitivity (S) and specificity (Sp) of normal screening techniques, 116 patients in the same HD unit were studied by means of PCR. 19 (16,3%) of these patients were in dialysis in a special unit as the ELISA2 technique revealed that they had HCV antibodies. RESULTS: All of the patients that were found to be negative according to the ELISA2 technique (97) were PCR (-). Six patients who were HCV antibody positive obtained a negative result using PCR (31,6%). The S and Sp of the ELISA2 test, considering PCR as the "gold

standard" was 100% and 94.1% respectively (VPP 68.4%; VPN 100%). Eight patients were found to have the 1b genotype, 3 patients 1a, 1 patient 2b and another 2a/2c. The group of HCV antibody (+)/PCR(+) ELISA2 patients comprised a greater percentage of women (53.8%) versus 16.6%;  $P < 0.1$ ) and GOT and GPT levels were higher (non-significant differences) and GGT was also higher in the PCR (-) group. The rest of the variables studied did not reveal any significant differences. It can thus be concluded that the ELISA2 technique is still an extremely useful test to diagnose HCV infection in patients undergoing dialysis. There is a considerable percentage of patients who, in spite of having HCV antibodies, are not shown to have active viraemia when tested by PCR but, from our experience, transaminases cannot be used for detection.

### Introducción

La infección por el virus de la hepatitis C (VCH) supone la principal causa de hepatopatía en pacientes en diálisis (1). La prevalencia del VHC en este medio varía considerablemente en función de determinantes geográficos y de la técnica de despistaje utilizada (1). En España, la prevalencia del VHC en pacientes en diálisis es elevada, alcanzando 20% por test de segunda generación (ELISA2/RIBA2), según datos de la encuesta multicéntrica que se está realizando actualmente en nuestro país (comunicación personal). Un diagnóstico preciso de aquellos pacientes que presentan infección por el VHC es esencial tanto para el conocimiento real de la magnitud del problema, como para la adopción de medidas eficaces para el control de la infección, tales como la controvertida política de aislamiento que poco a poco se va generalizando en nuestro entorno.

Actualmente, la determinación directa de las secuencias del VHC mediante amplificación a través de la técnica de PCR (polymerase chain reaction) se considera la prueba de elección para el diagnóstico de la infección por el VHC (2). Sin embargo, tanto su elevado precio como su complejidad técnica, limitan su uso generalizado como técnica de despistaje en la práctica clínica diaria. Por esta razón, hasta el momento, su uso en la clínica se suele limitar a la confirmación de casos dudosos o a la determi-

### Correspondencia:

DR. E. MUÑOZ DE BUSTILLO.  
Servicio de Nefrología. Clínica Vistahermosa.  
Avda de Dénia 103. Alicante 03013  
Teléfono: 96 526 42 00 • Fax: 96 526 24 05

nación de la presencia o ausencia de viremia en pacientes en los que previamente se ha demostrado la existencia de anticuerpos frente al VHC.

Existen pocos trabajos en la literatura que hayan estudiado mediante PCR para el VHC poblaciones amplias de pacientes en diálisis tanto con serología positiva como negativa para el VHC, con resultados muy diferentes (3-7). De hecho, algunos de ellos han revelado un sorprendente alto número de pacientes en los que se ha demostrado viremia por PCR, a pesar de no presentar anticuerpos frente a dicho virus (6, 7). Estos hallazgos han creado cierta confusión en la comunidad nefrológica, al constituir el estatus VHC un aspecto de vital importancia para la actual estructuración de las unidades de diálisis en España. Fruto de esta inquietud surge el presente trabajo. Así, nos planteamos estudiar mediante PCR para el VHC a todos los pacientes de una misma unidad de hemodiálisis en la que se realizaba aislamiento de pacientes con serología VHC (+), en un intento de conocer hasta qué punto esta medida, tomada en función de los resultados del test ELISA2, se correspondía con la realidad en términos de viremia VHC. Por tanto, el objetivo principal del presente trabajo es calcular la sensibilidad (S) y especificidad (E) de la técnica de screening habitual (ELISA2), considerando la técnica de PCR como "gold-standard". Como objetivo secundario, nos hemos planteado conocer el porcentaje de pacientes que aún presentando serología positiva para el VHC, no presentan viremia, en un intento de discernir la posible existencia de características clínicas y/o analíticas que permitieran diferenciarlos de aquellos pacientes con serología positiva y viremia.

## Pacientes y métodos:

**Pacientes:** Para la determinación de la S y E del test ELISA2 frente a PCR, se han estudiado ciento dieciséis pacientes (69 varones y 47 mujeres) procedentes de una misma unidad de hemodiálisis en la que se realiza aislamiento de pacientes con serología positiva para el VHC en unidad especial. Diecinueve pacientes de la unidad presentaban anticuerpos frente al VHC (ELISA2) (16,3%). Este subgrupo de 19 pacientes con serología positiva para el VHC estaba constituido por 8 mujeres y 11 varones, con edad media de  $56,3 \pm 15,7$  años y un tiempo medio en diálisis de  $90,5 \pm 61$  meses. Uno de ellos era además portador del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), razón por la cual se dializaba en unidad especial para virus B.

**Métodos:** Se ha realizado un estudio de corte transversal con determinación de los anticuerpos para el VHC según técnica de ELISA2 (Ortho HCV ELISA2.0 Test System, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA). Esta técnica constituía el test de despistaje habitual en nuestra unidad cuando se realizó el estudio. La existencia o no de viremia se ha investigado mediante una única determinación a través de la técnica de PCR, utilizando el sistema Amplicor (Roche, Basel,

Suiza). Tres pacientes presentaban determinaciones previas. En aquellos pacientes en los que se demostró viremia por PCR, se determinó el genotipo, según el sistema Innolipa (Innogenetics). Todas las muestras se extrajeron prediálisis. EL suero destinado al análisis PCR se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de la centrifugación y separación, y sólo fue descongelado para realizar el procedimiento.

En el grupo de pacientes con serología positiva para el VHC, se han realizado las siguientes variables clínicas y analíticas: Edad, sexo, tiempo en diálisis, etiología de la IRC, etapa de adquisición del VHC (prediálisis o diálisis), Htco, Kt/v, Pcr, albúmina sérica y niveles de transaminasas. Los valores analíticos corresponden a un corte transversal determinado en una muestra de sangre extraída simultáneamente al estudio serológico y de PCR para el VHC. Se ha procedido a comparar dichas variables entre los pacientes con serología positiva para el VHC y viremia, y aquellos con serología positiva en los que no se ha podido demostrar viremia mediante PCR. Las pruebas estadísticas elegidas para dicha comparación han sido la Chi cuadrado y la t de Student, en función de las características de las variables. Las diferencias se han considerado significativas cuando el valor de la "p" ha resultado inferior a 0.05. El análisis estadístico ha sido realizado con el paquete informático SPSS.

## Resultados:

Valor diagnóstico de la técnica ELISA2, en relación con la PCR para el VHC: No se encontró viremia del VHC por PCR en ningún paciente con serología negativa para el VHC por ELISA2 (Tabla 1). Es decir, los 97 pacientes antiVHC negativos (ELISA2), se confirmaron negativos por PCR. De entre los 19 pacientes que se dializaban en unidad especial por presentar anticuerpos frente al VHC por ELISA2, se demostró viremia por PCR en 13 de ellos. Sin embargo, 6 pacientes con serología positiva para VHC resultaron PCR negativos, entre ellos, el paciente portador del HBsAg. Con estos resultados, la S del test ELISA2, considerando la PCR como "gold-standard", alcanza el 100% y la E se sitúa en 99,1%. Por último el valor predictivo negativo (UPN) supone el 100%, con un valor predictivo positivo (VPP) de 68,4%.

TABLA 1:

	PCR (-)	PCR (+)
ELISA2 (-)	97	0
ELISA2 (+)	6	13

*Resultados del test ELISA2 frente a los de la PCR para el VHC en los pacientes de una misma unidad de diálisis (los valores corresponden al número de pacientes con dichas determinaciones).*

En dos de los tres pacientes que habían sido valorados mediante PCR para el VHC con anterioridad, se confirmó el resultado previo: en un paciente, las dos determinaciones resultaron negativas con un intervalo entre ambas de 13 meses. En otro, ambas fueron positivas, después de 7 meses

de seguimiento. Por último, en un paciente que presentaba PCR positiva en 1991 (genotipo 1b), tanto el control de 1992, como el actual resultaron negativos.

Genotipos VHC: El estudio de los genotipos reveló una mayoría de pacientes con genotipo 1b (8 pacientes, 61.5%). Tres pacientes eran genotipo 1a (23%). Un paciente era genotipo 2b y otro presentaba tanto el genotipo 2a como el 2c.

Características de los pacientes antiVHC(+) con o sin viremia: El estudio comparativo de las características clínicas y analíticas de los 13 pacientes ELISA2 (+)/PCR(+) en relación con los 6 pacientes ELISA2(+)/PCR(-) no reveló diferencias significativas (Tabla 2). Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la etiología de la insuficiencia renal (datos no mostrados). Sin embargo, se observa cierta tendencia a la significación en cuanto a la edad, el sexo y el tiempo en diálisis. Así, el grupo PCR(+) es de mayor edad (60,3±12,6 vs. 47,2±19,3 años, p=0,1), presenta un mayor porcentaje de mujeres (53,8% vs. 16,6%, p=0,07), y un menor tiempo medio en hemodiálisis (74,9±55,9 vs. 124,3±63,4 meses, p=0,1). Llama la atención el hecho de que las cifras de GOT y GPT son las más elevadas en el grupo con viremia, mientras que la GGT presenta niveles más elevados en el grupo PCR(-). Las diferencias, sin embargo, no son significativas (Tabla 2.)

TABLA 2

	PCR (+)	PCR (-)	p
Pacientes (n)	13	6	
Edad (años)	60±12,6	47,6±19,3	0,1
Sexo (%mujer)	53,8%	16,6%	0,07
Tiempo en HD	74,9±55,9	124,3±63,4	0,1
Hcto	37,7±6,5	35,8±4,5	0,5
Kt/v	1,4±0,2	1,8±0,4	0,4
Per	1,06±0,3	1,1±0,2	0,5
Albúmina	4,6±0,8	4,1±0,5	0,5
GOT	40,5±5,0	28±1,3	0,4
GPT	58,1±52,7	38±18,3	0,2
GGT	68,6±49,7	108,5±118	0,4

Tabla 2: Características clínicas y analíticas de los pacientes ELISA2 (+)/PCR (-) frente a aquellos ELISA2 (+)/PCR (+).

## Discusión:

Desde que la técnica de PCR se aplicó al diagnóstico de la infección por el VHC, han sido varias las publicaciones en las que se ha utilizado esta técnica para el estudio de la población en diálisis, generalmente como prueba de confirmación ante la presencia de anticuerpos frente al VHC (8-11). Son menos los trabajos en los que se ha aplicado esta técnica también a pacientes con serología negativa para el VHC (3-7). Si bien la mayoría de ellos han revelado una buena correlación entre las técnicas serológicas y la PCR, algunos recientes han puesto en entredicho el papel de los test serológicos de segunda generación en el diagnóstico de

la infección por VHC en el contexto de la insuficiencia renal crónica en tratamiento substitutivo (6,7). En nuestra experiencia, la técnica de ELISA de segunda generación se ha mostrado como un test muy útil en el despistaje de la infección por el VHC en los pacientes en diálisis, con un S y un VPN del 100%, en relación con los resultados de la PCR. De esta forma, esta técnica, que constituye el test de screening habitual para el VHC en nuestro medio, se confirma como una buena alternativa para el diseño de las políticas de control epidemiológico de la infección por el VHC, superando en este sentido a la técnica de RIBA2, más específica pero menos sensible (12).

Entre las publicaciones en las que se ha objetivado pacientes con viremia para el VHC en ausencia de anticuerpos, la prevalencia de este hecho ha sido muy variada, oscilando entre un 2,6% y un 28,2% (4,6,7). Varios factores pueden justificar esta discordancia: por un lado, la detección de viremia en ausencia de anticuerpos puede reflejar infección reciente, antes del desarrollo de anticuerpos, en lo que se ha venido a llamar el "periodo ventana". De hecho, la determinación seriada de anticuerpos en alguno de los trabajos referidos ha demostrado la posterior seroconversión en varios de estos pacientes (4,7). El hecho de que en alguno de estos trabajos la incidencia de nuevas infecciones fuera alta podría facilitar asimismo esta posibilidad (4,7). Por otro lado, en alguno de los estudios referidos, la determinación seriada de PCR no ha sido capaz de demostrar los resultados previos (7). Dado que la técnica de PCR es extremadamente laboriosa, la posibilidad de falsos positivos no puede ser desestimada, por último, la inmunosupresión propia de la insuficiencia renal puede ser responsable de esta discrepancia entre los resultados de la PCR y la serología, aspecto éste resaltado por aquellos trabajos en los que el porcentaje de pacientes PCR(+)/antiVHC(-) ha resultado elevado (6,7) y que nosotros no hemos podido contrastar en nuestra experiencia.

Por otro lado, nuestros resultados confirman la existencia de un porcentaje estimable de pacientes que, mostrando anticuerpos frente al VHC, no expresan viremia activa por PCR. Esta circunstancia ya había sido ampliamente comentada en la literatura (8-11). En nuestra experiencia, el 31,6% de los pacientes que se dializaban en una unidad especial según los resultados de los estudios serológicos de rutina (5 en unidad VHC y 1 en unidad VHC/VHB), presentaron PCR(-) para el VHC en nuestro estudio transversal. En un paciente, esta determinación confirmaba otra negativa realizada 13 meses antes. Varios mecanismos pueden justificar esta discrepancia entre la serología y la PCR: En primer lugar, está demostrado que el VHC puede acantonarse en tejido hepático o células mononucleares, sin tener expresión en plasma (9,13). La viremia, por tanto, podría no existir, o ser intermitente (9). Así, para un diagnóstico preciso, sería necesarias determinaciones seriadas mediante PCR para descartar con garantías la potencial infectividad de un paciente ELISA2(+)/PCR(-). Mucho menos probable, aunque descrito, sería la posibilidad de la existencia de una tasa de replicación suficientemente baja como para encontrarse

por debajo del límite de detección, o la adquisición de anticuerpos de forma pasiva por transfusión, en ausencia de viremia (3,14). Por último, los pacientes ELISA2(+)/PCR(-), podrían ser pacientes que han tenido contacto con la infección por el VHC, y la han superado, quedando los anticuerpos como "recuerdo inmunológico" (1). Estos pacientes, por supuesto, no sólo no serían infectivos, sino que podrían ser objeto de co-infección por otra cepa diferente del VHC, para la que tendrían inmunidad cruzada (15). De esta forma, la controversia sobre qué actitud tomar frente a estos pacientes ELISA2(+)/PCR(-) no ha hecho más que empezar, y habrá que esperar a estudios amplios y prospectivos que sienten las bases de actuación en relación a estos pacientes en aquellas unidades que practicaban medidas de aislamiento con el VHC.

El intento de definir alguna variable clínica o analítica que nos permita sospechar viremia en aquellos pacientes con serología para el VHC ha resultado infructuoso. Así, si bien se observa que los pacientes PCR(+) son de mayor edad y preferentemente mujeres, las diferencias no llegan a alcanzar la significación estadística. Curiosamente, el único trabajo que hace referencia a la potencial influencia del sexo en la replicación del VHC en pacientes en diálisis, encuentra un significativo mayor nivel de expresión del VHC en los hombres infectados en relación de las mujeres (3). Otro aspecto que ha generado gran discusión es el nivel de transaminasas como potencial reflejo de la viremia. De acuerdo con otros autores, en nuestra experiencia las transaminasas no sirven para dicho cometido, aunque la escasa muestra nos impide sacar conclusiones (5,8,9). Así, si bien los niveles de GOT y GPT tienden a ser más elevados en el grupo en el que se pudo demostrar viremia, las diferencias no son significativas probablemente por el bajo número de pacientes y la gran heterogeneidad de valores. Además, las cifras medias de GGT resultaron sorprendentemente más elevadas en el grupo PCR(-).

En conclusión, en nuestra experiencia el test ELISA2 sigue siendo una técnica extremadamente útil en el despistaje de la infección por el VHC en los pacientes en diálisis, ya que ha demostrado una S y un VPN del 100% en relación a la detección de viremia mediante PCR. Por tanto, en nuestra opinión, se puede seguir utilizando como test de referencia en el diseño de políticas de control epidemiológico de la infección. Por otro lado, existe un porcentaje de pacientes con serología positiva para el VHC que no demuestran viremia activa por PCR, aunque no encontramos ningún signo clínico o analítico que nos permita diferenciarlos de aquellos PCR(+). Se necesitan estudios más amplios con determinaciones seriadas de forma prospectiva para analizar la significación real de este hecho, y su importancia de cara a la inclusión de un paciente ELISA2(+)/PCR(-) en una unidad de pacientes con serología negativa en aquellos centros en los que se realicen medidas de aislamiento del VHC.

## Bibliografía

1. Pereira BJG, Levey AS. Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int* 1997; 51: 981-999.
2. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335:1-3.
3. Dubois CB, Gretch D, De la Rosa CBS et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in sera of hemodialysis patients: Gender-related differences in viral load. *Am J Kid dis* 1994; 24: 795-801.
4. Chan TM, Lok ASF, Chen IKP, Chan RT. Prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: A longitudinal study comparing the results of RNA and antibody assays. *Hepatology* 1993; 17:5-8.
5. Silini E, Bono F, Cerino A, Piazza V, Solcia E, Mondelli MU. Virological features of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *J Clin Microbiol* 1993;31: 2913-2917.
6. Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K et al. High prevalence of hepatitis C virus RNA in dialysis patients: Failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis* 1993; 168:1343-1346.
7. Caramelo C, Bartolomé J, Albalade M, et al. Undiagnosed hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: value of HCV RNA and liver enzyme levels. *Kidney Int* 1996; 50: 2027-2031.
8. Pol S, Romeo R, Zins B et al. Hepatitis C virus RNA in anti-HCV positive hemodialyzed patients: Significance and therapeutic implications. *Kidney Int* 1993; 44: 1097-1100.
9. Dussol B, Chicheportiche C, Cantoaloube JF et al. Detection of hepatitis C infection by polymerase chain reaction among hemodialysis patients. *Am J Kid Dis* 1993; 22: 574-580.
10. Fabrizi F, Lunghi G, Guarnori I et al. Virological characteristics of hepatitis C virus infection in chronic hemodialysis patients: A cross-sectional study. *Clin Nephrol* 1995; 44: 49-55.
11. Colleoni N, Bucci R, Ribero ML, Zhou J, D'Amico G, Tagger A. Hepatitis C virus genotype in anti-HCV positive hemodialyzed patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 2258-2264.
12. Meshari KA, Al Ahdal O, Alfurayh A, De Vol E, Kessie G. New insights into hepatitis C virus infection of hemodialysis patients: the implications. *Am J Kid Dis* 1995; 25: 572-578.
13. Willems M, Peerlinck K, Moshage et al. Hepatitis C virus-RNAs in plasma and in peripheral blood mononuclear cells of hemophiliacs with chronic hepatitis: Evidence of viral replication in peripheral blood mononuclear cells. *J. Med virol* 1994; 2-278.
14. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1990; 323: 1494-1500.
15. Kao JH, Chen PJ, My L, Chen DS. Superinfection of heterologous hepatitis C virus in a patient with chronic type C hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105: 583-587.