

USO RACIONAL DE LOS METODOS DE DIAGNOSTICO PARA LAS HEPATITIS.


Dra. María Belén Bouzas.
Jefa de Division Analisis Clinicos



Hospital de Infecciosas
Francisco J. Muñiz



GRACIAS

- 
- Revisión de los algoritmos de diagnóstico para Hepatitis A,B,C y E.
 - Nuevas herramientas para ampliar el diagnóstico: los tests rápidos.

Conflicto de intereses

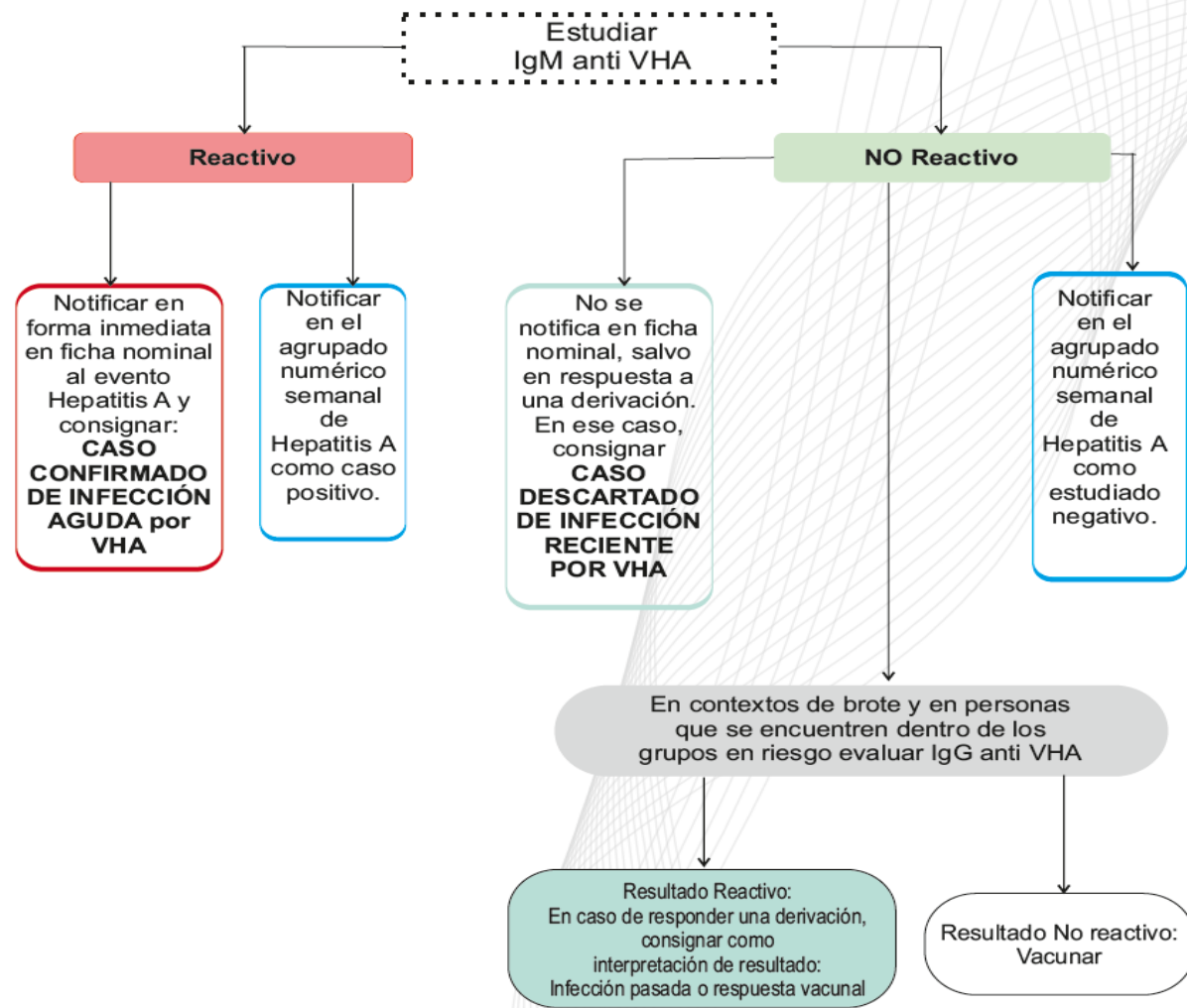


No poseo conflicto de intereses.



Algoritmo de diagnóstico y notificación a través de SIVILA-SNVS de Hepatitis A.

Caso sospechoso de hepatitis viral aguda: paciente con malestar general, dolores musculares, articulares, vómitos, fiebre, que presenta elevación de aminotransferencias $>2,5$ el VN, no atribuible a otras causas, con si presencia de ictericia.



A horizontal decorative bar at the top of the slide, consisting of a red rectangular section on the left and a teal rectangular section on the right.

Algoritmo de diagnóstico y notificación a través de SIVILA-SNVS de Hepatitis E.

Casos sospechosos de hepatitis viral con resultados negativos para VHA, VHB y VHC:

Si no se dispone de técnicas serológicas:

Estudiar ARN VHE por técnicas moleculares

DETECTABLE: Notificar un nuevo estudio en forma inmediata en ficha nominal y consignar como interpretación de resultado: **CASO CONFIRMADO DE INFECCIÓN por VHE***

NODETECTABLE: Notificar un nuevo estudio en ficha nominal y consignar como interpretación de resultado: **SIN INFECCIÓN DETECTABLE**

Si se dispone de técnicas serológicas:

Estudiar IgM y/o IgG anti VHE o anti VHE totales:

NO REACTIVO IgM anti VHE y/o IgG anti VHE o anti VHE totales
CASO NO CONCLUSIVO DE INFECCIÓN POR VHE

REACTIVO
Notificar en forma inmediata en ficha nominal al evento Hepatitis E y consignar: **CASO PROBABLE DE INFECCIÓN por VHE***

Estudiar ARN VHE por técnicas moleculares

Estudiar ARN VHE por técnicas moleculares

NO Detectable: Notificar un nuevo estudio en ficha nominal y consignar como interpretación de resultado: **CASO DESCARTADO DE INFECCIÓN por VHE**

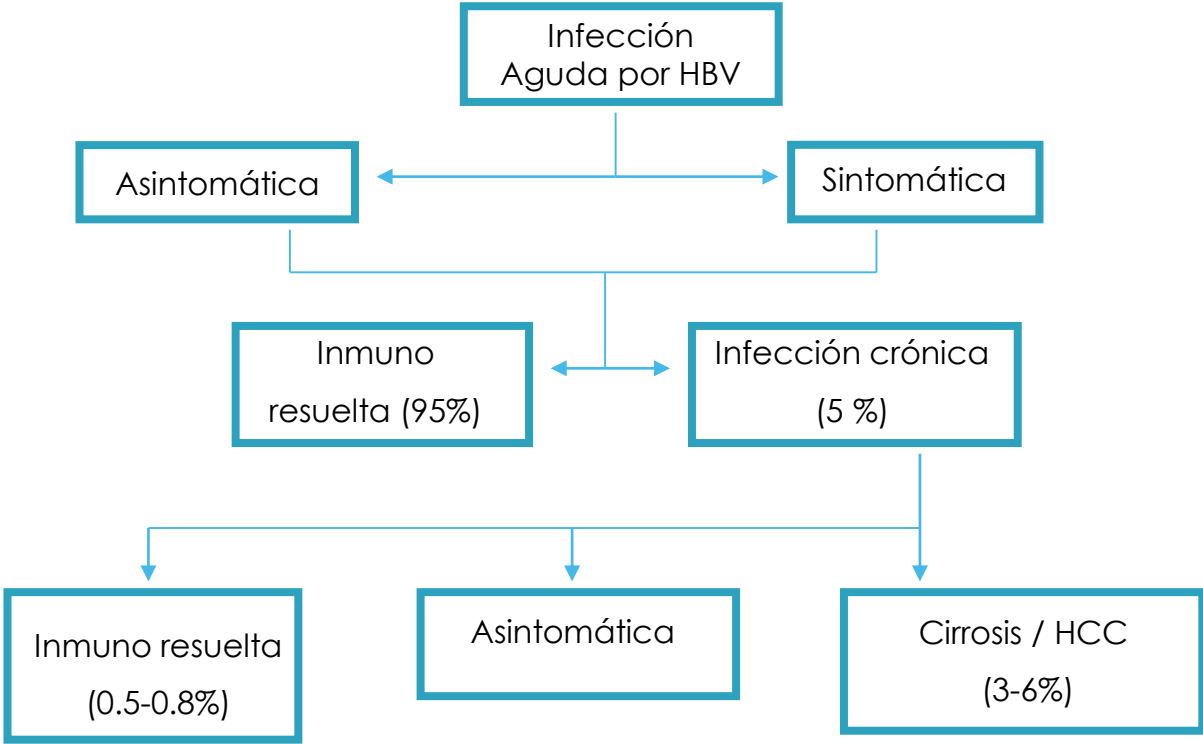
Detectable: Notificar un nuevo estudio en forma inmediata en ficha nominal y consignar como interpretación de resultado: **CASO CONFIRMADO DE INFECCIÓN por VHE***

NO Detectable: Notificar un nuevo estudio en ficha nominal y consignar como interpretación de resultado: **Posible infección pasada**

*** IMPORTANTE :** consignar con la mayor precisión posible: domicilio, teléfono, edad y tomar muestra de materia fecal en tubo seco tipo Eppendorf lo más precozmente posible

Diagnóstico y seguimiento de Hepatitis B

Infección por HBV en adultos: Historia natural



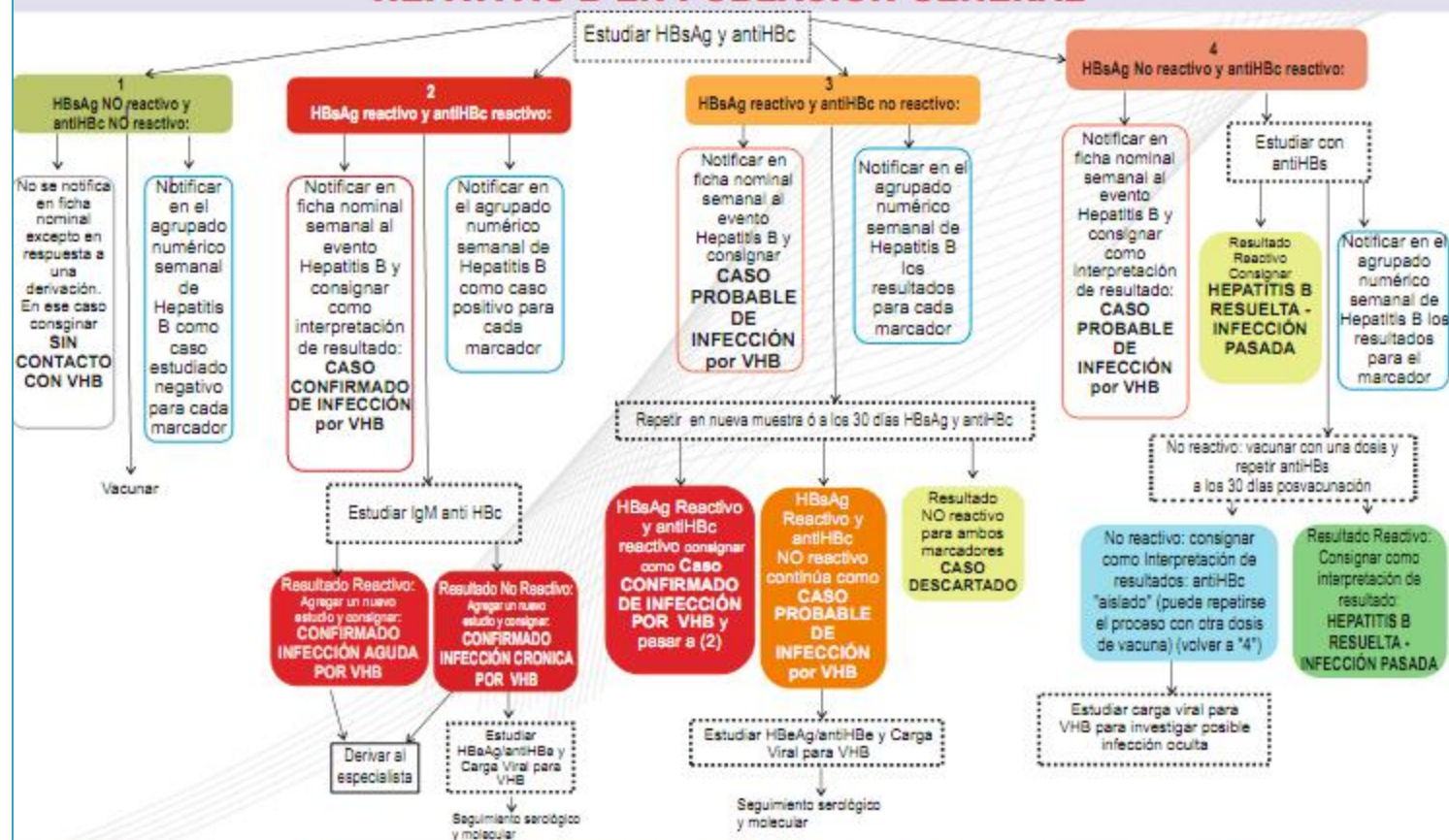
Síntomas (si los hay): náuseas, vómitos, dolor abdominal, fiebre, diarrea, ictericia, pérdida del apetito.

Marcadores serológicos en la infección por HBV

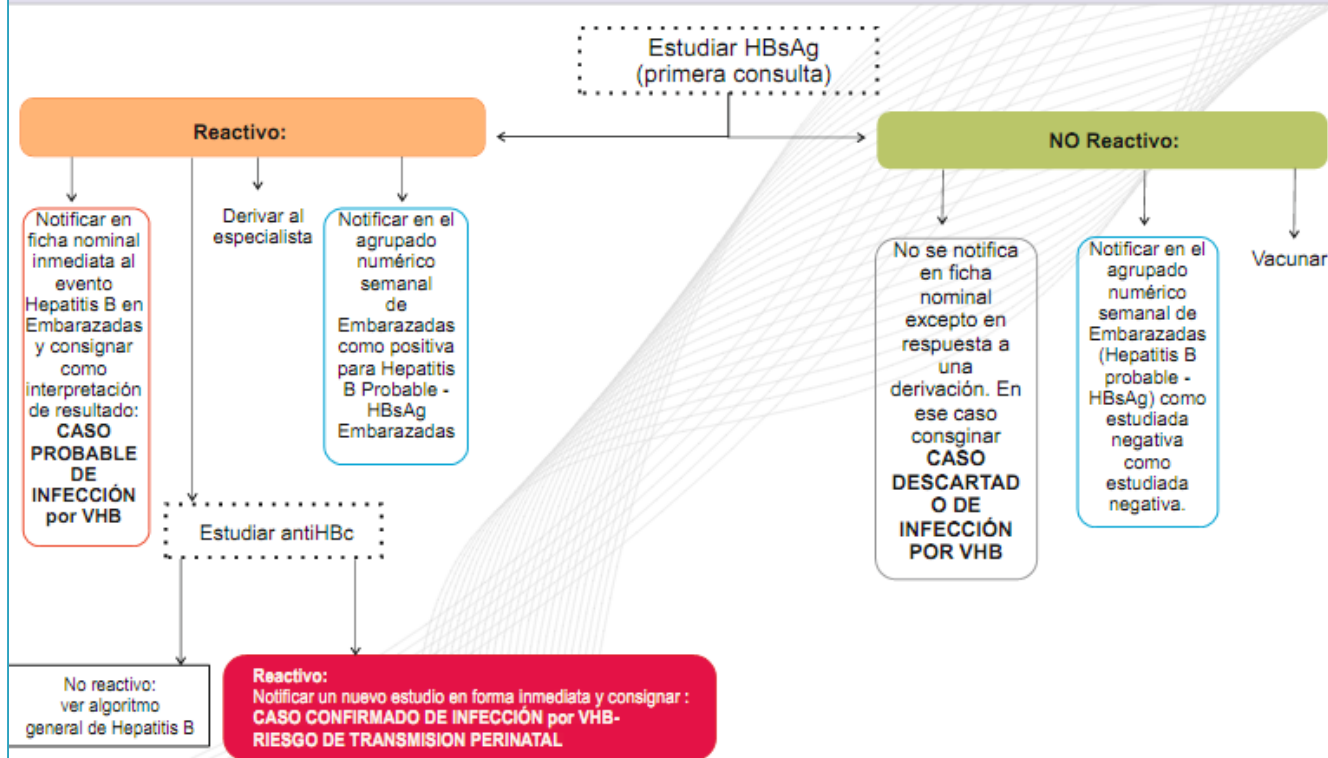
HBSAG	AntiHBc total	antiHBc IgM	Anti HBs	INTERPRETACION
NEG	NEG	NEG	NEG	Susceptible a la infección
POS	POS	POS	NEG	Infección aguda
NEG	POS	POS	POS/NEG	Infección aguda en resolución
NEG	POS	NEG	POS	Infección pasada resuelta
POS	POS	NEG	NEG	Infección crónica. Evaluar presencia de HBeAg , anti HBe y los niveles de HBVDNA
NEG	NEG	NEG	POS	Immune si >10UI/ml, transferencia pasiva por administración de gamaglobulina

Algoritmo de diagnóstico y notificación a través del SIVILA-SNVS

HEPATITIS B EN POBLACION GENERAL



Algoritmo de diagnóstico y notificación a través del SIVILA-SNVS HEPATITIS B EN EMBARAZADAS



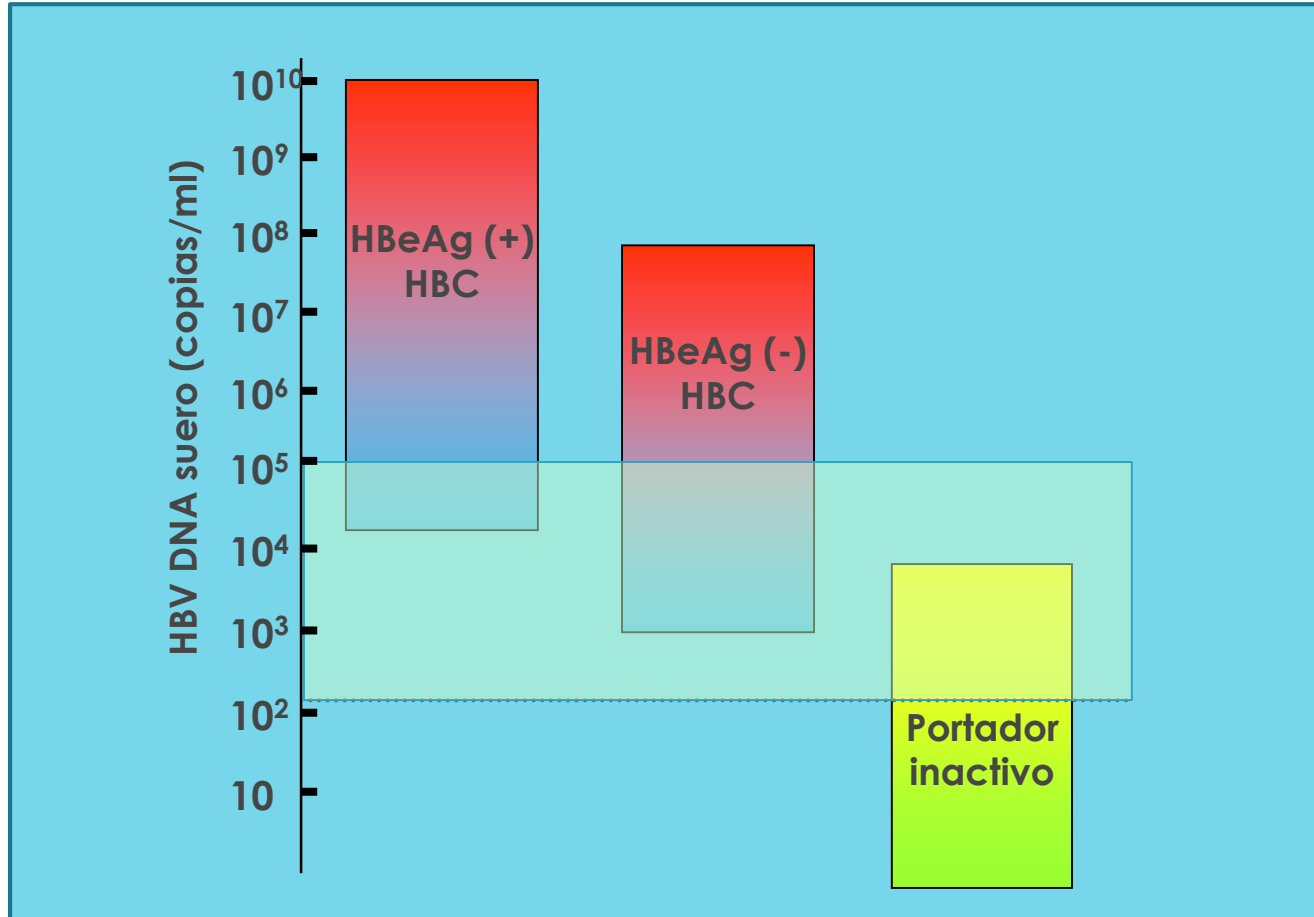
Patrones serológicos inusuales en la infección por HBV

HBSAG	AntiHBc total	antiHBc IgM	Anti HBs	INTERPRETACION
POS	POS	NEG	POS	Coexistencia de HBsAg y antiHBs Patrón serológico inusual: inmunocomplejos, inespecificidad, Evaluar los niveles HBVDNA
NEG	POS	NEG	NEG	antiHBc aislado Patrón serológico inusual: infección pasada resuelta, mutantes S,OBI. Evaluar con AntiHBe y HBV DNA.
POS	NEG	NEG	NEG	Infección aguda temprana. Patrón serológico inusual: evaluar la presencia de HBeAg. Antigenemia fugaz post vacunación, tolerancia inmune, mutantes defectivos.

Carga Viral (CV) de HBV-DNA

- Objetivo: Determinar los niveles cuantitativos de viremia en pacientes con infección con HBV en suero o plasma.
- Se expresa en Unidades Internacionales/ml (IU/ml) y en copias/ml (c/ml), y los valores absolutos se transforman en \log_{10} .
- Aplicación: 1) Seguimiento de la infección en pacientes crónicamente infectados. 2) Análisis de la cinética de respuesta intratamiento. 3) Diagnóstico de hepatitis B oculta.

Niveles de HBV DNA en infección crónica



Ensayos de carga viral HBV-DNA

Ensayo comercial	Método / Target	Rango cuantitativo	Sensibilidad	Detección Genotipo
COBAS TaqMan HBV Test	PCR en tiempo real target la región pre-Core/Core	29 a $1,1 \times 10^8$ UI/ml 1 UI= 5.82 copias	4-10 UI/ml	A-G y mutantes precore
COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test	Extracción automática. PCR en tiempo real target la región pre-Core/Core	20 a $1,7 \times 10^8$ UI/ml 1 UI= 5.82 copias	9 UI/ml plasma 19 UI/ml suero	A-G y mutantes precore
Abbott real time PCR	PCR en tiempo real target : segmento del gen S	10 a 1×10^9 UI/ml 1 UI=6 copias	10-15 UI/ml	A-G y variantes del gen pol

Cuantificación de HBsAg

Características

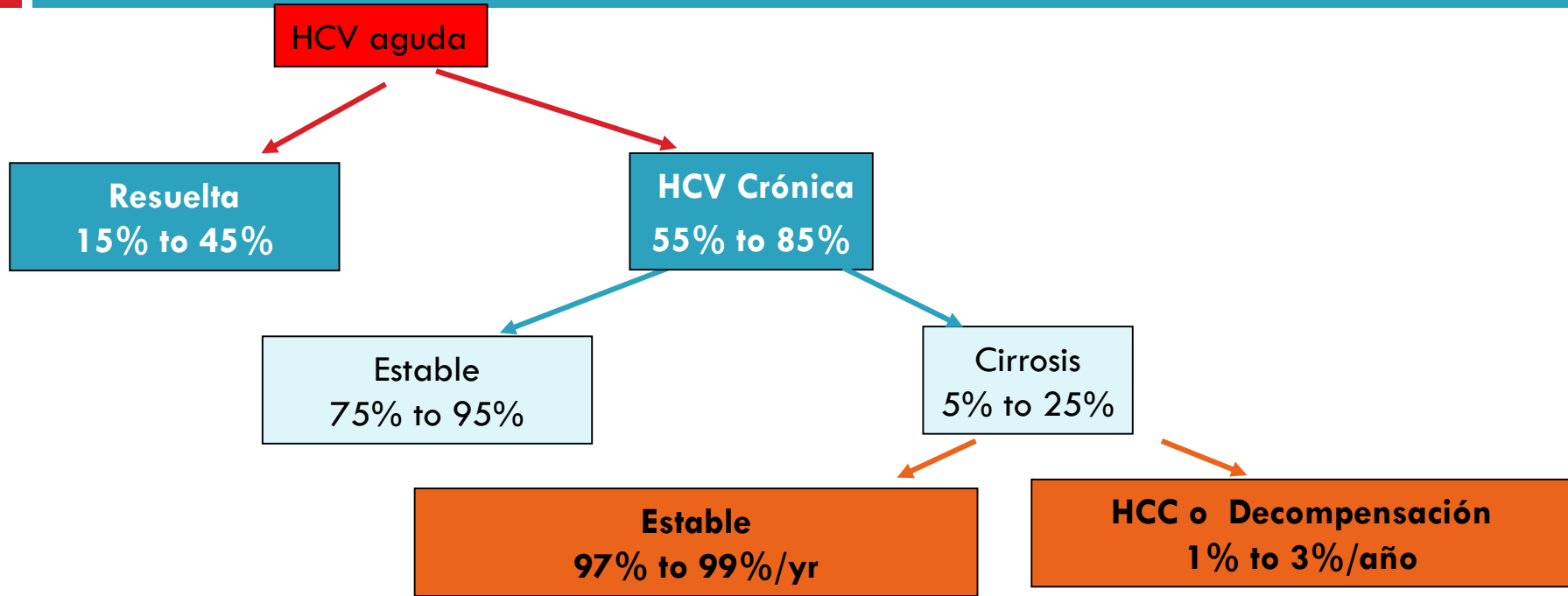
y

Potenciales indicaciones

- Se expresa en UI/ml .
- Solo dos marcas comerciales lo han desarrollado Roche (Eclcsys) y Abbott (Architect)
- Permiten caracterizar la fase inactiva junto con los niveles de HBV-DNA (HBsAg <1000 UI/ml y HBV-DNA <2000 UI/ml).
- Predecir severidad de la fibrosis en el tratamiento de naive HBeAg-genotipo B y C.
- Riesgo de desarrollar HCC en HBeAg – con bajos niveles de HBV-DNA pero altos niveles de de HBsAg.
- Mayor evidencia que sugiere el monitoreo durante la terapia con alpha INF.

Diagnóstico y seguimiento de Hepatitis C

Historia natural de la infección por HCV

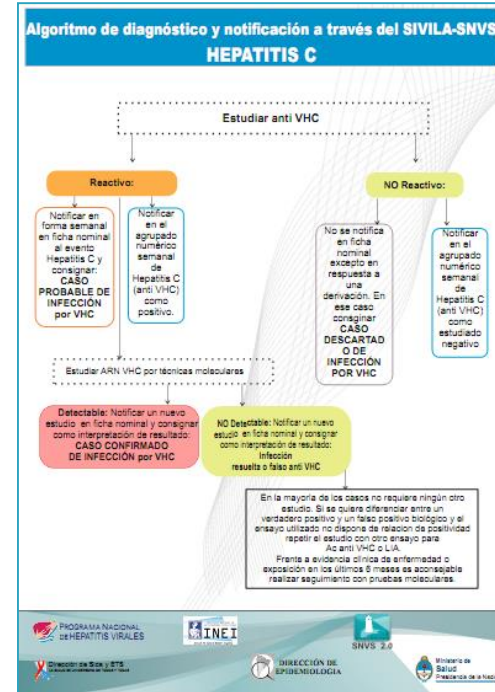
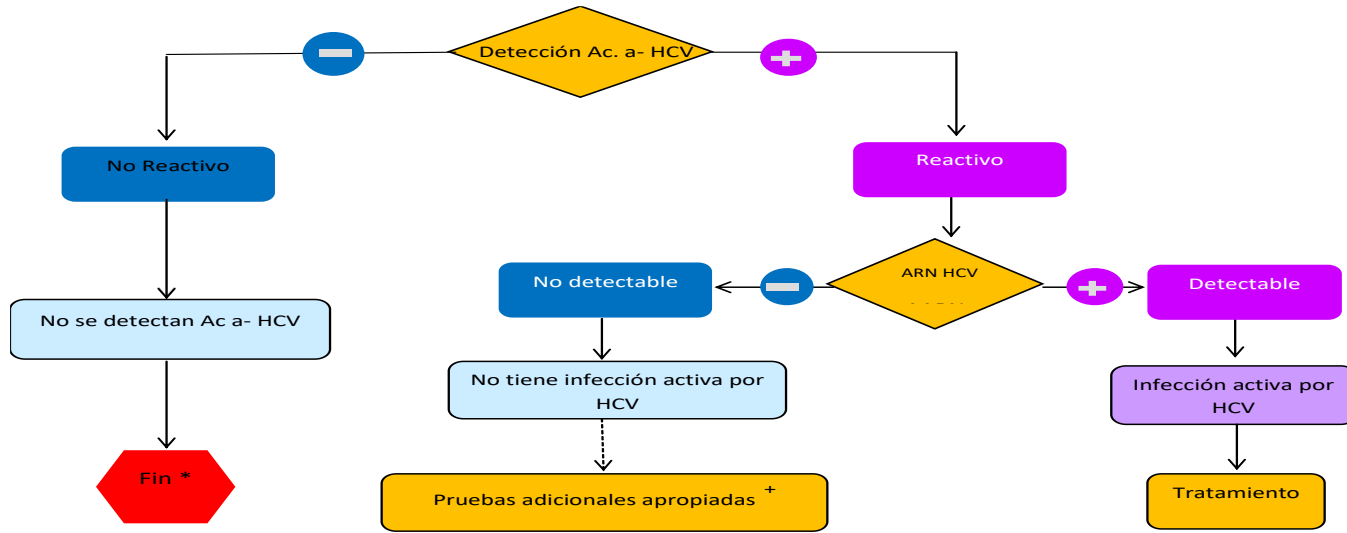


Algoritmos de Diagnóstico

Ensayo de tamizaje	Método	S/CO VPP > 95%
Ortho HCV Version 3.0 EIA	ELISA (Manual)	3.8
Abbott HCV EIA 2.0	ELISA (Manual)	3.8
Ortho Vitros Anti-HCV Assay	CIA (Automatizado)	8.0
Abbott AxSYM Antibody to HCV	MEIA (Automatizado)	≥10.0
Siemens Advia Centaur HCV Assay	CIA (automatizado)	≥11.0
Architect Anti HCV	CMIA (Automatizado)	≥5

- Algoritmo suplementario reflejo: complejo, costoso y con un tiempo extendido en la devolución del resultado.
- Algoritmo con inclusión de uso de cortes de positividad (RP, s/co) específicos para cada ensayo de tamizaje (VPP > 95%). No disponible para muchos ensayos.
- La nueva secuencia de estudio incluye la detección de RNA, y comienza con un test rápido o con un ensayo de laboratorio, y no requiere que el resultado reactivo sea reportado con su RP.

Secuencia recomendada para identificación activa de HCV



* Para personas que podrían haber estado expuestas dentro de los últimos 6 meses, se recomienda el testeo de ARN VHC o seguimiento de anticuerpos anti VHC. Para personas inmunocomprometidas puede ser considerado el estudio de ARN VHC.

+ Para diferenciar entre infección resuelta por VHC de un falso positivo biológico, se deberá considerar el testeo con otro ensayo de detección de anticuerpos Ac. A-HCV. Si se sospecha que la persona testada ha tenido exposición a HCV dentro de los últimos 6 meses o hay evidencia clínica de enfermedad por HCV .

Interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas para la infección por HCV

Resultados de Pruebas Diagnósticas	Interpretación	Acciones Posteriores
Ac .a-HCV No Reactivo	Ac .a- HCV no detectables	La muestra puede ser informada como no reactivo para Ac anti HCV. Si se sospecha de exposición reciente o el paciente es inmunocomprometido realizar la detección de ARN- HCV.
Ac .a-HCV Reactivo	Presunta infección por HCV	Un resultado reactivo puede ser compatible con infección actual, infección pasada resuelta, o un falso positivo biológico para Ac anti HCV. Se debe realizar detección de ARN HCV para confirmar infección actual
Ac .a- HCV Reactivo ARN -HCV Detectable	Infección actual por HCV	Brindar asesoramiento apropiado y vincular al servicio de salud para recibir la atención y el tratamiento médico adecuado.
Ac .a-HCV Reactivo ARN-HCV No detectable	No cursa infección por HCV	En la mayoría de casos no requiere ningún otro estudio. Frente a evidencia clínica de enfermedad o exposición en los últimos 6 meses es aconsejable realizar seguimiento con ARN – HCV.

Ensayos de laboratorio aplicados en el tratamiento

- Genotipo HCV
 - ❖ Genotipo epidemiológico pre tratamiento (1-6)
 - ❖ Genotipo de RAVs
- HCV-RNA cuantitativo (Carga Viral)

Técnicas disponibles para el estudio de genotipo

TECNICA	MARCA	METODOLOGIA	REGION
INNO-LIPA HCV 2.0	INNOGENETICS	HIBRIDIZACION INVERSA	5NC + CORE/E1
TRUGENE HCV	SIEMENS	SECUENCIACION	5NC
ABBOTT RealTime HCV Genotipo II assay	ABBOTT	REAL TIME PCR	5NC + NS5B
Estandarizados en el laboratorio	-	SECUENCIACION	3NC, 5NC, CORE/E1, NS5B; NS5A

Carga viral HCV

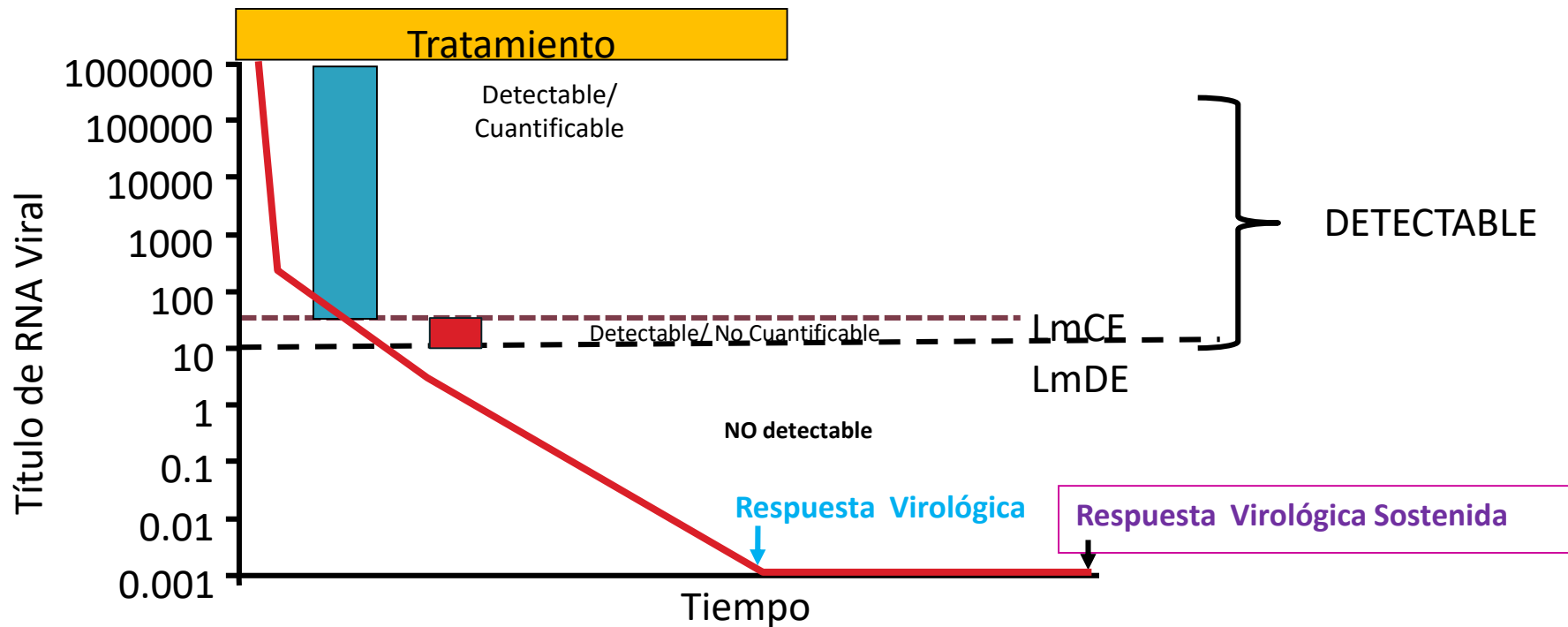
- Objetivo: determinar los niveles cuantitativos de viremia en pacientes con replicación activa del HCV.
- Aplicación:
 - ▣ determinar niveles replicativos pre-tratamiento
 - ▣ Analizar la cinética de respuesta intratramiento.
- Solo se deben utilizar métodos comerciales validados contra el estándar de OMS que expresen sus resultados en UI/ml.

Ensayos cuantitativos de HCV-RNA (Carga Viral)

Ensayo (Productor) ^[1]	Método	Rango Dinámico IU/mL (LmDE – LMDE)	LmDE, IU/mL	LmDE = LmCE	FDA Approved
LCx HCV RNA-Quantitative Assay (Abbott Diagnostics)	Semiautomated RT-PCR	25-2,630,000	23	No	No
SuperQuant (National Genetics Institute)	Semiautomated RT-PCR	30-1,470,000	30	SI	No
Cobas TaqMan HCV Test (Roche Molecular Systems)	Semiautomated RT-PCR	43-69,000,000	18	No	Yes
COBAS TaqMan HCV Test v2.0 for use with High Pure System (Roche Molecular Systems)	Semiautomated RT-PCR	25-300,000,000	15	No	Yes
Abbott RealTime HCV Assay (Abbott Diagnostics)	Semiautomated RT-PCR	12-100,000,000	12	SI	Yes
Cepheid Xpert [®] HCV Viral Load	Automated RT-PCR	10-100.000.000	10	SI	No

¿Qué ensayo de HCV RNA debe usarse para evaluar respuesta a Antivirales en HCV?

- Un ensayo cuantitativo con un **LmDE de 15 IU/mL**. Si el método utilizado puede arrojar resultados **Detectables no cuantificables** (valor entre 10 y 25 UI/ml) este resultado deberá ser considerado como **DETECTABLE**.



Momentos para medir carga viral

- Al inicio del tratamiento
- Semana 4
- Semana 12 (opcional)
- Fin de tratamiento (semana 24)
- RVS (12 semanas post-finalización del tratamiento).

Nuevos ensayos serológicos para HBV y HCV

Características generales

Ensayos Rápidos

- ❑ Son simples y rápidos.
- ❑ Son métodos inmunocromatográficos.
- ❑ El resultado puede obtenerse entre los 4-30 minutos.
- ❑ No requieren de equipamiento para su realización.
- ❑ El entrenamiento requerido para su realización es mínimo.
- ❑ Hay desarrollados tests rápidos combinados que detectan simultáneamente Ac. o Ag. para sífilis, HIV y HBV.

HBV

Ensayos
Rápidos

- Están disponibles desde 1990
- Su uso ha sido limitado debido a la cuestionabilidad sobre:
- Precisión de los tests y eficacia comparada entre los mismos.
- Aplicabilidad en los distintos escenarios.

Accuracy of Rapid Point-of-Care Diagnostic Tests for Hepatitis B Surface Antigen – A Systematic Review and Meta-analysis

Mehnaaz S. Khuroo^{*}, Naira S. Khuroo[†], Mohammad S. Khuroo[†]

N° Estudios	N° Marcas comerciales	Overall Pooled (95%CI)				
		S	E	LR+	LR-	DOS
27	49	97.1% (96.1-97.9)	99.9% (99.8-100)	1118.4 (84.7-165.5)	0.032 (0.023-0,045)	4094.7 (2504.1-6600.8)

S: 43.5-99.8%

E: 100% (90-100%)

Sensibilidad analítica: 4UI/ml

La heterogeneidad :

- Localización del estudio
- Estandard de referencia
- Score del estudio

Que exige OMS en los estudios de precalificacion?

Table 1. Summary of the new the WHO performance acceptance criteria of HBsAg In vitro Diagnostic Tests.

Intended use	EIAs	RDTs
Screening of blood donations, AND Testing of asymptomatic and symptomatic individuals for diagnostic purposes.	LoD ≤ 0.13 IU/mL	LoD ≤ 0.13 IU/mL
	Sensitivity 100%	Sensitivity $\geq 99\%$
	Specificity $\geq 98\%$	Specificity $\geq 98\%$
Testing of asymptomatic and symptomatic individuals for diagnostic purposes.	LoD ≤ 4 IU/mL	LoD: ≤ 4 IU/mL
	Sensitivity 100%	Sensitivity $\geq 99\%$
	Specificity $\geq 98\%$	Specificity $\geq 98\%$
Inter-reader variability	N/A	$\leq 5\%$

Hasta el momento no hay ninguno en el listado de precalificacion.

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE UN TEST RÁPIDO PARA ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (HBsAg).

	Referencia (CMIA)	TR	E Suero	E SE	S Suero	S SE	Valores predictivos
Suero 98 muestras	41 NR	41	100 %	-	-	-	VPP 100 %
	57 R	53	-	-	93,4 %	-	VPN 91 %
Sueros pareados con SE 92 muestras	52 NR	52	-	100 %	-	-	VPP 100 %
	40 R	37	-	-	-	93 %	VPN 93 %

- TR evaluado Determine, ALERE.
- GS: HBsAg de Architect (CMIA).

Rango de cuantificación: 0.05-250 UI/ml

Tipo de muestra	Resultado de referencia CMIA	Clasificación de muestras según valores HBsAg (IU/ml)
Suero	41 NR	< 0,05 IU/ml
	57 R	43 muestras >250 IU/ml
		14 muestras <250 IU/ml (0,07-241 IU/ml)
Suero pareado con sangre entera	52 NR	< 0,05 IU/ml
	40 R	32 muestras >250 IU/ml
		8 muestras <250 IU/ml (0,08-136,7 IU/ml)

Resultado del TR en suero y sangre entera en función de la concentración de HBsAg por CMIA (n=98 muestras reactivas).



- Las 7 muestras no detectadas en suero o sangre entera tenían valores de HBsAg entre 0,07 y 1,73 UI/ml por CMIA y correspondían a pacientes en seguimiento con diagnóstico de HBV

Validación en muestras clínicas del TR para detección de HBsAg en poblaciones con distinta prevalencia para HBV.

Centro	N° de muestras	Gold Standard	Frecuencia HBsAg Pos	Parámetros
Sarda	500	CMIA	<0.01%	E:100%
Piñero	883	ECLIA	0.1%	E:99.8%,S:100%
Muñiz	523 (S y PD)	CMIA	7%	E 100% S (PD) 91.2% S (suero) 97% VPP(suero y PD)100% VPN (PD) 99.4% VPN (suero) 99,8% Eficiencia (PD) 99.4%

Validación en muestras clínicas del TR para detección de HBsAg en poblaciones con distinta prevalencia para HBV.

- ❑ Los falsos negativos fueron 1 para el TR en suero y 3 para el TR por punción digital.
- ❑ La concordancia entre operadores fue del 100%.
- ❑ En los resultados inválidos el motivo detectado fue escasa muestra.

Resumen final I

- Baja sensibilidad analítica.
- Reducida sensibilidad a mutantes y a paneles de seroconversion.
- Es importante dentro de la heterogeneidad realizar estudios de validación en los distintos escenarios en donde se los piense implementar.
- Es importante la evaluación del impacto de la inclusión de los mismos en lo que se refiere a su derivación o centros de atención o de vacunación.

HCV: Razones para ampliar el diagnóstico

- Mejorar el diagnóstico en el contexto de nuevos y potentes regímenes libres de interferón que han demostrado ser bien tolerados y con un mínimo de efectos adversos.
- Evitar la diseminación de la infección.
- Reducir el riesgo a largo plazo de las complicaciones de la enfermedad hepática crónica.
- 2011 FDA aprobó OraQuick para individuos >15 años con riesgo de infección o personas con signos y síntomas de hepatitis. Este ensayo fue evaluado en saliva, sangre entera por punción venosa, plasma, suero y sangre entera por punción digital.

Precalificación: Resultados OMS

Ensayo	Matriz	Ag	Tpo	Requerimiento de equipamiento	Vol. de muestra	S	E	Tpo serconv.	Conservación
SD BIOLINE (RDT)	Suero, plasma, SE	Core, NS3,NS4 NS5	5 min	Si	5ul	100% (97.76 - 100%)	100% (98.85 - 100%)	+ 2 días	T amb.
Oral Quick (POC)	Suero, plasma, SE, PD,FO	Core, NS3,NS4	20 min	No	10ul	100% (97.8% - 100.0%)	99.7% (98.3 - 100.0%)	+2,75 días	2-8 C

Resultados inválidos: 0% para ambos ensayos. Variabilidad inter-operadores 0,09% para Oralquick.

Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis.

	POCT (SE)	POCT (So Plasma)	RDT (S o Plasma)	POCT (OF)
Sensibilidad (95%CI)	98.9% (94.5% - 99.8%)	98.9% (96.8% - 99.6%)	98.4% (88.9% - 99.8%)	97.1% (94.7% - 98.4%)
Especificidad (95%CI)	99.5% (97.5% - 99.9%)	99.7% (99.3% - 99.9%)	98.6% (94.9% - 9.6%)	98.2% (92.2% - 99.6%)

Prospective assessment of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus, a tool for improving access to care

S. Chevaliez^{1,2}, L. Poiteau^{1,2}, I. Rosa³, A. Soulier^{1,2}, F. Roudot-Thoraval^{2,4}, S. Laperche⁵, C. Hézode^{2,6} and J.-M. Pawlotsky^{1,2}

TABLE 1. Demographic and virological characteristics of the study population, including participants with chronic hepatitis C virus (HCV) infection (Group A), participants seropositive for HCV with resolved infection (Group B) and participants seronegative for HCV (Group C)

	Group A (n = 318)	Group B (n = 25)	Group C (n = 170)
Age (years), median (range)	56 (27–87)	62 (28–73)	41 (18–80)
Male gender, n (%)	202 (63.5)	14 (56.0)	69 (40.6)
Treatment-naïve, n (%)	300 (94.3)	12 (48.0)	NA
Anti-HCV antibodies signal/cutoff (mean ± SD)	27.0±4.3	27.8±5.3	0.1±0.1
HCV RNA level, mean ± SD [Log IU/mL]	5.80±0.80	<1.10	<1.10
HCV RNA >800 000 IU/mL, n (%)	156 (49.1)	0	0
HCV genotype, n (%)			
1	189 (60.4)	NA	NA
2	16 (5.1)	NA	NA
3a	40 (12.8)	NA	NA
4	61 (19.5)	NA	NA
5a	3 (0.9)	NA	NA
6	4 (1.3)	NA	NA

NA, not applicable.

TABLE 2. Performance of anti-hepatitis C virus antibody rapid diagnostic tests with fingerstick whole blood or oral fluid, using the enzyme immunoassay result in serum as the reference

	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	LR+	LR–
Fingerstick whole blood				
OraQuick [®] HCV Rapid Antibody Test	100% (97.9%–100%)	99.4% (97.9%–99.8%)	∞	0.006
Toyo [®] Anti-HCV Test	98.8% (95.8%–99.7%)	95.8% (93.0%–97.5%)	78.50	0.043
Labmen [®] HCV Test	100% (94.4%–100%)	63.1% (55.8%–69.8%)	∞	0.369
Oral fluid				
OraQuick [®] HCV Rapid Antibody Test	100% (97.9%–100%)	97.6 (95.4%–98.8%)	∞	0.024

HCV, hepatitis C virus; LR+, positive likelihood ratio; LR–, negative likelihood ratio.

Prospective assessment of rapid diagnostic tests for the detection of antibodies to hepatitis C virus, a tool for improving access to care

S. Chevaliez^{1,2}, L. Poiteau^{1,2}, I. Rosa³, A. Soulier^{1,2}, F. Roudot-Thoraval^{2,4}, S. Laperche⁵, C. Hézode^{2,6} and J.-M. Pawlotsky^{1,2}

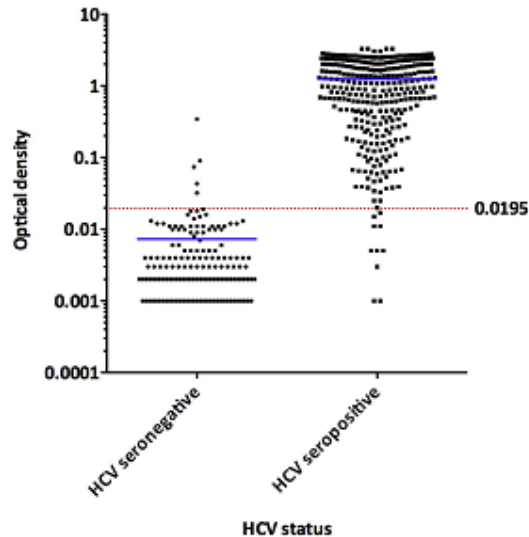


FIG. 1. Dot-plot of optical density values assessed with the third-generation enzyme immunoassay (Ortho[®] HCV 3.0 ELISA Test System with enhanced SAVE; Ortho-Clinical Diagnostics) in crevicular fluid according to the hepatitis C virus (HCV) status: HCV-seropositive patients (groups A and B) and HCV-seronegative individuals (group C).

Para determinar si los falsos negativos en el fluido crevicular se debían a la ausencia de Ac. En el mismo las 511 muestras fueron analizadas por un ELISA de tercera generación. Cutoff de corte estuvo asociado a una S y E del 97.1%.

Resumen final II

- La presencia de mayor número de falsos negativos en fluido crevicular puede explicarse sobre la diferencia entre este y el suero que puede ser hasta 5 veces menor.
- Pueden ser útiles en la expansión de la primera línea de tamizaje especialmente en poblaciones de alto y mediano riesgo para la infección por HCV pero es importante la evaluación de los tests antes de ser incluido en la práctica clínica.
- Es importante pensar circuitos atención en el contexto del resultado a centros de atención y confirmación de los resultados.

Muchísimas gracias

Luciana Tadey. Lilia Mammana . Daniela Ballester. Daniela Mercuri. Liliana Botto. Roxana Aquino. Laura Suarez. Joaquin Solari. Gabriela Vidiela. Sergio Maulen