

A comparison of two methods for detecting anti-HCV antibodies

Raffaella Vannucchi, Francesco Tonelli, Laura Boeri, Biancamaria Elmi, Ilaria Lucherini, Serena Galeassi, Annamaria Bertolani, Adolfo Moretti

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, USL 12, Versilia, Lido di Camaiore, Lucca, Italia

Introduction. In recent years so-called "third generation" tests, containing antigens of the NS5 region, have been introduced for the study and detection of anti-HCV antibodies. In this study, we compared doubtful and positive results obtained with Architect, a test lacking the NS5 antigen, with the results obtained using the AxSYM test that does contain NS5. Both tests are marketed by the Abbott company.

Materials and methods. Over the period of one year, we analysed 27,679 samples of serum (9,325 from donors and 18,354 from patients), using a microparticle enzyme immunoassay with fluorescent reading (AxSYM HCV-3.0) and a chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect anti-HCV).

Results. There were 1,138 samples positive for anti-HCV (6.20%), all of which were from patients. No donor was clearly positive. There were 394 samples (1.42%) with "doubtful" reactivity, including both those in the negative grey zone (0.70-0.99 S/CO) and the weakly reactive samples (1-3 S/CO), while there were 26,147 (94.97%) negative samples. The doubtful and positive samples were retested using the AxSYM system: the concordance between the two methods was 100% for the positive samples, while it was only 64.21% for the "doubtful" samples. The Architect test was more sensitive than the AxSYM, but less specific.

Conclusions. These data confirm that all the commercially available tests for HCV have a range of

Introduzione

Per determinare se un soggetto è venuto in contatto con il virus dell'epatite C (HCV), viene eseguito un test di screening per la ricerca degli anticorpi contro alcune proteine del virus^{1,2}. I primi test sono stati introdotti nella seconda metà del 1989 e usavano come antigene un peptide ricombinante della regione non strutturale NS4 del genoma putativo HCV (c100-3). Pur garantendo per la prima volta l'identificazione di reattività anticorpali specifiche in pazienti con epatite virale "non-A, non-B", questi test erano sia poco sensibili che poco specifici. Nel 1991, sono stati introdotti i test di seconda generazione che contenevano sia antigeni ricombinanti delle zone non strutturali NS3 e NS4 che antigeni strutturali della regione *core* di HCV, con aumento della specificità e, soprattutto, della sensibilità. Successivamente, sono stati introdotti i test cosiddetti di "terza generazione", nei quali era presente anche un antigene della regione NS5³.

In questo lavoro, partendo dal test di screening condotto su tutti i soggetti esaminati (pazienti e donatori) con un test privo di antigeni NS5, abbiamo voluto confrontare i casi dubbi o positivi ottenuti con un altro test, a cattura di microparticelle (MEIA), al fine di valutare il "peso" della proteina NS5 sugli indici di validità del test che la contiene rispetto a quello che ne è privo.

Materiali e metodi

Nel periodo 1 ottobre 2002-30 settembre 2003 sono stati eseguiti esami per la ricerca di anticorpi anti-HCV su 27.679 soggetti di cui 9.325 donatori e 18.354 pazienti (ospedalizzati e ambulatoriali).

Gli esami sono stati eseguiti con il test Architect anti-

Received: 9 May 2005 - Revision accepted: 30 September 2005

Correspondence:

Dott.ssa Raffaella Vannucchi

SIMT USL 12

Ospedale Versilia

Via Aurelia 335, Lido di Camaiore (LU) - Italia

E-mail: trasf.ospvg@usl12.toscana.it

doubtful values that are not confirmed by second level tests. Some hypotheses to explain these results are proposed.

Key words: HCV, screening, Architect, AxSYM

Introduction

In order to determine whether a subject has been infected by hepatitis C virus (HCV) a screening test to detect antibodies against some of the proteins of the virus can be carried out^{1,2}. The first of such tests were introduced in the second half of 1989 and used a recombinant peptide of a non-structural region, NS4, of the putative HCV genome (c100-3) as the antigen. Although these tests guaranteed, for the first time, identification of specific antibody reactivity in patients with "non-A, non-B" viral hepatitis, they were neither sensitive nor specific. In 1991, second generation tests were introduced that contained both recombinant antigens of the non-structural regions NS3 and NS4 and structural antigens of the core region of HCV, thus increasing the specificity and, above all, the sensitivity of the tests. Subsequently the so-called third generation tests, which also include an antigen from the NS5 region, were introduced³.

In this study, starting from the screening carried out on all the subjects (patients and donors) with a test lacking the NS5 antigen, we compared the results of samples that gave doubtful or positive outcomes with the results of another test, a microparticle enzyme immunoassay (MEIA), in order to evaluate the "weight" of the NS5 protein on the indices of validity of the test that contains this antigen compared to one that does not.

Materials and methods

In the period from October 1, 2002 to September 30, 2003 we carried out investigations to detect anti-HCV antibodies on samples from 27,679 subjects, of whom 9,325 were donors and 18,354 were in-patients or out-patients.

The investigations were carried out using the Architect anti-HCV test (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), a chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA)⁴ for the qualitative detection of antibodies against HCV. This assay has two stages: in the first stage paramagnetic beads coated with recombinant HCV antigens are mixed with the sample and the assay diluent. If specific antibodies are present in the serum, these bind to the coated beads. After washing, human anti-IgG, bound to acridine, is added

HCV (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), dosaggio immunologico in chemiluminescenza a cattura di microparticelle (CMIA)⁴ per la rilevazione qualitativa degli anticorpi contro il virus dell'epatite C. Il saggio si articola in 2 fasi: la prima, durante la quale si dispensano, insieme il campione, le particelle paramagnetiche rivestite di antigeni ricombinanti-HCV e il diluente del dosaggio. Se sono presenti anticorpi specifici nel siero, questi si legano alle microparticelle. Dopo il lavaggio, si aggiungono anti-IgG umane legate ad acridinio e, dopo un secondo lavaggio, il *pre-trigger* (preattivazione) e il *trigger* (attivazione) fanno avvenire la reazione chemiluminescente, che viene misurata in unità di luce relativa (RLU) ed è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi presenti nel campione.

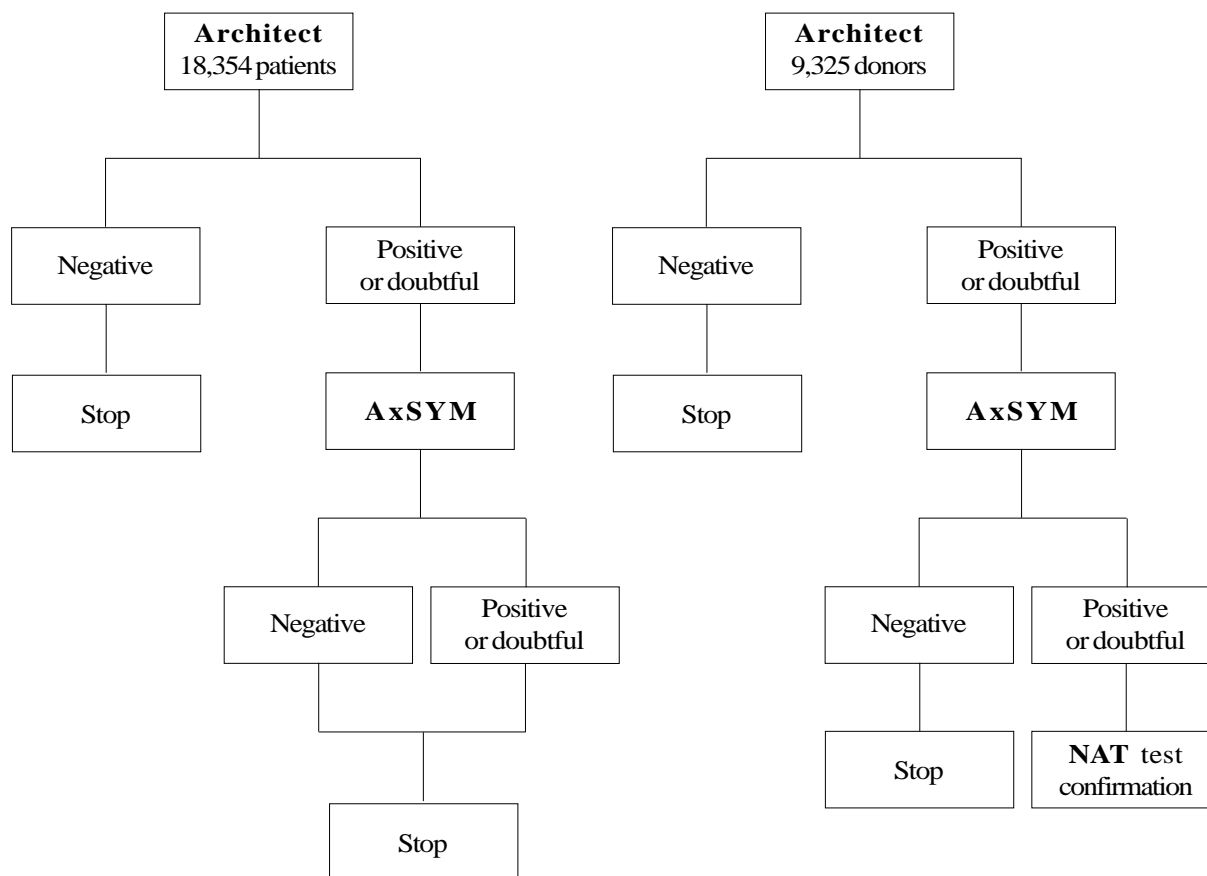
Il dosaggio Architect rivela anticorpi diretti contro le proteine strutturali e non, del genoma HCV. Tali proteine sono, più esattamente, le seguenti. 1) La proteina HC-43 espressa in *Escherichia coli*, che rappresenta due zone non contigue del genoma HCV. La prima regione rappresenta gli amminoacidi (AA) da 1.192 a 1.457. La seconda riguarda gli AA da 1 a 150. Si ritiene che la prima regione rappresenti la proteina NS3, mentre la seconda il *core* virale. 2) C100-3 è una proteina ricombinante espressa in *Saccharomyces cerevisiae* (lievito) e si ritiene rappresentare le zone non strutturali NS3 e NS4 di HCV.

I campioni risultati positivi o dubbi, con un valore, cioè, compreso nella zona grigia (valori tra 0,70 e 3,00, con un *cut-off* di 1,00), sono stati successivamente analizzati con il test AxSYM HCV 3.0 (Abbott Laboratories), dosaggio immunoenzimatico a cattura di microparticelle (MEIA), anch'esso per la rivelazione qualitativa degli anticorpi anti-HCV.

La zona grigia è stata scelta sia per AxSYM che per Architect così ampia perché, secondo la nostra esperienza, i campioni con un valore fino a 3.00 S/CO risultano negativi al test di conferma (InnoLia HCV Ab III update, Innogenetics, Gent, Belgio).

HCV AxSYM, versione 3.0, utilizza antigeni fissati su microparticelle di polistirene in modo da consentire il legame con l'anticorpo complementare, che viene, poi, rilevato attraverso una serie di reazione antigene-anticorpo. Nella reazione finale del dosaggio AxSYM, un anticorpo coniugato ad un enzima catalizza la trasformazione del substrato, dando luogo ad un prodotto finale fluorescente. La fluorescenza viene misurata e risulta proporzionale alla quantità di anticorpi presenti nel siero.

HCV AxSYM versione 3.0 contiene, come antigeni virali, HC r43 (proteina ricombinante del virus HCV espressa in



Algorithm 1 - Study design

and then, after a second wash, the *pre-trigger* (preactivation) and the *trigger* (activation) make the chemiluminescent reaction occur. This reaction is measured in Relative Light Units (RLU) and is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample.

The Architect assay measures antibodies to structural and non-structural proteins of the HCV genome. These proteins are: 1) protein HC-43, expressed in *Escherichia coli*, which represents two non-contiguous regions of the HCV genome. The first region comprises the amino acids from 1,192 to 1,457, while the second region comprises the amino acids from 1 to 150. It is thought that the first region represents the NS3 protein, while the second is the viral core. 2) C100-3, a recombinant protein expressed by *Saccharomyces cerevisiae* (yeast), which is thought to represent the NS3 and NS4 non-structural areas of HCV.

The samples that were doubtful or positive, that is with values in the grey zone (between 0.70 and 3.00, with a cut-off of 1.00), were subsequently analysed with the AxSYM HCV 3.0 test (Abbott Laboratories), a microparticle enzyme

E.coli, analoga a quella utilizzata nel test Architect) e tre antigeni espressi in *Saccharomyces cerevisiae*: 1) C200: proteina ricombinante C200 di HCV che rappresenta le regioni NS3 e NS4; 2) C100-3, contenente le proteine non strutturali NS3 NS4; 3) NS5, antigene complesso (oltre 900 AA) con funzione di RNA polimerasi.

Sui campioni di donatori reattivi per anti-HCV è stato anche effettuato un test supplementare per anti-HCV (InnoLia HCV Ab III update) e condotta la ricerca qualitativa di HCV-RNA mediante NAT (*Nucleic Acid Amplification Technology*) con test Roche Ampliscreen (Roche Molecular System, Branchburg, NJ, USA).

Per sintesi, illustriamo il progetto di studio nel diagramma di flusso riportato nell'algoritmo 1.

Risultati

Sono stati esaminati 18.354 pazienti; 1.138 pari a 6.20% sono risultati positivi per anticorpi anti-HCV ed i risultati sono concordi su entrambi i test di screening.

immunoassay (MEIA), which is another test used for the qualitative detection of anti-HCV antibodies. A wide grey zone was chosen for both the AxSYM and the Architect tests, because, in our experience, samples with a value up to 3.00 S/CO are negative in confirmatory tests (InnoLia HCV Ab III update, Innogenetics, Ghent, Belgium).

HCV AxSYM, version 3.0, uses antigens fixed on polystyrene microparticles in order to allow binding with the complementary antibody, which is then detected through a series of antigen-antibody reactions. In the final reaction of the AxSYM assay, an antibody conjugated to an enzyme catalyses the transformation of a substrate, giving rise to a fluorescent end product. The fluorescence is measured and is proportional to the amount of antibodies present in the serum.

The viral antigens contained in HCV AxSYM version 3.0 are HC r43 (a recombinant HCV protein expressed in *E. coli*, analogous to the one used in the Architect test) and three antigens expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: 1) C200, a recombinant C200 protein of HCV which represents the NS3 and NS4 regions; 2) C100-3, containing the NS3 and NS4 non-structural proteins; 3) NS5, a complex antigen (of more than 900 amino acids) which has RNA polymerase function.

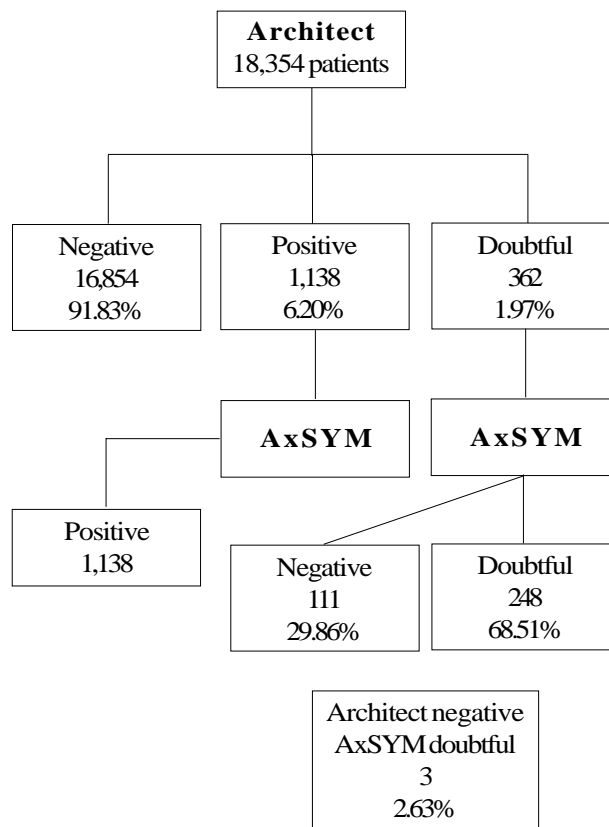
The samples that were reactive for anti-HCV were also tested with a supplementary test for anti-HCV (InnoLia HCV Ab III update) and a qualitative search for HCV-RNA was carried out using nucleic acid amplification technology (NAT) with the Roche Ampliscreen test (Roche Molecular System, Branchburg, NJ, USA).

For clarity, the design of the study is shown in the flow diagram reported in algorithm 1.

Results

Of the 18,354 patients investigated, 1,138 (6.20%) were positive for anti-HCV antibodies and the results from both screening tests were concordant, 16,854 (91.83%) were negative, while the results were doubtful in 362 cases (1.97%) (algorithm 2).

The algorithm shows the results of the samples analysed with Architect that gave doubtful results; when testing was repeated with the AxSYM, the results were concordant for 248 samples (68.51%) and discordant for 114 (31.49%). In detail, of the 114 discordant results, 111 (97.36%) were classified as doubtful by Architect and negative by AxSYM and only 3 (2.63%), considered doubtful in our historical archive with AxSYM, were negative according to the Architect test.



Algorithm 2 - Results in patients

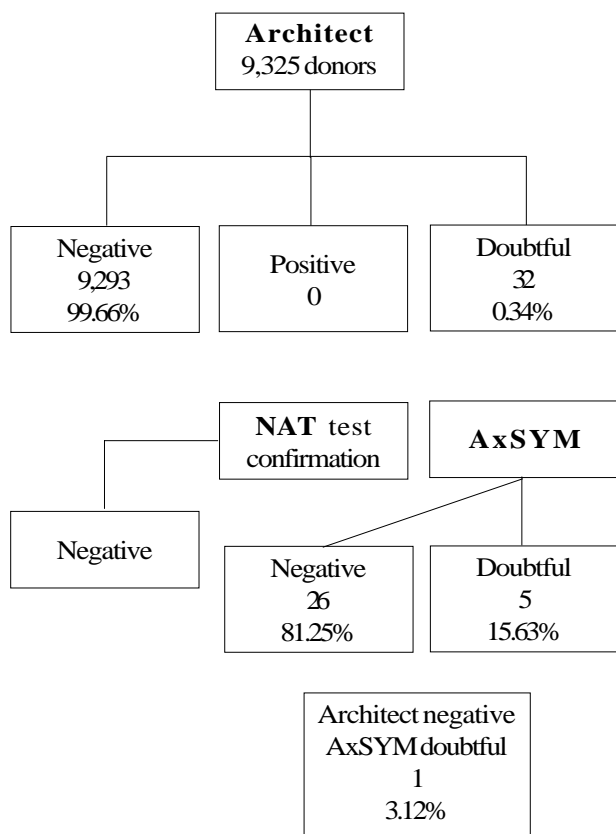
I negativi sono stati 16.854 (91,83%), mentre i risultati dubbi sono 362 pari al 1,97% (Algoritmo 2).

Nell'algoritmo vengono analizzati i campioni dei pazienti con risultato dubbio su Architect e che, ripetuti su AxSYM, hanno dato un valore concorde su 248 campioni (68,51%) e discorde su 114 (31,49%).

In particolare, dei 114 risultati discordanti, 111, pari al 97,36% sono stati classificati come dubbi su Architect e negativi su AxSYM e soltanto 3, pari al 2,63%, conosciuti come dubbi sul nostro archivio storico con AxSYM, sono risultati negativi con Architect.

Da questi dati risulta una concordanza totale tra i due strumenti per quanto riguarda i pazienti positivi, ma una grande differenza tra i pazienti compresi nella zona grigia. Inoltre, su 14 (10,22%) pazienti risultati dubbi con Architect e negativi con AxSYM è stata ripetuta la ricerca di anticorpi anti-HCV dopo un periodo variabile fra sei mesi e un anno senza alcuna modifica dei risultati, a dimostrazione che non si trattava di casi di infezione iniziale da HCV.

È stata esaminata anche un'altra categoria di soggetti, quella dei donatori, dove abbiamo ottenuto risultati diversi da quelli dei pazienti, dato che si tratta di soggetti a minor rischio di esposizione al virus HCV.



Algorithm 3 - Results in donors

These data demonstrate a complete concordance between the two instruments as far as regards positive patients, but a large difference for patients in the grey zone. Furthermore, on 14 (10.22%) patients, with doubtful results according to Architect and negative results with AxSYM, the search for anti-HCV antibodies was repeated after a period ranging from six months to one year; there were no changes in the results, demonstrating that these were not patients with initial HCV infection.

Another category of subjects, in this case donors, was also examined. The results in these subjects differed from those in the patients, since donors have a lower risk of exposure to HCV.

Algorithm 3 illustrates that 9,325 donors were examined: none was found to be positive for anti-HCV antibodies. There were 32 (0.34%) doubtful cases and 9,293 (99.66%) negative results. As regards the 32 doubtful cases, the two instruments (Architect and AxSYM) gave concordant results for 5 (15.63%), but discordant results for 27 (84.38%): of these, 26 (81.25%) were doubtful with Architect and negative with AxSYM, while one, already recognised in our historical archive as a doubtful case by AxSYM, gave a negative result with Architect.

Come si può evincere dall'algoritmo 3, i donatori esaminati sono 9.325, di cui nessuno è risultato positivo per anticorpi anti-HCV; i dubbi sono risultati 32 (0,34%), mentre i negativi sono 9.293 (99,66%). Tra i risultati dubbi, 5 (15,63%) hanno fornito un risultato concordante con i due strumenti (Architect e AxSYM), ma per 27 (84,38%) i risultati sono discordi: 26 (81,25%) sono dubbi su Architect e negativi su AxSYM, mentre uno, già conosciuto nel nostro archivio storico come dubbio AxSYM, dà esito negativo per Architect.

Sui campioni dei donatori risultati reattivi dubbi è stato eseguito il test di conferma InnoLia HCV, contenente i seguenti antigeni: 2 derivanti dalla regione del *core*, uno dalla regione E2, uno dalla regione NS3, uno dalla regione NS4, uno dalla regione NS5: nessun campione è risultato positivo. Sui donatori è stata eseguita anche la ricerca qualitativa di HCV RNA mediante NAT (*Nucleic Acid Amplification Technology*) con test Roche Ampliscreen: tutti sono risultati negativi.

Discussione e conclusioni

Nel corso degli anni si è assistito a un progressivo miglioramento dei test commerciali per anti-HCV, in ragione dei continui progressi delle conoscenze in questo campo e del conseguente adeguamento operato dalle aziende produttrici. Il miglioramento più rilevante si è avuto passando dai test di prima generazione, disponibili nel 1989, a quelli di seconda generazione, approntati e messi in commercio nel 1991. La successiva introduzione dei test cosiddetti di "terza generazione", più che migliorare la sensibilità con l'aggiunta di un nuovo antigene (NS5), aveva come scopo di incrementare la specificità, soprattutto nelle popolazioni a bassa prevalenza, come i donatori volontari di sangue, nei quali spesso erano presenti, con i test di seconda generazione, delle reattività aspecifiche a basso livello, non confermate con i test supplementari (RIBA e HCV-RNA). L'eventuale maggiore sensibilità dei test di "terza generazione" non è da ascrivere all'inclusione dell'antigene NS5, ma ad una migliore formulazione e rappresentazione degli antigeni maggiori Core e NS3⁵. A questo proposito, due studi europei su casistiche rappresentative hanno permesso di valutare la assoluta aspecificità delle reattività isolate per anti-NS5, che non è mai risultata associata con una infezione in atto da HCV^{6,7}. Dal punto di vista delle norme regolamentari, ricordiamo, a titolo di esempio, che a tutt'oggi negli USA sono stati validati dalla FDA, e vengono impiegati, per lo screening su popolazioni a rischio e sulle donazioni, sia i test di

The samples that gave doubtful results were tested again with the InnoLia HCV test containing two antigens deriving from the core region, one antigen from the E2 region, one from the NS3 region, one from the NS4 region, and one from the NS5 region: none of the samples was positive. A qualitative search for HCV RNA was also performed with nucleic acid amplification technology (NAT) using the Roche Ampliscreen test: all samples were negative.

Discussion and conclusions

Over the years there has been a progressive improvement in the commercially available tests for detecting antibodies to HCV, reflecting the continuing increase in knowledge in this field and the consequent adaptations made by the manufacturing sector. The most relevant improvement came with the passage from first generation tests, available in 1989, to second generation tests, prepared and marketed in 1991. The subsequently introduced "third generation" tests were not particularly intended to improve the sensitivity of the tests by adding a new antigen (NS5), but rather to increase their specificity, particular in populations with a low prevalence of the infection, such as voluntary blood donors, in whom non-specific weak reactivity was often found with second generation tests, but not confirmed by later supplementary tests (RIBA and HCV-RNA). Any greater sensitivity of the third-generation tests is not to be attributed to the inclusion of the NS5 antigen, but rather to a better formulation and representation of the major core and NS3 antigens⁵. In this regard, two European studies on representative series showed the absolute non-specificity of isolated reactivity for anti-NS5, which has never been found to be associated with an ongoing HCV infection^{6,7}. From the point of view of regulatory standards, it should be noted that both second and third generation tests have been validated, for example in the USA by the FDA, and are still used for screening "at risk" populations and donations. Indeed, the choice of test to use in screening must take into account not only the intrinsic analytic characteristics of the reagent (sensitivity, specificity), but also the particular organisational characteristics of the centre or centres intending to use it, especially in terms of safety of the pre- and post-analytic procedures, which are the source of much greater error than the true analytical variation.

In this investigation, we compared the results of tests to detect HCV carried out, using two methods and two

"seconda generazione" che quelli di "terza generazione". La scelta del test da impiegare nello screening deve tener conto, oltre che delle caratteristiche analitiche intrinseche del reagente (sensibilità, specificità), anche delle caratteristiche organizzative peculiari del o dei Centri utilizzatori, soprattutto in termini di sicurezza delle procedure pre- e post-analitiche, che rappresentano una fonte di errore molto superiore rispetto alle variabili analitiche propriamente dette.

In questa indagine, abbiamo voluto confrontare i risultati per l'esame HCV ottenuti con due metodi e due strumenti diversi: metodo MEIA su AxSYM e metodo in chemiluminescenza su Architect. Dal nostro studio, eseguito su di una popolazione mista (donatori sani, pazienti esterni e ospedalizzati), si è riscontrata una frequenza di positività per anticorpi anti-HCV nella popolazione "diagnostica" della zona della Versilia del 6,20%. Questo dato è in sostanziale accordo con quelli riportati in altri studi, secondo i quali in Italia ci sarebbe una positività compresa tra il 3,2% nel Nord, che aumenta sino al 12,6% nel Sud⁸.

La percentuale di positività cambia se si vanno ad analizzare i soli donatori e questo perché si tratta di una popolazione selezionata, sana e senza fattori di rischio. Infatti, in questo caso, non si sono riscontrate positività, mentre la percentuale di dubbi è 0,34%. Di questi ultimi, 26 (0,28%) hanno mostrato un segnale superiore al *cutoff*, per una specificità risultante del test Architect anti-HCV del 99,72% (IC al 95%: 99,61%-99,83%). Tra i pazienti, la specificità del test di screening non può essere calcolata, dato che non è stato effettuato il test supplementare sui campioni reattivi.

L'Architect è uno strumento che permette di eseguire un carico di lavoro più elevato rispetto all'AxSYM, necessitando, al contempo, una manutenzione minore. Inoltre, le reazioni in chemiluminescenza richiedono anche un minor numero di passaggi e nessuna molecola amplificante. L'Architect rappresenta, quindi, una significativa evoluzione rispetto all'AxSYM, consentendo una notevole riduzione dei tempi di analisi. Per quanto riguarda la determinazione di anti-HCV con Architect, si è presentato il problema dei "falsi positivi" nella popolazione diagnostica. I campioni positivi con un'alta intensità di segnale (S/CO) danno lo stesso risultato sui due strumenti e, come riportato in letteratura, risultano positivi ai test di conferma RIBA o con le reazioni di amplificazione per HCV RNA^{4,9}. Sui campioni con bassa intensità di segnale, si è, invece, ottenuta una discordanza del 35,79% tra i due test di screening; questi campioni, in base ai dati di letteratura, sono generalmente negativi sia con i test supplementari sia con la PCR HCV RNA. Si può, quindi, concludere, in

different instruments: the MEIA method on AxSYM and the chemiluminescence method on Architect. Our study, carried out on a mixed population (healthy donors, outpatients and inpatients) showed a 6.20% frequency of positivity for anti-HCV antibodies in the "diagnostic" population of the area of Versilia. This frequency is in line with the reported results of other studies, according to which the rate of positivity in Italy ranges from 3.2% in the north of the country to 12.6% in the south⁸.

The percentage of positivity changes when only donors are analysed, because these form a selected, healthy population without risk factors. In fact, no positive cases were found among this population, while the percentage of doubtful cases was 0.34%. Of these latter cases, 26 (0.28%) showed a value higher than that of the cut-off, giving the anti-HCV Architect test a specificity of 99.72% (95% CI: 99.61%-99.83%). The specificity of the screening test among patients could not be calculated, given that supplementary tests were not performed on the reactive samples.

Architect is an instrument that supports a higher workload than AxSYM, and at the same time requires less maintenance. Furthermore, the chemiluminescence reactions involve fewer passages and do not require an amplifying molecule. Architect, therefore, represents a significant evolution with respect to AxSYM, by considerably shortening analysis times. As far as concerns the determination of anti-HCV with Architect, there was the problem of "false positives" in the diagnostic population. The positive samples with a high signal intensity (S/CO) gave the same result on the two instruments and, as reported in the literature, were confirmed to be positive with the RIBA test or with HCV RNA amplification reactions^{4,9}. On the other hand, for samples with a low intensity signal, there was a discordance of 35.79% between the two screening tests; according to literature reports, these samples are usually negative both with supplementary tests and with PCR HCV RNA. It can, therefore, be concluded, in accordance with recent recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta¹⁰, that the confirmation test is valid for samples giving a doubtful result with a low S/CO value in the screening test, but is not useful for samples with high S/CO values. Furthermore, HCV RNA PCR should only be carried out on samples with high S/CO values at screening, as reported by other Authors^{11,12}.

Some hypotheses can be suggested to explain the higher frequency of "false positives" among patients than among donors. First, differences in instruments and/or

accordo con recenti raccomandazioni dei CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) di Atlanta¹⁰, che il test di conferma è valido per quei campioni che risultano indeterminati con basso valore S/CO al test di screening, ma è inutile per i campioni con alti valori di S/CO. Inoltre, la PCR HCV RNA dovrebbe essere eseguita solo nei pazienti con alti valori di S/CO allo screening, come riportato da altri Autori^{11,12}.

Si possono prospettare alcune ipotesi per spiegare la maggiore frequenza di "false positività" nei pazienti rispetto ai donatori. Occorre, anzitutto, escludere variabili strumentali e/o legate a differenti lotti di reagenti (nel nostro Centro sono in uso, per l'analisi delle diverse popolazioni, lo stesso sistema e gli stessi lotti).

La soluzione del quesito è, a nostro avviso, legata essenzialmente alla popolazione in esame.

Una prima ipotesi potrebbe far ascrivere la quota di false reattività a un incremento di gammaglobuline (per esempio, in soggetti provenienti da aree ad elevata endemia per varie malattie infettive, come l'Africa, oppure in pazienti affetti da mieloma), ovvero a malattie autoimmuni (fattore reumatoide, collagenasi, epatite autoimmune), o ad una cross-reattività con altre infezioni da Flavivirus, che sono, peraltro, rare alle nostre latitudini.

Una seconda ipotesi prende in considerazione alcune recenti segnalazioni^{8,13,14}, in base alle quali una percentuale abbastanza elevata di soggetti con positività accertata per anti-HCV andrebbe incontro a negativizzazione dopo alcuni anni. In altre parole, nella popolazione generale, molti soggetti venuti a contatto con il virus, non svilupperebbero una malattia cronica, ma sarebbero in grado di eliminare il virus (cosa dimostrata dalla negativizzazione anche per HCV-RNA) e anche gli anticorpi. Date le frequenze segnalate in studi italiani recenti (oltre il 17% di negativizzazione in 10 anni^{8,13} questa ipotesi, se confermata, giustificherebbe la presenza di reattività deboli, generalmente non confermate con test di secondo livello, riscontrabili soprattutto con test maggiormente sensibili, come appare essere il test Architect.

L'Architect HCV risulta essere più sensibile, mentre l'AxSYM HCV risulta essere un test più specifico, anche se, comunque, è presente sempre una fascia di valori dubbi, come del resto con tutti i test attualmente in commercio per HCV¹⁵⁻¹⁷. I nostri dati confermano che non esiste attualmente un test unico di riferimento per anticorpi anti-HCV, ma che i risultati ottenuti con i test di prima istanza devono essere valutati, in caso di reattività debole, sia con l'ausilio di altri strumenti diagnostici che in riferimento alla popolazione analizzata.

reagents should be excluded (in our Centre we used the same instruments and the same batches of reagents to analyse the different populations).

We believe that the explanation of the difference is basically linked to the population under investigation.

One hypothesis links the proportion of false reactivity to an increase in gammaglobulins (for example, in subjects from areas in which various infectious diseases are endemic, such as Africa, or in patients with myeloma), or to autoimmune diseases (rheumatoid factor, collagen disorders, autoimmune hepatitis), or to cross-reactivity with other Flavivirus infections, although these are rare at our latitude.

A second hypothesis has arisen from some recent reports^{8,13,14} that a fairly large proportion of subjects with known positivity for anti-HCV become negative after some years. In other words, in the general population many subjects come into contact with the virus, but do not develop a chronic disease; rather, they eliminate both the virus (as also shown by the negativisation for HCV-RNA) and the antibodies to it. Given the frequencies reported in one recent Italian study (more than 17% of positive patients became negative in 10 years^{8,13}), this hypothesis, if confirmed, would explain the presence of weak reactivity, not normally confirmed by a second level test, found particularly when more sensitive tests, as Architect seems to be, are used. Architect HCV is more sensitive than AxSYM HCV, while this latter is a more specific test. Nevertheless, this and all other currently available commercial tests for HCV always have a range of doubtful values¹⁵⁻¹⁷. Our data confirm that there is not a single reference test for anti-HCV antibodies, but that the results obtained with screening tests must be evaluated, in the case of weak reactivity, both with the help of auxiliary diagnostic instruments and with reference to the population being analysed.

Riassunto

Introduzione. In questi ultimi anni sono stati introdotti, per lo studio e la ricerca degli anticorpi anti-HCV, test "terza generazione", nei quali sono presenti antigeni della regione NS5. In questo lavoro abbiamo confrontato i risultati dubbi e positivi su Architect, test privo di antigene NS5, con quelli ottenuti impiegando il test AxSYM contenente NS5, entrambi commercializzati dalla ditta Abbott.

Materiali e metodi. Nell'arco di un anno, abbiamo analizzato 27.679 sieri (9.325 donatori e 18.354 pazienti), impiegando un test immunoenzimatico a cattura di microparticelle con rilevazione fluorescente (AxSYM HCV-3.0) e un test immunoenzimatico in chemiluminescenza (Architect anti-HCV).

Risultati. I campioni positivi per anti-HCV sono stati 1.138 (6,20%), esclusivamente tra i pazienti mentre nessun donatore è risultato francamente positivo. I campioni con reattività "dubbia", comprendenti sia la zona grigia negativa (0,70-0,99 S/CO) che le reattività deboli (1-3 S/CO) sono stati 394 (1,42%), mentre i campioni negativi sono stati 26.147 (94,97%). I campioni dubbi ed i positivi sono stati ripetuti su AxSYM e si è osservata una assoluta concordanza tra le due metodiche sui campioni positivi, mentre sui "dubbi" la concordanza è stata solamente del 64,21%. Il test Architect è risultato più sensibile del test AxSYM, ma meno specifico.

Conclusioni. I dati confermano che tutti i test in commercio per HCV hanno una fascia di valori dubbi che non risultano confermati da test di secondo livello. Vengono proposte alcune ipotesi per spiegare questi risultati.

Parole chiave: HCV, screening, Architect, AxSYM

References

- 1) Alberti A, Benvegnù L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003; **38**:104-18.
- 2) Dufour R, Lott JA, Nolte FS, et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Chemistry* 2000; **46**: 2027-49.
- 3) Colin C, Landor D, Toupet S, et al. Sensitivity and specificity of third generation hepatitis C virus antibody detection assay: an analysis of literature. *J Viral Hepat* 2001; **8**:87-95.
- 4) Dufour DR, Talastas M, Fernandez MDA, Harris B. Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis C antibody detection. *Clin Chem* 2003; **49**: 940-4.
- 5) Couroucè A-M. Development of screening and confirmation tests for antibodies to hepatitis C virus. *Curr Stud Hematol Blood Transf* 1998; **62**: 64-72.
- 6) Dow BC, Buchanan I, Munro H, et al. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. *J Med Virol* 1996; **49**:132-7.
- 7) Lemaire, JM, Couroucè AM, Defer C, et al. HCV RNA in blood donors with isolated reactivities by third-generation RIBA. *Transfusion* 2000; **40**: 867-70.
- 8) Mazzeo C, Azzaroli F, Giovanelli S, et al. Ten years incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut* 2003; **52**:1030-4.
- 9) Goubau P, Reynders M, Selinck K, et al. Confirmatory strategy of hepatitis C serology based on two screening assays in a diagnostic setting. *Acta Clin Belg* 1997; **52**:31-5.
- 10) Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and results reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR* 2003; **52**(RR-3): 1-15
- 11) Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002; **36**: 565-73.
- 12) Vrielink H, Reesink MW, Van Den Berg, et al. Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion* 1997; **37**: 845-9.
- 13) Kondili LA, Chionne P, Costantino A, et al. Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population. *Gut* 2002; **50**: 693-6.
- 14) Lefrere JJ, Girot R, Lefrere F, et al. Complete or partial seroconversion in immunocompetent individuals after self-limited HCV infection: consequences for transfusion. *Transfusion* 2004; **44**: 343-8.
- 15) Hamid MA, El Daly M, El Kafrawy S, et al. Comparison of second and third generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1656-9.
- 16) Dufour DR, Talastas M, Fernandez MDA, et al. Low positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin Chem* 2003; **49**: 479-86.
- 17) Kiely P, Kay D, Parker S, Piscitelli S. The significance of third-generation HCV RIBA indeterminate, RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. *Transfusion* 2004; **44**: 349-58.