

Diagnóstico del virus de la hepatitis C mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa

Diagnosis of hepatitis C virus infection by qualitative polymerase chain reaction

María Teresa Martínez, Raúl Pablo Ferreira Capote, Isis Amores Sánchez, Amarilys Martínez Piedra, Rita Rosa Santana Hernández, Ángela Rosa Gutiérrez Rojas, Gissel García Menéndez

Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: evaluar el comportamiento de la infección por el virus de la hepatitis C en los pacientes remitidos al Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras".

Métodos: estudio descriptivo de corte transversal en el período comprendido de 2004 a 2012. Se estudiaron 4 026 pacientes provenientes de las consultas de Gastroenterología, Hemodiálisis y Trasplante del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". El diagnóstico de la infección se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa UMELOSA HCV.

Resultados: la prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C aumentó con el tiempo, y no mostró diferencias estadísticamente significativas asociadas al sexo y la edad. Las coinfecciones por los virus virus de la hepatitis B y de la inmunodeficiencia adquirida no fueron significativas en los pacientes (0,2 % y 0,04 %, respectivamente), así como una baja positividad en gestantes.

Conclusiones: los métodos moleculares constituyen una herramienta certera para el diagnóstico clínico del virus de la hepatitis C, independientemente del servicio que remita al paciente. Contar con su aplicación en la institución donde se realizó el estudio reviste gran importancia para el sistema de salud de Cuba.

Palabras clave: HCV; epidemiología; PCR.

ABSTRACT

Objective: evaluate the behavior of hepatitis C virus infection in patients referred to the Molecular Genetics Laboratory at Hermanos Ameijeiras Clinical Surgical Hospital.

Methods: a descriptive cross-sectional study was conducted in the period 2004-2012 of 4 026 patients from the gastroenterology, hemodialysis and transplant services at Hermanos Ameijeiras Clinical Surgical Hospital. Infection was diagnosed by qualitative UMELOSA HCV polymerase chain reaction.

Results: prevalence of hepatitis C virus infection increased with time and did not show any statistically significant differences related to sex and age. Coinfection by hepatitis B virus and acquired immunodeficiency was not significant among the patients (0.2 % and 0.04 %, respectively), and positivity was low among pregnant women.

Conclusions: molecular methods are an accurate tool for the clinical diagnosis of hepatitis C virus, regardless of the service referring the patient. The possibility of its use at the institution where the study was conducted is very important for the Cuban health system.

Keywords: HCV; epidemiology; PCR.

INTRODUCCION

El virus de la hepatitis C (VHC), desde su descubrimiento en 1989, ha sido reconocido como un serio problema de salud a nivel mundial. Se estima que el VHC infecta cada año de 3 a 4 millones de personas y que anualmente mueren de 350 000 a 500 000 personas por enfermedades hepáticas relacionadas con el virus. En la actualidad representa la causa más frecuente de enfermedad hepática crónica, cirrosis y trasplante hepático. Se le conoce, además, por ser el responsable de múltiples manifestaciones extrahepáticas y un factor de riesgo importante para el carcinoma hepatocelular.¹⁻³

La vía parenteral es, al parecer, la principal vía de transmisión de este virus.⁴ La mayor prevalencia de anticuerpos contra el VHC se observa entre los usuarios de drogas por vía parenteral, hemofílicos (70 a 90 %) y hemodializados (10-90 %), y es menor entre heterosexuales con múltiples compañeros sexuales, hombres que tienen sexo con hombres, prestadores de servicios de salud y contactos familiares con personas infectadas (1-5 %).^{2,3,5}

La prevalencia del virus varía por región, siendo las regiones de más baja prevalencia el norte y occidente de Europa, América y Australia y las de mayor prevalencia el centro y este de Asia y África.⁵ Su incidencia ha disminuido al 1 por 100 000 en países desarrollados.^{6,7} Sin embargo, la determinación de la verdadera incidencia de la infección por el VHC resulta difícil, pues la mayoría de las infecciones agudas son asintomáticas; los ensayos disponibles no distinguen entre infección aguda, crónica o resuelta; y la mayoría de países no recolectan información sobre los casos emergentes.⁸

Las pruebas serológicas de detección de anticuerpos contra el VHC y las pruebas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *del inglés Polymerase Chain Reaction*) son los métodos eficaces de diagnóstico de esta infección. Las primeras tienen la limitante de no diferenciar la infección activa y presentar resultados falsos negativos en pacientes inmunodeprimidos.⁹ Las pruebas moleculares, por su parte, permiten detectar, cuantificar y caracterizar el ARN viral y tienen la ventaja de indicar una infección activa.^{10,11}

En Cuba, actualmente se conoce que en las unidades de diálisis este virus tiene una elevada tasa de incidencia y de prevalencia, pero su diseminación en la población asintomática se desconoce. Es por ello que se hace necesario evaluar el comportamiento de la infección por el VHC para poder reorganizar el trabajo y encaminar los recursos hacia los sectores más afectados.

Con este trabajo nos proponemos evaluar mediante el empleo de técnicas moleculares, el comportamiento de la infección por el VHC en los pacientes remitidos al Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras".

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. El universo fue de 4 030 pacientes, pero la muestra quedó constituida por 4 026 pacientes, 2 036 del sexo femenino y 1 990 del sexo masculino. Todos fueron remitidos al Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" por los servicios de Gastroenterología, Hemodiálisis y Trasplante, durante el período comprendido entre 2004 y 2012. Se excluyeron 4 pacientes que no tenían datos demográficos.

Los datos demográficos como edad, sexo, gestación (para el caso de las embarazadas), diagnóstico clínico y resultados de complementarios anteriores (serología para el VHB y el VIH) fueron referidos por el médico de consulta, en el orden de análisis. Se contemplaron dos grupos etarios, adultos y niños (menores de 18 años).

La sangre se colectó en tubos secos y se centrifugó a 3 000 rpm durante 20 min para colectar los sueros, los cuales se guardaron a -20 °C en dos alícuotas de 150 µL. La extracción del ARN viral se realizó mediante el método de fenol-cloroformo-tiocianato de Guanidinio según *Chomczynskj y Sacchi*.¹² A continuación, se realizó la técnica de PCR cualitativo UMELOSA HCV según *González-Pérez y otros*.¹³

Los datos se analizaron mediante el programa SPSS para Windows, versión 20.0. Para la caracterización de la muestra se empleó la estadística descriptiva, utilizando las frecuencias absolutas y relativas expresadas en porcentajes por tratarse de variables cualitativas. Para evaluar la asociación entre la infección por el VHC con otras variables de interés se confeccionaron tablas de contingencia y se emplearon pruebas estadísticas (Kruskal-Wallis). Se consideró que existe asociación entre estas variables cuando la probabilidad asociada fue menor que 0,05 ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

En general, del total de pacientes incluidos en el estudio, la frecuencia de pacientes infectados por el VHC fue ligeramente superior (1 623) a la de pacientes no infectados (2 403). En los datos reflejados en la tabla 1, se observan fluctuaciones en la positividad al VHC, de un año a otro, que pueden estar dadas por el total de pacientes remitidos al laboratorio. No obstante, del análisis de estos datos se obtiene un ligero incremento en la positividad al VHC, en el periodo estudiado, que se describe en la figura.

Tabla 1. Resultados del PCR del VHC en los años estudiados

Año	Positivos		Negativos		Total	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
2004	62	47,3	69	52,7	131	100
2005	40	49,4	41	50,6	81	100
2006	391	57,8	286	42,2	677	100
2007	549	61,3	347	38,7	896	100
2008	315	76,3	98	23,7	413	100
2009	346	69,9	149	30,1	495	100
2010	274	51,7	256	48,3	530	100
2011	330	53,7	285	46,3	615	100
2012	96	51,1	92	48,9	188	100

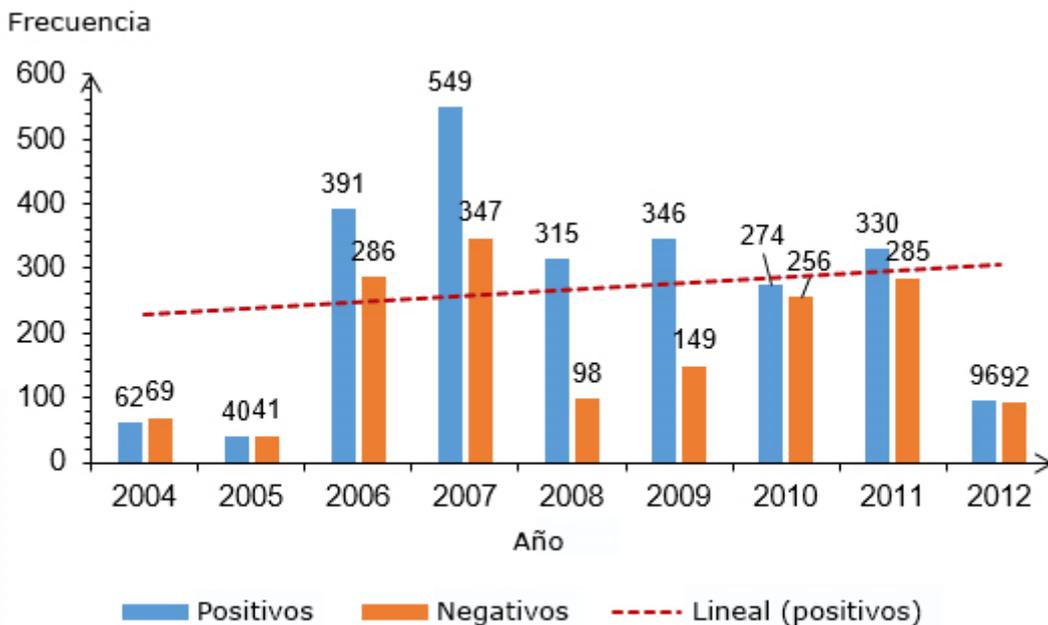


Fig. Comportamiento de la infección por el VHC en el periodo de estudio.

Al comparar los dos grupos etarios, adultos y niños, se observa que la frecuencia de adultos infectados fue mayor (98,6 %), que la frecuencia de niños infectados (1,4 %); pero dentro de cada grupo, la frecuencia de casos positivos es mayor que la de negativos (tabla 2).

Tabla 2. Resultados del PCR del VHC en los grupos etarios estudiados

Grupo etario	Positivos		Negativos		Total	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Niños	40	69,0	18	31,0	58	1,4
Adultos	2 363	59,6	1 605	40,4	3 968	98,6
Total	2 403	59,7%	1 623	40,3	4 026	100

El estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas asociadas con el sexo.

En la muestra estudiada, 4 pacientes (0,2 %) presentaron coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) y tan solo 2 (0,04 %) con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH).

En la presente investigación se encontró un 33,3 % de gestantes positivas al VHC, del total de gestantes estudiadas, lo que representa el 0,04 % del total de pacientes estudiados e infectados con el VHC.

Los valores de positividad para el VHC fueron similares para las tres consultas que remitieron pacientes (Gastroenterología 60,5 %, Trasplante 63,3 % y Hemodiálisis 56,7 %), no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($p= 0,11$), lo cual avala que más de la mitad de los pacientes que acuden a estos servicios con sospecha de enfermedad hepática por VHC, están realmente infectados. El comportamiento de la infección por el VHC en los pacientes trasplantados, de Hemodiálisis y los provenientes de la consulta de Gastroenterología que constituyen subgrupos de población con mayor riesgo mostró que del total de casos infectados (2 403), el 2,62 % correspondió a pacientes trasplantados; el 22,3 % a pacientes de hemodiálisis; y el mayor porcentaje (75,07 %) a los pacientes remitidos por la consulta de Gastroenterología.

DISCUSIÓN

El incremento de la positividad al VHC detectado en el periodo de estudio, se corresponde con lo observado a escala mundial, tanto en países desarrollados como Estados Unidos, España y Francia¹⁴ como en países de la región de Las Américas.^{15,16} En Cuba, las tasas de incidencia y prevalencia han ido en aumento desde 1992.^{17,18} No obstante, los estudios realizados muestran que la seroprevalencia de la infección es baja en la población general (0,6 a 1,9 %) ^{19,20} y en los donantes de sangre (0,7 a 0,8 %).¹⁹ La tasa de incidencia de la infección por VHC reportada en el año 2015 según el Anuario Estadístico de Salud es de 1,2 %.¹⁸ Esta tendencia creciente puede reflejar cambios en las prácticas de pruebas diagnósticas y en la mejora de la notificación en lugar de un aumento real de casos. Por otro lado, el número de casos notificados es una subestimación de la ocurrencia real de la hepatitis C debido a la naturaleza asintomática de la infección.²¹ Las fluctuaciones observadas pudieron deberse al número de pacientes remitidos al laboratorio.

Los niños incluidos en el estudio constituyen un grupo de alto riesgo, dado que fueron remitidos por los servicios de hemodiálisis de varios centros hospitalarios del país.²² En relación con los grupos etarios, nuestros resultados coinciden con lo reportado con anterioridad en nuestro país.²⁰ La frecuencia de niños con sospecha de hepatitis C (1,4 %) fue inferior a lo reportado en los países en vías de desarrollo,²³ pero superior a lo informado en los países desarrollados. No obstante, la frecuencia de positividad encontrada en los niños (69 %) es similar a la reportada en los países en vías de desarrollo.²⁴ Los altos valores de positividad encontrados dentro de cada grupo etario pudieran estar relacionados con el mecanismo de infección del virus²⁵ y/o con el envejecimiento del sistema inmune y la disminución de la capacidad del hígado para regenerarse del daño.²⁶

Asimismo, los resultados obtenidos en relación con el sexo, coinciden con lo reportado para otros países.²⁷

El bajo porcentaje de coinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) que se reporta, coincide con los datos epidemiológicos previamente reportados,¹⁸ debido a los resultados de la campaña de vacunación contra el VHB que se lleva a cabo en Cuba.

Muchos de los estudios realizados en nuestro país e internacionalmente, aportan datos sobre la alta prevalencia de la coinfección del VHC con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH).²⁸⁻³⁰ Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los estudios realizados anteriormente, lo cual pudiera estar relacionado con la falta de información brindada por el paciente acerca de su enfermedad, lo que, sin duda, introduce un sesgo en este estudio.

El bajo porcentaje de positividad que se encontró entre las gestantes, en relación con la infección con el VHC, es similar a lo informado en la literatura mundial.^{31,32}

Los valores de positividad para el VHC que se reportan para las tres consultas que remitieron pacientes —Trasplante, de Hemodiálisis y Gastroenterología—, coinciden con los informados previamente en la literatura en nuestro país.³³

Este es un trabajo que, por el período que abarca (2004-2012), brinda datos epidemiológicos importantes para nuestro país que hasta el momento no habían sido publicados y que enriquecen la epidemiología de esta enfermedad.

Por otra parte, se reafirma la importancia del empleo de los métodos moleculares para el diagnóstico certero de infecciones virales como la causada por el VHC, donde otras metodologías serológicas pudieran introducir falsos resultados. Es por ello que su implementación y aplicación en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras" reviste gran relevancia para las consultas de dicha institución, así como de otros centros del país, lo que constituye una fortaleza más para nuestro sistema de salud.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of agespecific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57:1333-42
2. Rosen HR. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2011;364(4):2429-38.
3. Gravitz L. Introduction: a smouldering public-health crisis. *Nature*. 2011;474:S2-S4
4. Mohamed AA, Elbedewy TA, El-Serafy M, El-Toukhy N, Ahmed W, Ali El Din Z. Hepatitis C virus: A global view. *World J Hepatol*. 2015;7(26):2676-80.
5. World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection. Geneva: WHO; April 2014.
6. Williams IT, Bell BP, Kuhnert W, Alter MJ. Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006. *Arch Intern Med*. 2011;171:242-8.
7. Klevens RM, Hu DJ Jr, Holmberg SD. Evolving epidemiology of hepatitis C virus in the United States. *Clin Infect Dis*. 2012;55(Suppl 1):S3-9.
8. EASL Clinical Practice Guidelines. Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*. 2011;55:245-64.
9. Kumar D, Malik A, Asim M, Chakravarti A, Das RH, Kar P. Influence of quasispecies on virological responses and disease severity in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2008;14(5):701-8.
10. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5):65-72.
11. Di Martino V, Richou C, Cervoni JP. Response-guided peg-interferon plus ribavirin treatment duration in chronic hepatitis C: meta-analyses of randomized, controlled trials and implications for the future. *Hepatology*. 2011;754:89.
12. Chomczynskj P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162:156-9.
13. González-Pérez I, González González YJ, Armas Cayarga A, Vina Rodríguez A, Medina Concepción A, Trujillo Pelegrin N, et al. Validation of a nested PCR assay UMELOSA® HCV CUALITATIVO for the detection of Hepatitis C virus Biologicals. 2003;31:55-61.
14. Friedman SL. The past 10 years of gastroenterology and hepatology - reflections and predictions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11:692-700.
15. Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, Dubois F, Antona D, Lemasson JM, et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *Med Virol*. 2010;82(4):546-55.

16. Kershenobich D, Razavi HA, Sanchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int.* 2011;31(Suppl 2):18-29.
17. Morgan RL, Baack B, Smith BD, Yartel A, Pitasi M, Falck-Ytter Y. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med.* 2013;158(5 Pt 1):329-37.
18. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud. 2015.
19. Padrón G, Arús E, Roca J, Viña A, Lemus G, Bacallao J. The Hepatitis C in Cuba: prevalence, antibody pattern, genotype and risk factor *Hepatology.* 1994;19(4):141.
20. Martínez JF, Pérez A, Montalvo MC, Rodríguez L, Gutiérrez A, Rodríguez K. Seroprevalencia y factores asociados a la hepatitis C en los municipios Playa y Marianao. *Rev Panam Infect.* 2005;7(3):8-14.
21. Bruguera M, Forns X. La hepatitis C en España. *Med Clin (Barc).* 2006;127:113-7.
22. Villar LM, Amado LA, de Almeida AJ, de Paula VS, Ximenez LL, Lampe E. Low prevalence of hepatitis B and C virus markers among children and adolescents. *Biomed Res Int.* 2014;4(6):32-8.
23. El-Shabrawi MH, Kamal NM. Burden of pediatric hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2013;19:7880-8.
24. American Academy of Pediatrics . Committee on Infectious Diseases. Hepatitis C Virus Infection. *Pediatrics.* 1998;101(3):481-5.
25. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. Geographic differences and temporary trends. *Semin Liver Dis.* 2000;20:1-16.
26. Seeff I. Hepatitis C: estructura viral y epidemiología. *Rev Cient Med.* 2005;11(1):23-7.
27. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2013;13:60.
28. Lacombe K, Rockstroh J. HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. *Gut.* 2012;61(Suppl 1):i47-i58.
29. Rodríguez Lay LA, Montalvo Villalba MC, Bello Corredor M. HCV genotype determination in monoinfected and HIV co-infected patients in Cuba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2012;106:711- 7.
30. González-Horta EE, Marante J, Amador-Cañizares Y. Analysis of hepatitis C virus core encoding sequences in chronically infected patients reveals mutability, predominance, genetic history and potential impact on therapy of Cuban genotype 1b isolates. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(11):1320-7.

31. Santiago B, Blázquez D, López G, Sainz T, Muñoz M, Alonso T, et al. Perfil serológico en gestantes extranjeras frente a VIH, VHB, VHC, virus de la rubéola, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, y *Trypanosoma cruzi*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:64-9.
32. Sampedro A, Mazuelas P, Rodríguez-Granger J, Torres E, Puertas A, Navarro JM. Marcadores serológicos en gestantes inmigrantes y autóctonas en Granada. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:694-7.
33. Ballester JM, Rivero RA, Villaescusa R. Hepatitis C virus antibodies and other markers of blood-transfusion-transmitted infection in multi-transfused Cuban patients. *J Clin Virol*. 2005;34(2):S39-S46.

Recibido: 6 de diciembre de 2016.

Aceptado: 11 de agosto de 2017.

María Teresa Martínez Echevarría. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba. Correo electrónico: genetica@hha.sld.cu