

Prevalencia de hepatitis C por reacción en cadena de polimerasa (PCR) en donantes del banco de sangre

Prevalence of hepatitis C by RT-PCR in donors of the blood bank

Yezid Alfonso Farfán, MD,¹ Martín Alonso Garzón, MD,¹ Mario Humberto Rey Tovar, MD,¹ Juan Carlos Molano, MD,¹ Jorge Iván Lizarazo, MD,¹ Juan Carlos Marulanda, MD.¹

RESUMEN

OBJETIVO: determinar la prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) por reacción en cadena de polimerasa de tiempo real (PCR-TR) cualitativo y la concordancia del ELISA con el PCR-TR.

MÉTODO: Es un estudio Cross-sectional para calcular la prevalencia de infección por VHC usando las pruebas de ELISA y PCR-TR con un estudio de concordancia entre las dos pruebas. Se tomaron los registros del banco de sangre del Hospital Universitario de la Samaritana (HUS) entre mayo de 2004 y mayo de 2005. A todos los pacientes con reporte positivo por ELISA de anticuerpos para el VHC se les realizó una historia clínica completa con énfasis en determinar la presencia de factores de riesgo para hepatitis C, prueba de PCR-TR para RNA de VHC pruebas de bioquímica y función hepática. Se calculó los Odds Ratio (OR) con sus intervalos de confianza del 95% con un alfa del 5% y la prueba exacta de Fisher con su valor P.

RESULTADOS: se revisaron 6.009 registros de donantes y se detectaron 38 casos de VHC por ELISA para una prevalencia de 0,6 % por ELISA. La prevalencia de VHC por PCR-TR fue de 6,6 por 10.000 donantes (0,06%). El valor predictivo positivo del ELISA para VHC fue de 13,3%.

CONCLUSIONES: la prevalencia de hepatitis C disminuye al utilizar el PCR-TR. La prevalencia en donantes fue de 0,6% por ELISA y 0,06 % por PCR-TR. La causa está dada por el valor predictivo positivo de 13,3% del ELISA.

Palabras clave

Prevalencia, inmunoensayo (ELISA), Reacción en cadena de polimerasa (PCR), hepatitis C.

SUMMARY

OBJECTIVE: To determine the prevalence of VHC by RT-PCR, and the agreement of ELISA with RT-PCR.

METHOD: Cross-sectional study to calculate prevalence of infection by VHC using the tests of ELISA and RT-PCR, study of agreement between the two tests. The registries were taken from the Blood Bank of HUS between May of the 2004 to May of the 2005. The test of RT-PCR (AMPLICOR) for RNA of VHC was made to them. They took biochemistry and liver function to evaluate the association calculated Odds Ratio (OR) with its intervals of confidence of 95% with an alpha of 5% and the exact test of Fisher with its value P.

RESULTS: 6009 registries of donors were reviewed and 38 cases of VHC by ELISA for a prevalence of 0.6% by ELISA were detected. The prevalence of VHC by RT-PCR in the cases was of 6.6 by 10,000 donors. Positive the Predictive Value of ELISA for VHC was of 13.3%.

In order to evaluate the association one calculated Odds Ratio (OR) with its intervals of confidence of 95% with an alpha of 5% and the exact test of Fisher with its value P.

CONCLUSIONS: The prevalence of Hepatitis C diminishes when using the RT-PCR. The prevalence in donors was of 0.6% by ELISA and 0.06% by RT-PCR. The cause of this, is given by, the Positive Predictive Value of 13.3% of the ELISA.

KEY WORDS

Prevalence, immunoassay: (ELISA), Polymerase Chain reaction (PCR), Hepatitis C.

¹ Gastroenterólogos. Unidad de Gastroenterología y Endoscopia Digestiva. Hospital Universitario de la Samaritana. Universidad de

Rosario. Bogotá, DC. Colombia.

Fecha recibido: 19-10-07 / Fecha aceptado: 01-11-07

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 170 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas por el virus de la hepatitis C (VHC) y actualmente se considera como la primera causa de trasplante hepático en el mundo (1, 2, 9). Existe una prevalencia de aproximadamente 2-3% la cual varía según la región y el país. En Colombia la prevalencia estimada de la enfermedad es del 1% (6, 7).

El diagnóstico de la hepatitis C implica pruebas de anticuerpos y la confirmación de la replicación viral por pruebas moleculares de genoma viral (8). Las pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA) fueron las primeras pruebas diagnósticas para detectar la infección por el VHC. Las pruebas de ELISA de tercera generación son actualmente utilizadas por la mayoría de laboratorios y centros de referencia para detectar anticuerpos contra el VHC (anti-VHC) y tienen reportada una sensibilidad del 97% y especificidad el 99% (4, 5, 8, 10-12, 14). Estas pruebas serológicas son típicamente utilizadas para el tamizaje de grandes poblaciones de pacientes con sospecha de tener la infección por el VHC y en donantes de productos sanguíneos (11, 13).

En algunos países latinoamericanos, incluido el nuestro, la mayoría de los laboratorios informan el anti-VHC positivo únicamente con base en la prueba de tamizaje, aun cuando la recomendación internacional establece que antes de emitir el resultado se deben realizar pruebas complementarias a todas las personas con pruebas de tamizaje positiva, especialmente en poblaciones de baja prevalencia de hepatitis C (< 10%) como los donantes de sangre y la población general (13).

Desde la primera versión del ELISA se informaron resultados falsos positivos de las pruebas de tamizaje. La frecuencia de resultados falsos positivos se relaciona inversamente con la prevalencia de la hepatitis C en la población estudiada (13). Con las versiones más recientes del ELISA (tercera generación) en personas asintomáticas, sin factores de riesgo o en quienes se desconoce información específica, como ocurre con los donantes de san-

gre, la proporción de resultados falsos positivos es en promedio del 35% (rango del 15 al 60%) (3, 4, 13). Así, en poblaciones con baja prevalencia de hepatitis C la especificidad reportada del ELISA no provee el valor predictivo deseado para una prueba con resultado positivo. Por esta razón un resultado positivo no significa necesariamente que una persona curse con una infección por el virus de la hepatitis C, haciendo necesario realizar una prueba confirmatoria, dentro de las cuales están las pruebas que detectan el RNA viral como es la reacción en cadena de polimerasa de tiempo real (PCR-TR) del VHC que detecta bajos niveles de RNA del VHC en suero y es considerada como el patrón de oro para el diagnóstico de la infección por el VHC y para evaluar la respuesta a la terapia. La PCR-TR cualitativa es pues la prueba confirmatoria por excelencia; identifica el RNA del VHC y lo amplifica, determinando la presencia de viremia en la persona infectada; esta prueba detecta cargas bajas del virus de hasta 50 UI/ml (3, 5, 8, 10, 12, 14).

El hospital Universitario de la Samaritana es un hospital de III nivel, centro principal de remisión del departamento de Cundinamarca. Cuenta con banco de sangre y según estadísticas de 2005 en este hospital se transfundieron 5.003 unidades de glóbulos rojos, 1.738 unidades de plasma y 1.028 unidades de plaquetas.

El objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) por PCR-TR, los factores de riesgo para la enfermedad en los donantes con seropositividad por técnica de inmunoensayo (ELISA) y la concordancia del ELISA con el PCR-TR.

METODOLOGÍA

El presente es un Cross-sectional, con un estudio de Concordancia entre la prueba de ELISA para el VHC y la PCR-TR cualitativa para el VHC. Inicialmente se tomo como fuente secundaria la base de datos de donantes del banco de sangre del HUS entre mayo de

2004 y mayo de 2005 y se contactaron a los pacientes con resultado positivo de la prueba de ELISA (tercera generación v 4.0), a quienes se les realizó una historia clínica completa con énfasis en determinar la presencia de factores de riesgo para hepatitis C, y la prueba de PCR-TR cualitativa (AMPLICOR, HCV Monitor v 2.0-Roche molecular systems). Adicionalmente, pruebas de aminotransferasas, fosfatasa alcalina, tiempo de protrombina, albúmina, bilirrubinas totales y diferenciales.

El análisis univariado se realizó con las medidas de tendencia central de las variables de razón y la distribución de frecuencias de las variables nominales. Para la estimación de asociación de los posibles factores de riesgo se calculó los Odds Ratio (OR) junto con sus intervalos de confianza del 95% y la prueba de Chi cuadrado X^2 o la prueba exacta de Fisher con su valor de P a un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). Se muestran los hallazgos clínicos y paraclínicos de los pacientes que resultaron positivos con la prueba de PCR.

El presente trabajo fue aprobado por el comité de ética médica del hospital Universitario La Samaritana. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para utilizar la información y realizar las pruebas anotadas.

RESULTADOS

Se revisaron 6.009 registros de banco de sangre del Hospital Universitario de La Samaritana. La donación se efectuó entre mayo de 2004 y mayo de 2005; de estas 6.009 donaciones se detectaron 38 casos de VHC por ELISA de tercera generación que efectúa el banco de sangre para tamizaje, con una prevalencia de 0,6 % por ELISA. De estos pacientes pudimos contactar 30 casos y todos aceptaron realizarse la PCR para VHC; los 8 casos restantes no se pudieron contactar (direcciones y teléfonos errados, cambio de dirección, etc.). De los pacientes con ELISA positivo el 53,3% (16/30) fueron de género masculino, la edad promedio fue de 40 años (rango 20-60). El 63% (19/30) era procedente de Bogotá seguido de municipios cercanos.

PREVALENCIA Y CONCORDANCIA

De los 30 casos de ELISA positivo sólo cuatro fueron positivos por PCR-TR, para una prevalencia de VHC por PCR-TR de 6,6 por 10.000 donantes (0,06%). El valor predictivo positivo del ELISA para VHC fue de 13,3 %. Al realizar el cruce de variables de riesgo con el resultado de la PCR, no se encontraron factores de riesgo que marcaran una diferencia en riesgo entre los casos positivos al ELISA y negativo al PCR y los casos que tuvieron positividad en ELISA y PCR (tabla 1).

Tabla 1. Asociación entre los factores de riesgo y la confirmación de VHC por PCR dentro de los seropositivos por ELISA para VHC

Variable de riesgo	PCR+/exp	OR	IC95% OR	X^2	P
Transfusiones de sangre	1/3	4	0,27-58,4	0,35*	0,19
Cirugías previas	2/12	1,6	0,19-12,24	0,53*	0,34
Tatuajes	0/1	-	-	-	0,43
Piercing	0/1	-	-	-	0,43
Acupuntura	0/2	-	-	-	0,37
Pareja estable	3/24	0,71	0,06-8,3	0,61*	0,39

* Se utilizó la prueba exacta de Fisher.

DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS

No hubo hallazgos anormales en el examen físico, en los resultados de hemograma, bilirrubinas totales y diferenciales, tiempos de coagulación, fosfatasa alcalina ni tampoco en la albúmina sérica. Lo único alterado en los pacientes con PCR-TR positivo para RNA del VHC fue la elevación de las aminotransferasas. Sin embargo, este resultado no tuvo valor estadístico (tabla 2).

DISCUSIÓN

La mayoría de los datos publicados sobre la prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis C a nivel mundial están basados en grupos específicos de la población como son los donantes de sangre o los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas que no son representativos de la comunidad donde residen; sin embargo, los estudios realizados con muestras representativas de la población son muy difíciles de realizar en la mayor parte del mundo (1).

Tabla 2. Descripción de los casos confirmados de VHC por PCR.

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4
Género	Femenino	Femenino	Femenino	Masculino
Edad	50	60	49	27
Exposición algún factor de riesgo	Transfusión y cirugía previa	Esposo en hemodiálisis	Cirugía previa	NO
Hallazgos en el examen físico	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Hemograma	Normal	Normal	Normal	Normal
Tiempos de coagulación	Normal	Normal	Normal	Normal
Bilirrubinas	Normal	Normal	Normal	Normal
AST/ALT	40/54	62/91	60/83	50/60
Fosfatasa alcalina	Normal	Normal	Normal	Normal
Albúmina	Normal	Normal	Normal	Normal

Las pruebas de inmunoensayo (ELISA) de tercera y cuarta generación son ideales para el diagnóstico inicial de la hepatitis C, las cuales detectan la presencia de anticuerpos contra el VHC con una sensibilidad y especificidad del 99% y 97% respectivamente (4-6, 8, 11 y 12 grado). La prueba de ELISA de tercera generación es la prueba de tamizaje que se ajusta al objetivo del banco de sangre, que es garantizar una transfusión sin riesgo de infección por el VHC. Sin embargo, en la población inmunocompetente con prevalencia de infección menor al 10% (donantes de sangre, población general, etc.) el porcentaje de falsos positivos es de aproximadamente 35% (rango de 15%-60%) (4). El CDC reporto anti HCV falso positivo en 22% de donantes de sangre, 26% en población de bajo riesgo, 14% en pacientes hemodializados y 4,5% en población de alto riesgo (3, 13).

Se han utilizado diversas estrategias para identificar resultados falsos positivos de la prueba de ELISA, como la realización de una segunda prueba para confirmar el resultado reactivo. Otra estrategia (secuencial) consiste en realizar un segundo ELISA a los donantes de sangre y complementar el estudio con una prueba de RIBA o de RNA del VHC (PCR-TR) para confirmar la segunda prueba reactiva. La prueba de RIBA está indicada para identificar los anti-VHC falsos positivos. Las desventajas de esta prueba son el costo mayor comparado con las pruebas de RNA del VHC. (13)

Los estudios virológicos moleculares detectan y miden el genoma del RNA del VHC. Tres métodos específicos han sido desarrollados para detectar y cuantificar el RNA del VHC: la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA) la técnica del b-DNA. (11). La PCR de tiempo real (PCR-TR) tiene dos ventajas mayores sobre el PCR estándar que son el eliminar la necesidad de manipulación de la muestra lo que reduce la contaminación y segundo requiere menos tiempo para detectar la muestra que está siendo amplificada (11). La PCR-TR cualitativa es la prueba confirmatoria por excelencia; identifica el RNA del VHC y lo amplifica, determinando la presencia de viremia en la persona infectada (8, 11, 14).

Para este estudio se tomaron las recomendaciones y reportes del CDC de Atlanta (3), donde informan los resultados del ELISA de tercera generación y calculan una especificidad superior al 99%. Lo que quiere decir que la prueba identifica certeramente a los individuos sanos, pero el valor predictivo positivo del ELISA es muy bajo lo que determina que la posibilidad de tener hepatitis C con un ELISA positivo es baja. Esto último está de acuerdo con lo publicado previamente en la literatura en otros estudios (13) donde informan elevada proporción de resultados falsos positivos (62%) comparado con lo reportado por el CDC (22%) y probablemente al igual que en nuestro país; esto se debe a la menor prevalencia de hepatitis C comparado con los Estados Unidos. Guiados por lo expuesto previamente realizamos la prueba confirmatoria de PCR-TR a los casos positivos por ELISA.

La concordancia encontrada entre el ELISA y PCR-TR está de acuerdo a la literatura mundial. Nosotros encontramos una prevalencia por PCR-TR para RNA del VHC baja (0,06%) comparada con otros autores que la calculan entre 0,97% y 1,5% en donantes de sangre (6, 7). La prevalencia baja afecta el valor predictivo positivo del ELISA como se vio evidenciado en el estudio (3).

La falta de asociación en nuestro estudio entre los factores de riesgo y la hepatitis C se debe claramente a los pocos casos de hepatitis C confirmado por el PCR-TR. La identificación de personas con anti-VHC falso posi-

tivo evitará notificaciones incorrectas, el daño psicológico secundario al diagnóstico de hepatitis C así como los costos de consultas médicas periódicas y pruebas de laboratorio innecesarias; como se ha reportado previamente se debe considerar que seis de cada diez productos de sangre que se eliminan por la prueba de tamizaje positiva son resultados falsos positivos. (13).

En Colombia, la prevalencia reportada de la infección por el VHC está basada sobre la prueba de ELISA y no en el PCR-TR. Teniendo en cuenta la información y recomendaciones dadas por el CDC de Atlanta sobre el diagnóstico de la hepatitis C y conociendo que el PCR-TR tiene mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA, se supone que la verdadera prevalencia en Colombia de la hepatitis C es menor que la reportada. Se requieren a futuro estudios adicionales para confirmar la prevalencia real de la hepatitis C en nuestro medio. En nuestro estudio, los cuatro pacientes confirmados por PCR-TR iniciaron tratamiento.

CONCLUSIONES

La prevalencia de hepatitis C en individuos donantes en banco de sangre disminuye al utilizar una prueba diagnóstica más específica como es el PCR-TR; en este estudio la prevalencia en donantes fue de 0,6% por ELISA y 0,06% por PCR-TR. La causa de esto está dada por el valor predictivo positivo de 13,3% del ELISA que fue calculado en este estudio. Los factores de riesgo asociados en la literatura mundial a la hepatitis C como antecedentes de transfusiones de sangre, uso de drogas intravenosas, *piercing*, acupuntura o tatuajes no tuvieron asociación estadística en nuestro estudio con la infección detectada por PCR-TR aunque esto puede ser debido al tamaño de la muestra que fue pequeño.

AGRADECIMIENTOS

Las pruebas de PCR para VHC en este estudio fueron financiadas por Laboratorios ROCHE de Colombia. Es importante anotar que este laboratorio no tuvo ninguna participación en el análisis de los resultados.

REFERENCIAS

1. Shepard C, Funelli L. Global epidemiology of hepatitis C Virus Infection. *Lancet Infection Dis* 2005; 5: 558-67.
2. McHutchison J, Fried MW. Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 149-161.
3. Alter M, Kuhnert W, Finelli L. Guidelines for Laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C Virus. *Centers for disease control and prevention. MMWR Recomm Rep* 2003; 52: 1-13, 15; quiz CE11-14.
4. Richter S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microb* 2002; 12: 4407-12.
5. Colin C, Lanoir D, Touzet S. et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001; 8: 87-95.
6. Espinosa G. Cuál es la prevalencia de hepatitis C en Colombia. *Repertorio de Medicina y Cirugía* 2002; 11(1).
7. De la Hoz F. Epidemiología de la hepatitis C en Latinoamérica y Colombia. *Repertorio de Medicina y cirugía* 2002; 11(1).
8. Shaw-Stiffel T. Reference to Hepatitis C Infection. *Science Press* 2004: 25-34.
9. American Gastroenterological Association Technical Review on the Management of Hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 231-264.
10. Fried MW. Diagnostic testing for hepatitis C: Practical considerations. *Am J Med* 1999; 107: S31-51.
11. Ferreira-González A, Shiffman M. Use of diagnostic testing for Managing Hepatitis C Virus Infection. *Semin Liver Dis* 2004; 24 (S2): 9-18.
12. Chau R. Screening for hepatitis C virus infection: A review of the evidence for the US preventive services Task Force. *Ann Intern med* 2004; 140: 465-479.
13. Contreras AM. Anticuerpo a hepatitis C: ¿verdadero o falso positivo? Nuevas estrategias de diagnóstico. *Rev Invest Clin* 2006; 58 (2): 153-160.
14. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S65-S73.