

Diagnóstico de hepatitis viral tipo B, C y enfermedad de Chagas por UMELISA

DIAGNOSIS OF VIRAL HEPATITIS TYPE B, C AND CHAGAS DISEASE BY UMELISA

Miriam Lázara DELGADO PÉREZ,¹ Abilio Ubaldo RODRÍGUEZ PÉREZ²

¹ Hospital Universitario Clínico - Quirúrgico "Dr. Miguel Enríquez". Ramón Pinto 202, 10 de Octubre. La Habana, Cuba. Correo-e: miriam.delgado@infomed.sld.cu

² Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de La Habana. 102, n°. 3001, entre 31 y 31B. Reparto Hornos. Marianao 14. La Habana 11400, Cuba. Correo-e: ubaldo.rodriguez@infomed.sld.cu

RESUMEN

Los métodos de diagnóstico para detectar enfermedades infecciosas han evolucionado con el desarrollo de la Biotecnología y las técnicas inmunoenzimáticas, tal es el caso del Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA) desarrollado por el Centro de Inmunoensayos de Cuba, mediante la cuales se pueden determinar la presencia de antígenos o anticuerpos de diferentes enfermedades, tales como la hepatitis viral tipo B, C y enfermedad de Chagas. En el presente estudio se muestran los resultados obtenidos del diagnóstico serológico durante un año de trabajo (2014) por tecnología SUMA relacionada con dichas enfermedades en la población residente del estado de Táchira, Venezuela.

El universo estuvo constituido por 7343 pacientes y se analizaron un total de 21714 muestras, siguiendo las instrucciones de acuerdo a la técnica de diagnóstico seleccionada que se muestran a continuación: UMELISA HBsAg PLUS, HBsAg Confirmatory Test, UMELISA HCV 3ra generación, y UMELISA Chagas.

En 27 muestras para hepatitis viral tipo B, el UMELISA HBsAg PLUS fue positivo en 9 pacientes, de los cuales 8 resultaron confirmados. Por otra parte, el 21% de la muestra estudiada (68 pacientes) fue positivo a hepatitis viral tipo C. Tener ya identificados portadores en la población fue un paso de avance en la prevención y seguimiento de dichos pacientes.

El 62 % de las muestras estudiadas para diagnóstico de enfermedad de Chagas fue positivo, lo cual confirma el planteamiento sobre la endemia de dicha enfermedad, elemento sumamente importante al realizarse un diagnóstico precoz en función de evitar la cronicidad y las consecuencias fatales de dicha infección.

En todos los casos, la realización de estudios de pesquijajes mediante técnicas de UMELISA por tecnología SUMA, han sido útil y servirá de base para estudios posteriores de incidencia poblacional de las infecciones detectadas.

Palabras clave: Hepatitis viral tipo B y C, enfermedad de Chagas, técnicas UMELISA, tecnología SUMA.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de diagnóstico para detectar enfermedades infecciosas han evolucionado con el desarrollo de la biotecnología y las técnicas inmunoenzimáticas, tal es el caso del Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA) desarrollado por el Centro de Inmunoensayos de Cuba, mediante la cuales se pueden

determinar la presencia de antígenos o anticuerpos de diferentes enfermedades, tales como la hepatitis viral tipo B, C y enfermedad de Chagas.^{1,2,3,4,5,6,7}

Este método se basa en un sistema de diagnóstico integral sobre la base de las técnicas de inmunoensayos, que en los últimos 17 años han estado dirigidas fundamentalmente a programas o aplicaciones de salud en tres líneas de desarrollo fundamentales:

- Programa Materno - Infantil: diagnóstico prenatal y neonatal.
- Certificación de sangre.
- Vigilancia epidemiológica.

Actualmente se están utilizando también como marcadores tumorales, en el diagnóstico y seguimiento de cáncer de próstata, hepatocarcinoma, coriocarcinoma y otros.¹

Debido a que la enfermedad causada por estos virus es difícil de detectar en sus primeros estadios y que no crecen en cultivos celulares - extremadamente costosos - los ensayos serológicos son los más ampliamente utilizados en el diagnóstico.¹

En Cuba existe una red de laboratorios que utilizan la Tecnología SUMA, ubicados en hospitales maternos, bancos de sangre, policlínicos y Centros de Higiene, Epidemiología y Microbiología, constituyendo modelo de aplicación en pesquijajes masivos para países en vías de desarrollo.

Esta tecnología es utilizada también en países como Venezuela, Brasil, Argentina, México, Colombia y China.¹

En el municipio García de Hevia, del estado Táchira (Venezuela), se trabajan muestras humanas recolectadas mediante venipuntura para el pesquijaje epidemiológico y diagnóstico de hepatitis viral tipo B, tipo C y enfermedad de Chagas - alta incidencia en la población, las cuales son procesadas mediante dicha tecnología.

Hepatitis viral tipo B

El virus de la Hepatitis B (VHB) es un hepadnavirus, posee ADN de doble cadena, tiene un antígeno de superficie (HBsAg) que es antigénicamente heterogéneo y otro antígeno HbeAg el cual es identificado como soluble. Tiene una distribución mundial y es común en grupos de alto riesgo (personas que se inyectan por vía intravenosa con material contaminado, relaciones sexuales múltiples y desprotegidas, empleados, pacientes de centros de hemodiálisis y que reciben hemoderivados, instituciones de discapacitados mentales y personal de salud, entre otros). La identificación de los casos sobre la base clínica se realiza solamente en el 10% de los niños y entre el 30% - 50% de los adultos que logran un cuadro icterico. Los individuos con infección crónica pueden o no tener antecedentes de hepatitis clínica. Entre el 15-25 % de las personas con infección crónica por VHB, fallecen prematuramente por cirrosis o carcinoma hepatocelular.^{1, 2, 3} Se considera que la infección por VHB es la causa mundial del 80% de los pacientes con carcinoma hepatocelular y ocupa el segundo lugar después del tabaco entre los carcinógenos humanos conocidos.^{1, 2}

Los humanos son el único reservorio, los chimpancés son susceptibles pero hasta ahora no se han identificado ningún otro reservorio animal.^{1, 2, 3}

La transmisión se produce mediante secreciones o excreciones corporales (solo se ha demostrado que

son infecciosos la sangre y líquidos derivados del suero), saliva, semen y secreciones vaginales.

El periodo de incubación es 45 a 180 días. (promedio 60-90 días). La variación depende de la cantidad de virus en el inóculo, el modo de transmisión y factores del huésped.^{1, 2, 3}

El diagnóstico consiste en la detección de antígenos y anticuerpos específicos en el suero. El HBsAg es el primer marcador que aparece después de la infección viral, su presencia antecede la aparición de los síntomas, indica infección viral pero no necesariamente replicación viral o hepatitis crónica.^{1, 2, 3, 4, 5}

El UMELISA HBsAg PLUS es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo "sándwich" de 3ra generación que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y la biotina, utilizando como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas con anticuerpos monoclonales murinos de alta afinidad dirigidos contra el determinante común α del HBsAg. Su detectabilidad para muestras de suero o plasma es de 0, 325 UI/ml.^{1, 2, 4, 5}

HBsAg Confirmatory Test:

A pesar de la especificidad de las técnicas para la detección del HBsAg, se pueden obtener falsos positivos debido a errores de manipulación, instrumentales inadecuados o a la ocurrencia de reacciones inespecíficas, es por ello que surgen los ensayos confirmatorios que nos permiten afirmar que la reacción positiva, es provocada por la presencia de HBsAg en la muestra.^{1, 2, 6}

El ensayo HBsAg confirmatory test, se basa en el principio de neutralización mediante el cual una muestra repetidamente positiva reacciona con un neutralizante (suero de conejo anti HBsAg positivo) y con un suero control libre de anti HBsAg (suero de conejo normal). Los anticuerpos en exceso neutralizan los determinantes antigénicos de la muestra, lo que es demostrado por la disminución significativa de la señal de fluorescencia con respecto a la muestra tratada con el reactivo control. Las muestras de suero o plasma se analizan puras y diluidas (1:101) con solución salina. Se considera positiva cuando $Mn = 0,7 Mc$ y $Mc > 4$, donde Mc es muestra con reactivo control y Mn es muestra con reactivo neutralizante.

Hepatitis viral tipo C

La hepatitis viral no A y no B (HNANB) representan más del 90% de las hepatitis adquiridas por vía parenteral a través de sangre o sus derivados, se ha sugerido que hasta el 10% de los donantes pueden ser infecciosos. Como mínimo, más de la mitad de HNANB evolucionan a la cronicidad y en una alta proporción se alcanza la cirrosis y hepatocarcinoma.^{1, 3, 5, 7}

Con la identificación del virus de la hepatitis tipo C (HCV) en 1989 y el desarrollo de los métodos inmunoenzimáticos para su estudio, se ha podido demostrar que el VHC es la principal causa de las HNANB post transfusional, además que la presencia

de anticuerpos contra el mismo en el suero o plasma de una persona indica que ha sido expuesta al virus y por tanto constituye un transmisor potencial de la enfermedad.^{1,7,8,9}

El virus de la hepatitis tipo C, es un ARN virus con cubierta, clasificado dentro del género *Hepacavirus* de la familia *Flaviridae*, del cual se han identificado varios genotipos.^{1,3,4}

La transmisión se produce por vía parenteral y se ha identificado en todas las zonas del mundo, teniendo su mayor prevalencia entre personas que se drogan por vía intravenosa y los hemofílicos (70 - 80%) en menor proporción, se observa en heterosexuales, homosexuales, trabajadores de la salud y contactos familiares (1 - 5%).^{1,3,4}

La enfermedad tiene un comienzo insidioso, la gravedad oscila desde casos sin manifestaciones clínicas (75%) hasta casos mortales que suelen ser raros. En más del 60% de los adultos las infecciones son menos graves. Del 30-40% de las personas con la forma crónica presentan hepatitis crónica activa y entre un 5-20% pueden desarrollar cirrosis hepática.^{9,10,11,12,13}

Se considera a los humanos como único reservorio. La transmisión se debe a exposición percutánea a sangre o hemoderivados contaminados (especialmente en toxicómanos por inyección). El período de incubación oscila entre 2 semanas a 6 meses, siendo lo más común entre 6-9 semanas. La transmisibilidad comienza desde varias semanas antes de comenzar los primeros síntomas y persistir por tiempo indefinido. Se desconoce el grado de inmunidad que confiere la infección.^{1,3,13}

El UMELISA HCV es un ensayo para la detección de anticuerpos dirigidos contra el virus de la hepatitis tipo C en muestras de suero, plasma y sangre seca en papel de filtro, el cual ha sido de esencial importancia en pesquizado de donantes de sangre y órganos, control de grupos de riesgo y estudio de pacientes con hepatopatías.

Es un ensayo inmunoenzimático indirecto que utiliza como fase sólida tiras de microELISA recubiertas con péptidos sintéticos, correspondientes a las regiones del núcleo, regiones no estructurales (NS4 y NS5) y una proteína recombinante de la región NS3 del VHC (virus de Hepatitis tipo C).¹

En caso de reacción positiva el anticuerpo marcado, se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida (anticuerpo del VHC + antígenos de recubrimiento), el cual mediante la aplicación de un sustrato fluorogénico permitirá que sea medida la intensidad de fluorescencia, lo cual permite detectar la presencia de los anticuerpos de hepatitis tipo C en la muestra.¹

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una parasitosis hística-hemática, producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Es endémica de las regiones tropicales de América del Sur y Central donde se

considera uno de los principales problemas de salud pública. En 1987, la OMS estimó que 90 millones de personas estaban expuestas al riesgo de infección y 20 millones se encontraban infectados.^{1,3,13,14}

Producto del largo período de incubación y la aparición de una respuesta humoral temprana, la serología adquiere una gran importancia en la detección precoz de los casos, de manera tal que se considera portador a todo individuo con resultados positivos en dos de los ensayos serológicos establecidos (inmunofluorescencia, hemaglutinación o fijación del complemento).^{1,3,15,16}

La enfermedad atraviesa por 3 fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda comienza entre la primera y tercera semana después de la infección inicial, la parasitemia es elevada pero los signos clínicos son generalmente inaparentes. En la etapa indeterminada disminuye la parasitemia, haciéndose muy difícil la detección y el nivel de anticuerpos se incrementa. La fase crónica es frecuentemente mortal y se caracteriza por daños irreversibles del miocardio y del tubo digestivo.^{1,3,17}

La transmisión se produce básicamente por tres vías: picadura de triatomíneos infectados, exposición a sangre contaminada, y transmisión vertical de la madre al feto por vía transplacentaria.

Por las características clínicas de los signos inespecíficos en la fase inicial de la enfermedad, el período prolongado de incubación y las complicaciones fatales que ocurren en la fase crónica, el diagnóstico serológico cobra gran valor.^{1,3,14}

El UMELISA Chagas, es una técnica inmunoenzimática que posibilita la detección de anticuerpos IgG específicos de *T. cruzi* en muestras de suero humano. Puede ser utilizado con los siguientes fines: pesquizado de donantes de sangre, y pesquizado de grupos de riesgo en áreas endémicas.

Es un ensayo inmunoenzimático indirecto en el que se utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas con tres péptidos sintéticos representativos de diferentes regiones inmunodominantes de la membrana de *T. cruzi*, que han sido obtenidos mediante síntesis química en fase sólida. Las muestras se fijan a los antígenos de recubrimiento y puede ser medida la intensidad de la fluorescencia emitida mediante la aplicación de un sustrato fluorogénico, lo que detectará la presencia de anticuerpos IgG específicos *al T. cruzi*.^{1,12,14}

En el presente estudio se muestran los resultados obtenidos del diagnóstico serológico durante un año de trabajo (2014) por tecnología SUMA relacionada con dichas enfermedades en la población residente del estado de Táchira (Venezuela), con los siguientes objetivos:

- Demostrar la utilidad de la tecnología SUMA para el pesquizado de hepatitis viral tipo B, C y enfermedad de Chagas en la población estudiada.

- Identificar pacientes portadores de las enfermedades señaladas y contribuir en su seguimiento y control.
- Reconocer la incidencia de hepatitis B, C y enfermedad de Chagas en el municipio García de Hevia, estado Táchira (Venezuela).

MATERIAL Y MÉTODOS

Universo: 7343 pacientes.

Muestras: se analizaron un total de 21714, de ellas:

- 7066 para diagnóstico de hepatitis viral tipo B.
- 36 confirmatorios de hepatitis viral tipo B.
- 7150 para diagnóstico de hepatitis viral tipo C.
- 7448 para diagnóstico de enfermedad de Chagas.

Materiales: Computadora laptop HACER, equipo lector PR 621, equipo lavador MW 2001, incubadora K Lab 601 fijada a 37 °C, impresora Lasser Jet Pro 200, y papel BOND 16.

Métodos

Todas las muestras fueron analizadas por Tecnología SUMA - Centro de Inmunoensayos de Cuba, siguiendo las instrucciones de acuerdo a la técnica de diagnóstico seleccionada que se muestran a continuación: UMELISA HBsAg PLUS, HBsAg Confirmatory Test, UMELISA HCV 3ra generación, y UMELISA CHAGAS.

Se realizó este estudio a:

- Pacientes que concurrieron a los módulos o emergencias y que clínica o epidemiológicamente fueran sospechosos de portar algunas de las infecciones señaladas.
- Embarazadas captadas y posteriormente en cada uno de los trimestres de embarazo.
- Pacientes para pre-operatorio.
- Toda persona de zona endémica como parte de su pesquizado.
- Toda persona en edad fértil y perteneciente a los grupos de riesgo conocidos para estas enfermedades.

Las muestras positivas - por primera vez - fueron nuevamente analizadas en dos ocasiones para lograr un algoritmo de al menos 2 estudios positivos de los tres

realizados. Se realizó confirmatorio de hepatitis viral tipo B a todas las muestras repetidamente positivas en el examen de Hepatitis viral tipo B (UMELISA HBsAg PLUS).

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el total de pacientes y muestras procesadas por técnica de UMELISA en el Municipio García de Hevia - estado Táchira durante el año 2014, según tipo de estudio (hepatitis viral tipo B, C y enfermedad de Chagas).

Estos estudios fueron realizados a una buena parte de la población que los requirió, no obstante, y a pesar

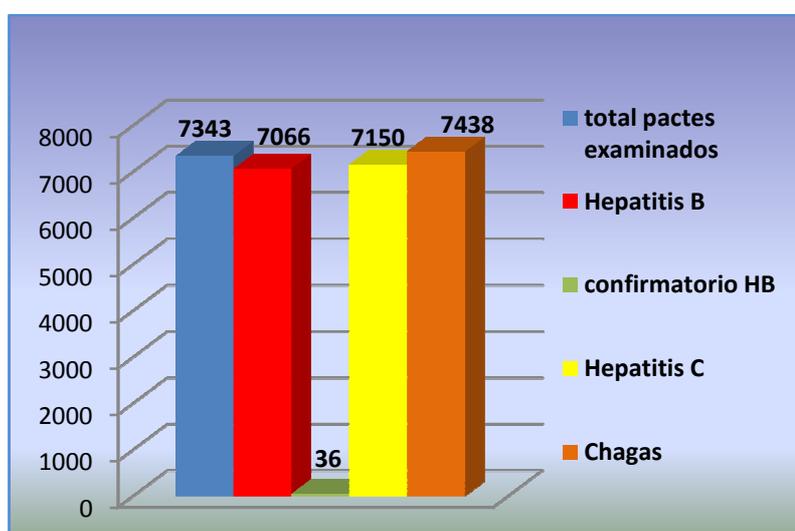


Figura 1. Total de pacientes y muestras analizadas y por tipo de técnica realizada.

Fuente: Registros del Laboratorio SUMA y Departamento de Estadísticas ASIC Simón Bolívar, Municipio García de Hevia (Táchira, Venezuela).

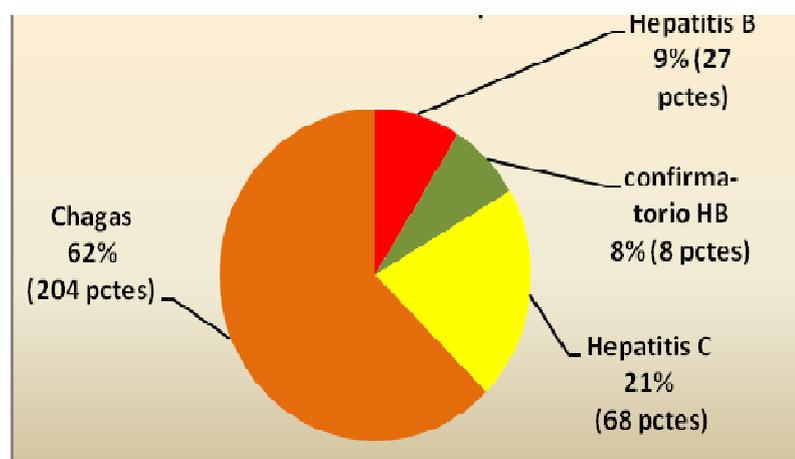


Figura 2. Resultados de las muestras positivas.

Fuente: Registros del Lab SUMA y Departamento de Estadística ASIC Simón

de que los mismos pueden ser realizados en la localidad, aun existen pacientes no incluidos, reflejando baja percepción de la existencia de dichas infecciones con independencia del pesquizado.

En la Figura 2 se observa la positividad de las muestras de hepatitis viral tipo B, C y enfermedad de Chagas estudiadas, durante el período analizado.

Se puede apreciar que el 62 % de las muestras estudiadas para el diagnóstico de enfermedad de Chagas fue positivo, lo cual confirma el planteamiento sobre la endemia de dicha enfermedad, siendo muy importante el diagnóstico precoz de la misma para evitar la cronicidad y las consecuencias fatales de dicha infección.^{1,3,14,15,16,17}

Con respecto a hepatitis viral tipo B, podemos observar que en 27 muestras el UMELISA HBsAg PLUS fue positivo, lo que se corresponde con 9 pacientes y de los cuales 8 resultaron confirmados. A pesar de ser una baja positividad, es importante dicho hallazgo teniendo en cuenta que sin éste tipo de estudio no se hubiera realizado un diagnóstico definitivo, lo cual además de ser un riesgo para su salud, tiene trascendencia desde el punto de vista epidemiológico. Todo lo anterior justifica la importancia de conocer las vías de transmisión y fortalecer la educación sanitaria en la población en función de la prevención de dicha enfermedad.

Otro hallazgo que consideramos importante es haber encontrado un 21% de la muestra seleccionada (68 pacientes) positivos a Hepatitis viral tipo C. Lamentablemente no contamos con el test para la confirmación de dichos resultados, no obstante, tener ya identificados portadores en la población es un paso de avance en la prevención y seguimiento de dichos pacientes.

El pesquizado de dichas infecciones ha sido el mecanismo de detección de población "enferma" entre los supuestamente sanos, viabilizándose el inicio de tratamientos en función de mejorar la calidad de vida.

Consideramos - para todos los casos - que la realización de estos estudios de pesquizados mediante técnicas - UMELISA, por la tecnología SUMA, ha sido útil y ha servido de base para estudios posteriores de incidencia poblacional de las infecciones detectadas.

CONCLUSIONES

- La utilización de la Tecnología SUMA para el pesquizado de Hepatitis viral tipo B, C y Enfermedad de Chagas, fue una herramienta útil en el diagnóstico precoz de dichas infecciones.
- La identificación de pacientes portadores de Hepatitis viral tipo B, C y Enfermedad de Chagas, permitió su tratamiento y control clínico - epidemiológico, así como el seguimiento de las mismas en la población de estudio.

- Mediante esta investigación, se pudo reconocer la incidencia de dichas infecciones en el municipio García de Hevia, lo cual es un paso imprescindible para la atención de las mismas como problemas de salud en dicha localidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Colectivo de autores: Tecnología SUMA. Aplicaciones y Uso. Edit Ciencias Médicas. Cuba, 2007.
2. Sherlock S.: The natural history of Hepatitis B. Postgrad Med J,63:7, 1987
3. Llop A. et al.: Microbiología y Parasitología Médicas, ECIMED, Cuba 2000
4. Koneman EWS, Allen S.: Diagnóstico Microbiológico/Microbiological Diagnosis. 2008 - books.google.com
5. Acosta C.: Actualización sobre Hepatitis viral: etiología, patogenia, diagnóstico microbiológico y prevención. Rev Cubana Med Gen Integr v.16 n.6 Ciudad de La Habana nov.- dic. 2000.
6. Cabezas S. et al. Hiperendemicidad de Hepatitis viral B y Delta en pueblos indígenas de la Amazonía Peruana. Rev. Perú. Med. exp. Salud Publica v.23 n.2, Lima abr. 2006.
7. Boscatto LM, Stuart M.: Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin. Chem.34:27, 1989.
8. Kenna JG et al.: Methods reducing non-specific antibody binding un Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J Imm Methods. 85: 409, 1985.
9. Choo QL et al.: Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B Hepatitis. British Medical Bulletin 46: 423-441, 1990.
10. Alter HJ. You'll wonder where the yellow went: a 15 years retrospective of post transfusion Hepatitis. En Moore SB, ed. Transfusion Transmitted Viral Disease. Arlington, VA. Am Assoc Banks, pp 53-86, 1987.
11. Wick MR et al.: Non- A, Non- B, hepatitis associated with blood transfusion. Transfusion 25: 93-101, 1989.
12. Farfan G, Cabezas C.: Prevalencia de la Hepatitis Viral C en donantes de sangre del Perú. Rev. Gastroenterol. Perú v.23 n.3 Lima jul./set. 2003.
13. Van der Poel et al.: Infectivity of blood seropositive for Hepatitis C virus antibodies. Lancet 335: 558-560, 1990.
14. Vallenás F et al.: Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. Salud Pública Mex vol 48 No1 Cuernavaca ene-feb, 2006.
15. Ferreira AW et al.: *Trypanosoma cruzi* antibodies, en Bergmeyer HV.: Immuno-

- enzimatic tests for screening of blood donors. *Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 33, 1991.
16. Pann AA et al.: Clinical evaluation of an EI Anmfor the sensitive and specif detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease). *The J. Infections diseasse*165: 585-588, 1992.
17. Moncayo A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the America. *Wld hlth, statist, quartr.* 45: 276-279, 1992.