

302827

Nº 23
9E-1



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con Estudios Incorporados a la U. N. A. M.

PREVALENCIA DE LAS HEPATITIS VIRALES TIPO A, B, C
Y DELTA EN POBLACION ABIERTA DE LA
REPUBLICA MEXICANA

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n

Sánchez Islas Mónica

Rangel Sánchez Fabricio

México, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

GRACIAS SEÑOR, POR CONCEDERME LA VIDA

**GRACIAS PAPA, PORQUE TU AMOR, FORTALEZA Y EJEMPLO ME HAN DE
ACOMPañAR TODOS LOS DIAS DE MI VIDA HECHO UN MIS PADRES,**

**GRACIAS MAMA, POR DEDICARTE EN CUERPO Y ALMA AL HOGAR DONDE
CRECI Y ME FORME.**

**GRACIAS A LOS DOS, PORQUE SIEMPRE HE CONTADO CON AMBOS A TODO
LO LARGO DE MI VIDA.**

**A MI ESOSO, POR LLENAR CADA DIA CON TU AMOR Y ENTREGA, POR
HACER DE CADA AYER UN SUEÑO DE DICHA Y DE CADA MAÑANA UNA
VISION DE ESPERANZA.**

GRACIAS POR HACERME TAN FELIZ.

A Ti, Señor,
por la felicidad y dicha que me has brindado,
por la vida que me has otorgado.

A mis padres, Gabriel y Margarita,
por la educación que me han dado,
su amor y confianza,
su ejemplo y apoyo,
que jamás me ha faltado.

A mis hermanas, Gaby y Lizy,
por todo su cariño y aprecio.

A mi abuelita, Malú,
por su exhortación y cariño.

A la memoria de mi abuelo, Joaquín,
porque siempre fue ejemplo de rectitud y lucha.

A la QFB Angélica López Sotelo,
por su asesoría en la realización de esta tesis,
y su estima.

A todo el personal del laboratorio de ETS del INDRE,
por su cooperación en la elaboración de esta tesis.

A mis familiares y amigos,
porque siempre los he tenido a mi lado.

Trabajo realizado en el Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, bajo la tutoría de la QFB Angélica Lopez Sotelo.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Hipótesis.....	2

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. Generalidades.....	3
2.2. Aspectos clínicos de la hepatitis viral.....	3
2.3. Alteraciones en la fisiología hepática.....	6
2.4. Virus de la hepatitis A.....	7
2.5. Virus de la hepatitis B.....	11
2.6. Virus de la hepatitis C.....	18
2.7. Virus de la hepatitis delta.....	22
2.8. Tratamiento de las hepatitis virales.....	24
2.9. Fundamento de los ensayos inmunoenzimáticos.....	25

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diagrama general.....	28
3.2. Material, reactivos y equipo.....	29
3.3. Metodología.....	33
3.3.1. Tamaño de muestra.....	33
3.3.2. Serología.....	34
3.3.3. Ensayos inmunoenzimáticos.....	34
3.3.3.1. HAVAB EIA.....	34
3.3.3.2. Hepanostika HBsAg.....	36
3.3.3.3. MONOLISA Anti-HBc.....	38
3.3.3.4. Hepanostika Anti-HBs.....	39
3.3.3.5. Hepanostika HBeAg/anti-HBe.....	41
3.3.3.6. Hepanostika HDV.....	43
3.3.3.7. MONDLISA Anti-HCV.....	46
3.3.3.8. Enzygnost Anti-HCV.....	48
3.3.3.9. UBI HCV EIA.....	50
3.3.3.10. Lia Tek HCV-III.....	52
3.3.4. Análisis estadístico.....	54

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados.....	55
4.2. Discusiones.....	68

CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	70
--------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA.....	72
--------------------------	-----------

APENDICE.....	76
----------------------	-----------

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del problema.

La hepatitis viral continúa siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; además, su asociación con la cirrosis y el carcinoma hepatocelular lo convierte en un problema de salud pública digno de consideración. Su distribución varía de un país a otro dependiendo del desarrollo económico y social existentes. En México se han registrado brotes de hepatitis desde hace muchos años; aunque el reporte más antiguo en nuestro país data de 1576-1577 (el cual consistió en un brote de hepatitis epidémica entre los indios), no fue sino hasta 1955 que se incluyó en el Código Sanitario como una enfermedad de notificación obligatoria, y la Dirección General de Epidemiología y Campañas Sanitarias la registró en sus formas de trabajo e inició la elaboración estadística y la promoción de normas de control. Sin embargo, existe una falta de información confiable y actualizada respecto a la verdadera frecuencia de dicho padecimiento entre la población, por lo que se recurre al empleo de encuestas seroepidemiológicas como la del presente trabajo, en la que se trabajó sobre una muestra poblacional representativa y aleatoria de la República Mexicana utilizando ensayos inmunoenzimáticos, con la finalidad de establecer la prevalencia de las hepatitis virales tipo A, B, C y delta.

1.2. Objetivos:

- Estimar la prevalencia y distribución geográfica de las hepatitis virales tipo A, B, C y delta en la República Mexicana.
- Establecer la asociación de dicha prevalencia con la edad y el sexo.
- Aportar información de prevalencias que permita establecer medidas de prevención y control de las hepatitis virales.

1.3. Hipótesis:

Debido a la distribución tan amplia de la hepatitis viral en el mundo, y a la conducta y condiciones socioeconómicas de la población mexicana, se espera obtener prevalencias importantes de esta enfermedad en nuestro país.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES

Hepatitis viral es un término general que se aplica a las infecciones del hígado causadas por uno o más agentes virales (11). En 1885 Lurman reportó la existencia de una forma de hepatitis transmitida parenteralmente, donde el brote se dió entre trabajadores de un astillero después de que recibieron una vacuna de viruela preparada con linfa humana. Posteriormente se asociaron diversos brotes al uso inadecuado de jeringas y agujas sin esterilizar, especialmente entre los pacientes de las clínicas de enfermedades de transmisión sexual y sujetos diabéticos los cuales requerían sucesivas inoculaciones vía parenteral. Se asume que dichos brotes fueron debidas a una infección por el virus de la hepatitis B (VHB), pero no puede excluirse totalmente al virus de la hepatitis C (VHC). No fue sino hasta finales de los treinta, que la existencia de hepatitis transmitida vía parenteral de suero humano fue reconocida (11).

Los términos "hepatitis A" y "hepatitis B" fueron introducidos por Mac Callum en 1947 para diferenciar entre hepatitis infecciosa y hepatitis sérica, respectivamente. No obstante, descubrimientos posteriores revelaron que la hepatitis viral no sólo es causada por los virus de la hepatitis A y B, sino también por el virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis delta (HDV) y virus de la hepatitis transmitido entéricamente (HETV) (11).

2.2. ASPECTOS CLINICOS DE LA HEPATITIS VIRAL

Hepatitis Viral Aguda

El curso típico de la hepatitis viral aguda puede dividirse en 4 fases clínicas: periodo de incubación, fase preictérica, fase ictérica y convalecencia (11,36).

El periodo de incubación de la hepatitis viral varía de unas semanas hasta varios meses (Cuadro 1). Los periodos de incubación cortos son típicos de la hepatitis A, mientras que la hepatitis B posee el más largo periodo. La replicación viral es primeramente detectable durante el periodo de incubación, y los títulos séricos del virus alcanzan los niveles máximos durante este periodo antes del comienzo de síntomas (36).

Cuadro 1. Periodos de incubación de las Hepatitis Virales

Tipo de Hepatitis	Periodo de incubación (días)
A	15-40
B	30-150
C	15-120
D	24-51*

*Experimentalmente en chimpancés infectados.

La fase preictérica inicia con el desarrollo de síntomas clínicos inespecíficos como fatiga, letargo, anorexia, náusea, y usualmente dura de 3-7 días (10,11,36). En la hepatitis A, fiebre, dolor de cabeza y mialgias ocurren normalmente durante este periodo (36). Durante la fase preictérica, las pruebas bioquímicas de daño hepático, como los niveles séricos de las enzimas alaninoaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST) se vuelven anormales. La replicación viral todavía es detectable durante esta fase, pero puede decrecer (11,36).

El comienzo de la fase icterica es marcada por la aparición de una coloración café oscuro en la orina y decoloración amarillenta de las membranas mucosas, conjuntiva y piel. La fiebre nunca es sobresaliente en la hepatitis viral aguda (a menos que aparezca daño hepático fulminante) y usualmente termina con la aparición de ictericia. Otros síntomas como fatiga y náusea normalmente persisten y pueden empeorar. Durante la fase icterica los niveles de bilirrubina sérica se vuelven anormales y la ictericia se vuelve clínicamente aparente cuando el nivel de bilirrubina excede los 2-4 mg/dl. Los niveles séricos de ALT y AST generalmente se elevan más de 10 veces de su nivel normal. Típicamente, la replicación viral comienza a decrecer al comenzar la fase icterica, el punto máximo del mal clínico se da al ya no ser detectable el virus; esto sugiere que la enfermedad clínica es causada por una respuesta inmunológica a la replicación viral (11,36).

La convalescencia inicia con la resolución de los síntomas clínicos. Por lo normal, el apetito se incrementa primero, seguido por la desaparición de la náusea. La ictericia termina con la desaparición de síntomas. La bilirrubina, ALT y AST vuelven a sus niveles normales, el virus ya no se detecta y los títulos de anticuerpos son altos (36).

Hepatitis Viral Fulminante

El curso de la enfermedad es similar al de la hepatitis aguda típica, excepto que los signos de falla hepática aparecen durante la fase icterica. El criterio usual para clasificar la hepatitis aguda como fulminante es la aparición de encefalopatía hepática, la cual es frecuentemente anunciada por cambios sutiles en la personalidad, perturbación del sueño, confusión y dificultad de

concentración. Con el progreso de la enfermedad, la conducta se vuelve anormal, seguida de somnolencia y coma. Aunque los valores de ALT y AST pueden ser bastante altos al comienzo de la falla hepática, usualmente caen cuando empeora la función hepática. De manera similar, la replicación viral es usualmente baja o indetectable cuando sobreviene la falla hepática; en la mayoría de los pacientes no se detecta el virus una vez que la hepatitis fulminante es aparente (11,36).

La hepatitis fulminante ocurre en menos del 1% de la hepatitis aguda. El grado de mortalidad, sin embargo, varía grandemente con el tipo de hepatitis (Cuadro 2). La hepatitis fulminante es muy rara en niños (excepto en la hepatitis delta), y tiene un pronóstico deplorable en personas de edad avanzada (36).

Cuadro 2. Mortalidad de la Hepatitis Viral Aguda

Tipo de Hepatitis	Mortalidad (%)
A	0.2
B	0.2-2
C	0.2-1
D	2-20

Hepatitis Viral Aguda Subclínica

Muchos casos de hepatitis aguda son subclínicos y anictéricos, pudiéndose detectar sólo mediante pruebas bioquímicas. La frecuencia de casos ictericos varía grandemente con el tipo de hepatitis viral, la edad y estado inmune del paciente. De este modo la hepatitis A es por lo general asintomática y anictérica en niños, pero típicamente icterica y sintomática en adultos. La hepatitis B es usualmente anictérica en niños, pero normalmente se desarrolla infección crónica; en adultos, una gran proporción de casos de infección con VHB son ictericos, pero son raros los casos que progresan a una infección crónica (6,11,36).

La hepatitis viral subclínica es marcada por un breve periodo de replicación viral seguido rápidamente de un creciente titulo de anticuerpos. Diversos estudios con pacientes expuestos a virus de la hepatitis han mostrado que las infecciones subclínicas son comunes; en éstas hay una replicación viral pasajera y baja seguida de una respuesta inmune rápida y eficiente que erradica al virus antes de que haya un daño hepático significativo (36).

Hepatitis Viral Crónica

La hepatitis B, C y delta pueden resultar en una infección crónica (Cuadro 3). Típicamente, pacientes que desarrollan hepatitis viral crónica tienen enfermedad aguda leve. En la hepatitis B crónica por ejemplo, la mayoría de los pacientes no tienen un comienzo agudo e

ictérico. De hecho, la mayoría de los pacientes con hepatitis viral crónica no tienen síntomas, y la examinación física es frecuentemente normal. Si hay síntomas, usualmente consisten en fatiga y malestar general; en casos más severos puede presentarse náusea, anorexia, pérdida de peso, y dolor en el cuadrante superior derecho a consecuencia de la hepatomegalia. Algunos pacientes, especialmente mujeres, pueden también experimentar artralgias, mialgias y salpullido (36).

Cuadro 3. Cronicidad de las Hepatitis Virales

Tipo de Hepatitis	Cronicidad (%)
A	0
B	2-10*
C	20-70
D	
Coinfección	1-3
Superinfección	70-80

*La cronicidad es menor en mujeres que en hombres, y mayor en niños que en adultos.

En la hepatitis crónica las elevaciones de ALT y AST son moderadas; el nivel de bilirrubina y protrombina son normales a menos que la enfermedad sea severa o se haya desarrollado cirrosis; la replicación viral es persistente. La hepatitis crónica implica que la enfermedad haya durado al menos seis meses, pudiendo presentarse casos en que se extienda varios años e incluso de por vida. La severidad de la hepatitis crónica es variable, en la hepatitis B y C crónicas aproximadamente 20-30% de los pacientes desarrollan cirrosis; en la hepatitis delta crónica el 60-70% de los pacientes desarrollan cirrosis, y un alto porcentaje de éstos mueren por falla hepática (36). Una complicación final a largo plazo de la hepatitis viral crónica es el carcinoma hepatocelular, que se le ha asociado estrechamente a la hepatitis B crónica, aunque información reciente sugiere que también puede ser secuela en algunos casos de hepatitis C (24,36).

2.3. ALTERACIONES EN LA FISILOGIA HEPATICA

El hígado es el mayor órgano del cuerpo; en el adulto, representa cerca del 2% del peso corporal. Es el mayor y más importante órgano de biosíntesis, metabolismo y detoxificación en todo el cuerpo, funciones que se ven afectadas por la hepatitis. Las alteraciones más importantes son el aumento de los niveles plasmáticos de bilirrubina, y de las enzimas ALT y AST; así como la disminución

del nivel plasmático de colesterol esterificado y protrombina (15,31).

Aproximadamente el 80% de la bilirrubina que se excreta proviene de la hemoglobina de los glóbulos rojos que han llegado al final de su ciclo vital de 120 días. El catabolismo de esta hemoglobina tiene lugar, en parte, en las células reticuloendoteliales del hígado. La bilirrubina se transporta por el plasma hasta el hepatocito, que la capta y la conjuga con ácido glucurónico, y de esta forma poder excretarla a la bilis (15,19,31). En la hepatitis, aumentan los niveles plasmáticos de bilirrubina (hiperbilirrubinemia) debido a la mala captación y conjugación por las células hepáticas enfermas, y obstrucción por compresión de los canaliculos biliares por los hepatocitos hinchados (15,31).

Niveles plasmáticos altamente elevados de ALT y AST son indicativos de hepatitis viral, lo cual es debido a que estas enzimas se encuentran en concentraciones importantes en los hepatocitos, y cuando éstos se lesionan, puede aumentar suficientemente la permeabilidad de sus membranas para dejar escapar las enzimas de su protoplasma (15,31).

La lesión de las células hepáticas también produce una disminución rápida y considerable del colesterol esterificado en la sangre, por la disminución de la esterificación por parte de los hepatocitos dañados, impidiendo así la distribución hística del colesterol (15,31).

La hepatitis viral hace disminuir las cifras plasmáticas de protrombina porque los hepatocitos enfermos ya no pueden utilizar la vitamina K para producir cantidades suficientes de protrombina, lo cual afecta el mecanismo de coagulación (15,31).

2.4. VIRUS DE LA HEPATITIS A (VHA)

El virión de la hepatitis A fue visualizado por primera vez por Feinstone en suspensiones fecales de voluntarios humanos (6).

2.4.1. ESTRUCTURA DEL VHA

El VHA pertenece a la familia Picornaviridae y es morfológicamente indistinguible de otros miembros de dicha familia. El VHA es de forma esférica, con un diámetro de 27 nm, desnudo, de simetría icosaédrica, y con un genoma de ARN cadena sencilla y polaridad positiva, que contiene 7,478 nucleótidos. Presenta 20 caras, cada una de las cuales está dividida en 3 capsómeros. La cápside contiene múltiples copias de cuatro proteínas denominadas VP1, VP2, y VP3, aunque existe evidencia de una cuarta proteína llamada VP4. También se ha detectado la presencia de una proteína denominada VPg que se encuentra enlazada al extremo 5' del genoma. El genoma del

VHA dirige la producción de las proteínas capsulares, una ARN polimerasa dependiente de ARN, y una proteasa (Fig. 1) (11, 30, 6). El VHA es estable a -20°C por periodos prolongados y a 60°C por 40 minutos, aunque es inactivado a 100°C en un minuto. No obstante, se ha documentado ampliamente su estabilidad en condiciones naturales (11, 6).

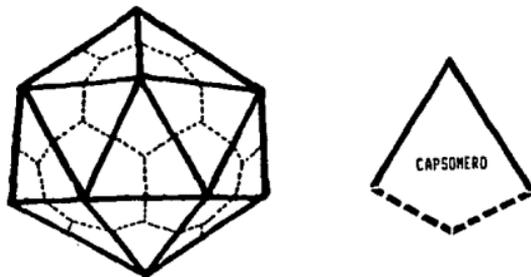


Figura 1. Morfología del VHA

2.4.2. REPLICACION DEL VHA

Se desconoce el mecanismo de replicación del VHA, pero debido a que éste pertenece a la familia Picornaviridae se sugiere que su replicación es similar a la de los otros miembros de la familia. Dado que el VHA posee como genoma una sola cadena de ARN positiva, esto significa que el genoma es infeccioso por sí solo ya que directamente va a funcionar como un ARN mensajero. La proteína VPg unida al extremo 5' del genoma le confiere resistencia a las nucleasas y una alta afinidad hacia los ribosomas (10). Lo primero que va a acontecer es la alineación de los ribosomas cuando está presente el ARN, y posteriormente se sintetizan varias proteínas a partir de una original la cual es fraccionada por la acción de nucleasas celulares. A partir del fragmento denominado N1.5 se origina VPg y los otros dos fragmentos son una polimerasa (para replicar el genoma) y una proteasa (que ayuda al fraccionamiento de las proteínas); a partir del fragmento N1 se originan las proteínas capsídicas (10). Posteriormente se lleva a cabo la síntesis del nuevo genoma. A partir de la cadena de ARN positiva la polimerasa sintetiza 5 cadenas negativas de ARN. Por cada cadena negativa se sintetizan 5 nuevas cadenas de ARN positivas, a cada una de las cuales se le une la proteína VPg en el extremo 5' (10).

2.4.3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL VHA

El periodo de incubación del VHA es de alrededor 28 días. Después del contagio, el virus es excretado en materia fecal hasta antes de la aparición del periodo icterico (30). Sin embargo, esta excreción es muy variable. Algunos individuos pueden excretar una gran cantidad de viriones, mientras que otros excretan muy pocos, e incluso la cantidad puede variar de un día a otro. La excreción crónica del VHA en heces no ha sido documentada (12). La viremia se produce por un periodo extremadamente corto antes de la enfermedad aguda. Aunque la concentración es muy baja para detectarse en una muestra individual, el antígeno del VHA ha sido detectado en muestras secuenciales de chimpances infectados en el laboratorio (11). Una vez que se inician los síntomas o los niveles de transaminasas se elevan al máximo, el virus no puede ser detectado en sangre ni en heces, por lo cual se recurre al inmunodiagnóstico (11).

Los anti-VHA de tipo IgM aparecen en cuanto se manifiesta el periodo agudo de la enfermedad, y persisten en el suero durante 3-12 meses. La disminución en los títulos de IgM anti-VHA se acompañan de un aumento en el título de IgG anti-VHA, el cual confiere inmunidad de por vida (24, 6) (Fig. 2).

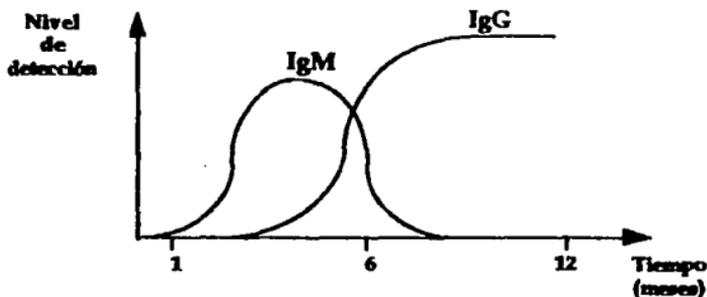


Figura 2. Curso serológico de la infección por el VHA

Las técnicas de laboratorio para la detección de ambos tipos de anticuerpos son: radioinmunoanálisis (RIA) o análisis inmunoenzimáticos (ELISA). Esta última se prefiere por su relativo bajo costo y menor riesgo para el personal de laboratorio. También se recurre a la determinación de anticuerpos totales contra el VHA, pero dicho marcador serológico no discrimina entre una infección

aguda o estado de inmunidad; por ello esta determinación sólo es útil para fines epidemiológicos fundamentalmente (11). Aunque el VHA fue recientemente propagado in vitro y a la fecha se cuenta con cierta variedad de líneas celulares de primate permisivas, su cultivo continúa siendo difícil. El aislamiento primario del virus toma un periodo de tiempo bastante largo (varias semanas) entre la inoculación de los cultivos celulares y la detección inicial del antígeno viral; por ello, el cultivo celular es un método poco práctico y costoso (28). Otras técnicas son la tinción inmunocitoquímica y la hibridación, aunque son demasiado costosas y se emplean sólo para investigación (11).

2.4.4. EPIDEMIOLOGIA DEL VHA

La hepatitis viral del tipo A es endémica en todas las partes del mundo. Sin embargo, está sumamente influenciada por el nivel socioeconómico e higiene de la población. En poblaciones donde las condiciones de vida se caracterizan por el hacinamiento e higiene inadecuados, se observa una prevalencia cercana al 100% en niños que adquieren inmunidad durante los primeros cinco años de vida (11, 6).

La principal vía de transmisión es oro-fecal; ya que la presencia del virus en las heces facilita su diseminación y favorece el desarrollo de brotes entre tropas militares en tiempos de guerra, en guarderías o como resultado de contaminación fecal en agua para beber, en alimentos o leche. Es rara la ocurrencia de hepatitis A adquirida transfusionalmente ya que el periodo de viremia es muy corto, además de que en la mayoría de los casos se administra más de una unidad de sangre, lo cual ofrece la gran posibilidad de que las otras unidades administradas posean anti-VHA que neutralizan al virus que pudiera tener la primera unidad. Es importante señalar que puede darse la transmisión sexual del VHA principalmente en hombres homosexuales (11, 6). La transmisión del VHA por exposición a la orina o secreción nasofaríngea no se produce aunque se han reportado algunas excepciones (11).

2.4.5. PROFILAXIS DEL VHA

Hasta el momento no se dispone de una vacuna comercial contra VHA, pero el aislamiento de este agente en cultivos celulares y el acceso a modelos animales de experimentación, ha permitido la investigación y diseño de diferentes tipos de vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas (3).

La prevención del virus debe plantearse a nivel del mejoramiento en las condiciones de sanidad e higiene de las comunidades, evitando la contaminación fecal del agua y alimentos. La administración de inmunoglobulina es útil para proteger a todos los contactos intradomiciliarios de una familia donde se ha presentado un caso de

hepatitis, cuando se viaja a zonas endémicas o a los contactos de algún miembro infectado de asilos, hospitales o internados (3).

2.5. VIRUS DE LA HEPATITIS B

En 1963, Baruch Blumberg descubrió en una muestra sérica obtenida de un aborigen australiano un antígeno al que llamó antígeno de Australia (11,23). La asociación existente entre el antígeno de Australia (hoy conocido como antígeno de superficie de la hepatitis B o HBsAg) y la hepatitis sérica se reconoció hasta 1967. Y fue en 1968 cuando otros investigadores (Prince, Okochi, Murakami) establecieron que el antígeno Australia se hallaba específicamente en el suero de pacientes con hepatitis B (11). En 1970, Dane y colaboradores detectaron el virión de la hepatitis B en suero de pacientes con antígeno Australia positivo (11).

2.5.1. MORFOLOGIA DEL VHB

El virión de la hepatitis B (también conocido como partícula Dane), pertenece a la familia Hepadnaviridae, tiene una forma esférica y un diámetro aproximado de 42 nm (23). La partícula consiste en un "corazón" (core) o nucleocápside hexagonal con un diámetro de 27 nm, y rodeado por una envoltura lipídica de 7 nm de espesor (11,13,21). La principal estructura antigénica de la envoltura es el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), el cual también puede encontrarse formando estructuras tubulares o esféricas no infecciosas libres de ácido nucleico (13,23,46). El HBsAg contiene un determinante de grupo llamado "a" y determinantes de subtipo llamados "d", "y", "w" y "r"; existen 3 serotipos principales, "adw", "adr" y "ayw" que se encuentran comúnmente pero tienen una distribución mundial irregular (46). La nucleocápside contiene el antígeno "core" de la hepatitis B (HBcAg) y el antígeno "e" de la hepatitis B (HBeAg) (23). El HBeAg es parte del HBcAg y se piensa que es expuesto durante la degradación del HBcAg (21). En el interior de la nucleocápside se encuentra el genoma viral y la ADN polimerasa específica del VHB (23).

El genoma viral consiste en una molécula pequeña de ADN circular de doble cadena en el 50 al 85% de su longitud total, el resto de la cadena es sencilla (28). La cadena larga (o cadena negativa), cuya secuencia es complementaria al RNA mensajero, posee una longitud constante entre 3000 y 3300 bases, mientras que la cadena corta (o cadena positiva) tiene una longitud que varía entre 1700 y 2800 bases (11). Al final del extremo 3' de la cadena positiva se encuentra la ADN polimerasa y en el extremo 5' de la cadena negativa se halla un polipéptido que sirve como para la síntesis del ADN viral (Fig. 3) (23,46).

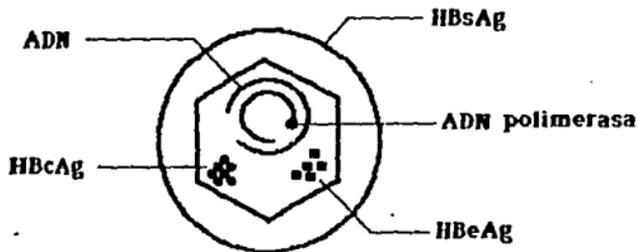


Figura 3. Representación esquemática del VHB

El genoma viral está constituido por los genes S, P, C y X. El gen C codifica para el principal polipéptido de la nucleocápside (HBcAg), así como para el polipéptido específico del HBeAg. El gen S, que contiene a las regiones pre-S1, pre-S2, codifica para polipéptidos de la envoltura viral (HBsAg). El gen P, el cual abarca tres cuartas partes del genoma viral, codifica para un polipéptido básico, del que hay evidencia de que dicha proteína contiene la ADN polimerasa y el iniciador para la síntesis de la cadena negativa de ADN. El pequeño gen X codifica para un polipéptido que puede activar la transcripción de ciertos genes virales (11,26).

2.5.2. REPLICACION DEL VHB

Existe evidencia de que el VHB posee receptores para la albúmina sérica humana polimerizada, y en la membrana del hepatocito se han identificado sitios de unión para dicha albúmina. Por ello se sugiere la hipótesis de que el VHB entra al hepatocito mediante un "puente" de albúmina sérica polimerizada (23).

Summers y Mason han propuesto la siguiente estrategia de la replicación del VHB (Fig. 4):

1. Después de la penetración del virus al hepatocito, el ADN viral alcanza el núcleo y la ADN polimerasa que se halla en el extremo 3' de la cadena corta (positiva) lo alarga, dando lugar a un ADN circular doble cerrado.

2. La cadena negativa del ADN viral es transcrita por la ARN polimerasa celular para sintetizar múltiples copias de cadenas positivas de ARN mensajero (pregenomas).

3. El pregenoma, la ADN polimerasa, el iniciador y el HBcAg se envuelven en una nucleocápside inmadura en el citoplasma de la célula.

4. A partir del iniciador y con el ARN mensajero cadena positiva como molde, la ADN polimerasa con su actividad de transcriptasa reversa efectúa la síntesis de una cadena negativa de ADN viral.

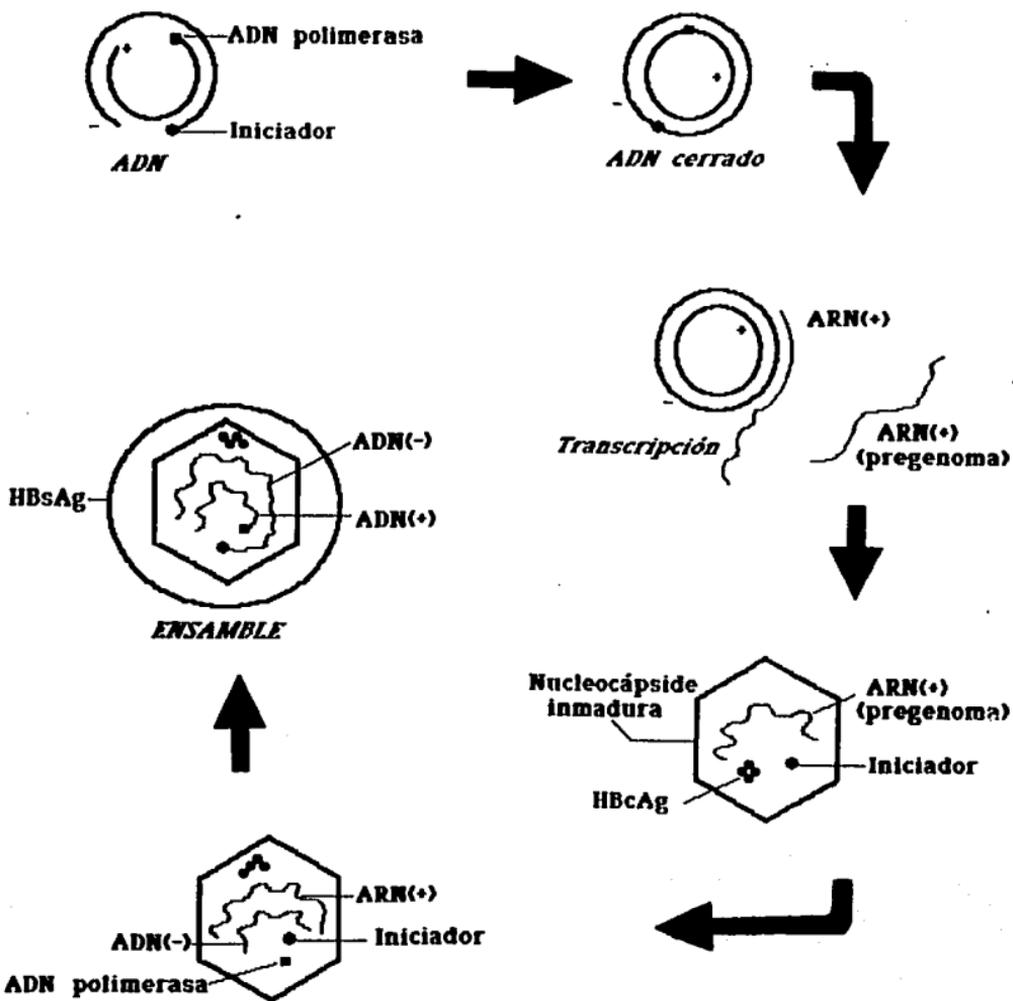


Figura 4. Replicación del VHB

Conforme la síntesis del ADN avanza, el ARN se va degradando por una ribonucleasa.

5. Cuando la síntesis del ADN cadena negativa se completa, se inicia la síntesis del ADN cadena positiva usando la primera cadena como molde. Con este evento se inicia el ensamble de la nucleocápside con el HBsAg, seguida de la salida del virión del hepatocito. Por ello, al parecer no se requiere que la cadena de ADN positivo (corta) esté completa para la liberación del virión de la célula. Esto explica el hecho de que los genomas de los viriones extracelulares tienen la cadena de ADN positiva de longitud variable (11,23,40,46) (Fig. 4).

Hay evidencia de que el VHB es un virus oncógeno. Esto ha recibido apoyo por el hecho de que el ADN del VHB se integra en el genoma del huésped y porque las líneas celulares derivadas de esas neoplasias hepáticas contienen múltiples copias del genoma del VHB y expresan proteína de este último (23).

2.5.3. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL VHB

El diagnóstico de la infección por VHB depende de encontrar marcadores serológicos para antígenos del VHB y anticuerpos contra los mismos, los cuales se encuentran en diferentes tiempos y en diversas combinaciones a través del curso de la infección.

En el curso típico de la infección por VHB, el periodo de incubación fluctúa entre 45-120 días en la mayoría de los casos; periodos de incubación menores de 35 días o mayores de 150 días son raros. El HBsAg puede ser detectado en suero 30-60 días después de la exposición al VHB y persiste por periodos variables (5,37), alcanza un pico máximo durante la etapa aguda de la enfermedad y disminuye progresivamente hasta alcanzar niveles indetectables dentro de 4-6 meses (11). El HBeAg generalmente se identifica de 15 días a 1 mes de la aparición del HBsAg y su presencia se correlaciona con la replicación viral y una alta infectividad debido a la alta concentración de viriones en la sangre (5,23,37). El IgM anti-HBc aparece a los dos meses de la exposición y persiste aproximadamente 6 meses (5). Debido a que estos anticuerpos van dirigidos a la proteína principal de la nucleocápside, su aparición en suero indica replicación viral (11). La presencia de IgM anti-HBc puede ser de gran ayuda para diagnosticar la infección aguda durante la fase ventana, (es decir, entre la desaparición del HBsAg y antes de la aparición del anti-HBs), así como para diferenciarla de una infección crónica, anti-HBc adquiridos de manera pasiva (madre-hijo, transfusión sanguínea), o infección pasada (11, 24). Aunque la IgM anti-HBc declina con la recuperación, la IgG anti-HBc puede durar toda la vida. Durante la fase temprana de la convalecencia y antes de que el HBsAg desaparezca, el anti-HBe sustituye al HBeAg, lo cual indica la disminución en la replicación viral o el inicio de la convalecencia (5). Dentro de los próximos 6 meses, el anti-HBe ya no es detectado en el 30-50% de los pacientes (11). En menos del 5% de los casos agudos de hepatitis, el HBsAg no tiene niveles

detectables, pero puede encontrarse IgM anti-HBc, con o sin anti-HBe, como único indicador de la replicación viral activa. El término de la enfermedad se indica con la desaparición del HBsAg y la aparición del anti-HBs. El anti-HBs generalmente persiste toda la vida en el 80% de los pacientes, por lo que su presencia indica inmunidad a la infección (Fig. 5) (24).

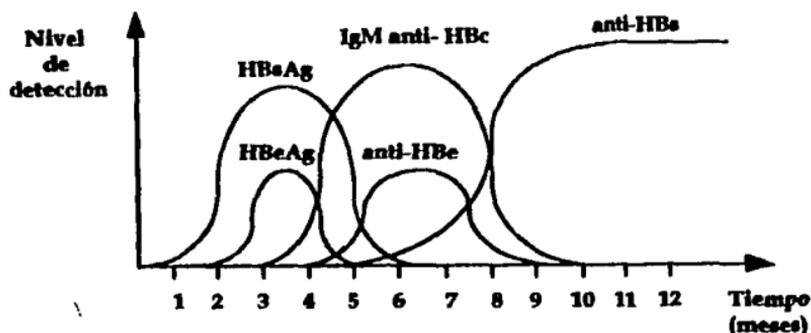


Figura 5. Curso serológico de la infección por el VHB

Es imposible predecir con certeza si la enfermedad evolucionará o no hacia la cronicidad, ya que el cuadro serológico es indistinguible al inicio de la misma.

Los portadores son identificados por la persistencia de HBsAg y anti-HBc por al menos 6 meses en presencia o ausencia de HBeAg o anti-HBe (24).

Típicamente, el paciente con hepatitis B crónica persiste con HBsAg y no produce anti-HBs; en el 20-40% de los casos se puede detectar simultáneamente HBsAg y anti-HBs pero el anticuerpo está dirigido a un subtipo de HBsAg distinto al HBsAg circulante, y por lo tanto, no confiere protección (30). La razón de la presencia simultánea de HBsAg y anti-HBs heterotípicos es desconocida, pero puede estar relacionada a una alteración en la respuesta inmune (24).

Existen diversas técnicas para realizar la detección de los marcadores serológicos, como radioinmunoensayos (RIA = radioinmunoassay), análisis inmunoenzimáticos (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay), hemaglutinación y aglutinación con partículas de látex. De ellos, los más sensibles son ELISA y RIA, pero ésta última posee una mayor especificidad.

Entre las técnicas más recientes se encuentra la detección del ADN del VHB mediante PCR (polimerase chain reaction) e hibridación de

ADN, sin embargo dichas técnicas sólo se manejan a nivel investigación.

Actualmente no se cuenta con un sistema de cultivo celular adecuado para emplearlo como herramienta diagnóstica, sino únicamente para estudios de morfología y replicación virales (11).

2.5.4. EPIDEMIOLOGIA DEL VHB

Aunque el HBsAg ha sido encontrado en el suero de ciertas especies de primates no humanos (chimpancé y gibón), el hombre sigue siendo el principal reservorio del VHB (26).

Las partículas virales infectivas se encuentran principalmente en la sangre, pero también ha sido detectado en otras secreciones y excreciones corporales, tales como semen, saliva, fluidos nasofaríngeos y fluido menstrual (5,11). No hay evidencia de que ocurran infecciones por aire. Las heces no se consideran como fuente de infección, presumiblemente porque el virus es inactivado por las enzimas presentes en la mucosa intestinal o de la flora bacteriana (28). Algunas veces el virus está presente en la orina (4,11), pero ello es de limitada importancia epidemiológica. Otros fluidos que han sido positivos para el HBsAg son el líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, lágrimas y leche materna (4,5,28). De hecho debería asumirse que todo fluido biológico de pacientes infectados con VHB puede ser infeccioso y capaz de transmitir el VHB; no obstante, es en sangre e hígado donde hay mayor concentración de VHB y en menor grado saliva y semen (11).

Ciertos grupos que tienen contacto frecuente con sangre o productos de la sangre presentan un elevado riesgo de contraer el VHB, por ejemplo, residentes y personal de instituciones penales o médicas, pacientes politransfundidos, pacientes y personal de las unidades de oncología, hemodiálisis, y trasplantes, usuarios de drogas inyectables que comparten agujas, varones homosexuales, individuos heterosexuales promiscuos, hemofílicos, personas muy cercanas a portadores crónicos, recién nacidos de mujeres con hepatitis B aguda o crónica (1,5) y trabajadores del área de la salud, especialmente dentistas, cirujanos y personal del laboratorio clínico (1, 21).

La principal vía de transmisión del VHB es la parenteral, si bien ha disminuido notablemente gracias a la búsqueda de rutina del HBsAg y anti-HBc en la sangre y sus productos, y a la sustitución de los donadores profesionales pagados por donadores voluntarios; esta vía de transmisión es común entre los drogadictos que comparten agujas (28).

El VHB puede transmitirse vía percutánea mediante pinchazos accidentales con agujas contaminadas (1,22), en cuyo caso el riesgo de contraer la infección alcanza el 30% (22). La transmisión del VHB por vía percutánea también puede ocurrir como resultado de una inoculación inaparente o inadvertida debida al uso de rastrillos, cepillos dentales, tatuajes, acupuntura u horadación de los lóbulos de las orejas (11).

La transmisión sexual del VHB es bien conocida desde que se comenzó a relacionar dicha infección con los individuos que asisten a las clínicas de enfermedades de transmisión sexual, sobre todo en prostitutas y hombres homosexuales, quienes realizan prácticas sexuales como las relaciones ano-genitales que involucran un trauma local en el ano y recto, provocando lesiones que hacen al individuo más susceptible de contraer la infección (28). No obstante, desde 1982, la proporción de hombres homosexuales con hepatitis B ha disminuido, lo cual probablemente refleja un cambio en sus prácticas gracias a las precauciones tomadas para no contraer el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (7).

Diversos estudios realizados concluyen que aunque el inóculo de HBV sea grande o la concentración de virus sea alta, la transmisión oral por saliva u objetos contaminados con saliva es probablemente infrecuente en la naturaleza, si bien la transmisión percutánea por mordida humana puede ocurrir (28).

El VHB también puede transmitirse por el transplante de órganos (hígado, riñón), reportándose en nuestro medio un porcentaje de riesgo de hasta un 35% (27).

La transmisión vertical del VHB de madre portadora a hijo frecuentemente ocurre al nacimiento. Esta vía de transmisión es particularmente importante, dado que más del 90% de estos niños se vuelven portadores de VHB (7).

Otro factor importante encontrado recientemente es que el VHB puede transmitirse entre niños y adolescentes mediante el contacto interpersonal durante el juego y las actividades cotidianas (7).

Se estima que en nuestro país existe un total de 200,000 a 300,000 personas portadoras de antígeno de superficie del VHB. Anualmente se infectan por este virus 100,000 personas de las cuales 25,000 presentan un cuadro de hepatitis viral aguda (18).

2.5.5. PROFILAXIS DEL VHB

La principal medida de prevención para la hepatitis B es vacunar a todo individuo que pertenezca a algún grupo de riesgo. Sin embargo, generalmente dicha vacuna sólo se administra a trabajadores de la salud debido al alto costo de la vacuna, la falta de información al público en general y a la falta de acceso a la mayoría de la población de alto riesgo.

Existen dos tipos de vacunas contra la hepatitis B, las cuales proporcionan inmunización activa contra la infección por VHB. La primera consiste en una vacuna derivada de plasma, que consiste en una suspensión de partículas de HBsAg purificadas de plasma humano, y que actualmente sólo se emplea en sujetos alérgicos a la levadura. La segunda es una vacuna recombinante producida a partir de Saccharomyces cerevisiae a la cual se le ha insertado el gen para el HBsAg (5,7).

Se requieren tres dosis de la vacuna vía intramuscular para inducir una respuesta de anticuerpos adecuada en el 90% de los adultos sanos y en >95% de los menores de 19 años de edad. Los títulos

protectores de anticuerpos inducidos por la vacuna declinan con el tiempo. Aproximadamente del 30% al 50% de los individuos pierden dichos títulos al cabo de 7 años; no obstante, dichos sujetos aún conservan inmunidad frente al VHB debido a la "memoria" de los linfocitos B y T, los cuales pueden montar una respuesta inmunológica adecuada cuando el paciente entra en contacto con el VHB. El Centro para el Control de Enfermedades (Center for Disease Control) no recomienda la administración de una dosis refuerzo de la vacuna de hepatitis B durante los primeros siete años después de la administración de la vacuna a menos que la respuesta de anticuerpos sea <10 mUI/ml (5,7).

El sitio ideal para la administración de la vacuna es el deltoides, ya que con la administración en el glúteo la vacuna puede ser inyectada en la grasa subcutánea, ocasionando una hiporespuesta (7).

En general, los pacientes de hemodiálisis y/o inmunosuprimidos (aquellos a los que se les administran drogas inmunosupresoras o infectados con el VIH), requieren una concentración en la dosis de la vacuna de dos o cuatro veces más de la normal (dosis normal: 10-40 μ g de proteína de HBsAg/ml) y un número mayor de dosis (cuatro dosis) para inducir una respuesta adecuada de anticuerpos (5). De hecho, la vacuna debería aplicarse a todo individuo perteneciente a algún grupo de riesgo.

2.6. VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

La posible existencia de formas adicionales de hepatitis viral asociada a transfusión que no fuera la hepatitis B, rara vez fue considerada antes de 1970. Con la introducción de pruebas de rutina para la detección del HBsAg en productos sanguíneos mediante inmunoensayos específicos y sensibles; y con la sustitución de donadores profesionales por donadores altruistas, la incidencia de hepatitis B postransfusional fue dramáticamente reducida. Sin embargo, un número significativo de casos de hepatitis postransfusional de etiología desconocida continuaban ocurriendo. Al principio se pensó que estos casos reflejaban la insensibilidad de ensayos para el HBsAg, o a la posibilidad de que una gran proporción de casos se debía a una infección con virus de la hepatitis A (VHA) (11). Esto último fue descartado por estudios realizados en voluntarios donde la transmisión parenteral fue documentada experimentalmente, encontrándose como un hecho muy raro (15). Además, se observó que el periodo de incubación era distinto (más corto que la hepatitis B y más largo que la hepatitis A). Todo esto hizo pensar en una tercera entidad, muy aparte de la hepatitis infecciosa y la sérica, creándose el término de hepatitis no-A no-B para estos episodios (11,24,50).

La hepatitis no-A no-B de transmisión parenteral representa en la actualidad más del 90% de los casos de hepatitis postransfusional

(22,39,40). Recientemente, se ha identificado al principal agente de la hepatitis no-A no-B, denominándosele "virus de la hepatitis C (VHC)" (9,11,46,39).

2.6.1. MORFOLOGIA DEL VHC

El VHC tiene un diámetro de 30-60 nm, posee una envoltura lipídica que es esencial para su replicación y es sensible al cloroformo. Contiene un genoma de ARN de una sola cadena positiva de aproximadamente 9500 nucleótidos. De acuerdo a estas características, el VHC es probablemente un miembro de la familia Flaviviridae, pero puede estar más relacionado con el género Pestivirus. Se considera que las proteínas del VHC están codificadas de la misma manera que los flavivirus. Los flavivirus, así como en los pestivirus, presentan proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas estructurales del virus son una proteína de nucleocápside llamada "C", una glicoproteína asociada a la envoltura llamada "M" y una segunda glicoproteína de envoltura llamada "E". Las proteínas no estructurales se denominan NS1, NS2, NS3, NS4, y NS5, aunque sólo se sabe con certeza que NS3 es una proteasa viral y NS5 es una ARN polimerasa dependiente del ARN viral (Fig. 6) (51).

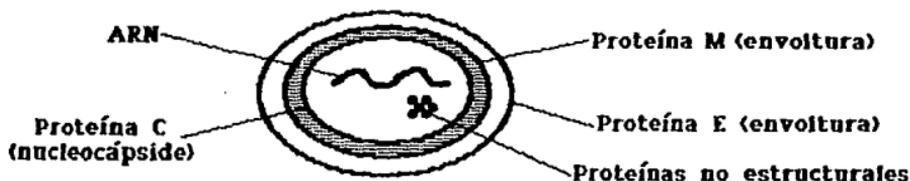


Figura 6. Representación esquemática del VHC

2.6.2. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL VHC

Los anticuerpos contra el VHC aparecen dentro de las cuatro semanas hasta un año después del contacto inicial con el virus (2,47); en el 90% de los pacientes se desarrollan anticuerpos contra el VHC dentro de 6-9 meses posteriores al contacto con el agente viral (38). No obstante, muchos pacientes con hepatitis C presenta una respuesta retrasada de anticuerpos. En pacientes con hepatitis C crónica, los anti-VHC persisten por muchos años (2,16); sin embargo, en algunos pacientes con la resolución bioquímica de su hepatitis, el anti-VHC puede desaparecer después de un intervalo que puede fluctuar desde cuatro hasta once años (16,47).

Un resultado anti-VHC positivo puede indicar que la persona cursa con una infección actual, ya que dichos anticuerpos no son protectores y por lo tanto su presencia no indica inmunidad por una infección pasada (24,35). Es por ello que se requiere de una evaluación clínica y un seguimiento de los individuos anti-VHC positivos para saber si se trata de una infección aguda, crónica o pasada (43).

Los anti-VHC no son detectables en el 10-20% de los pacientes con posible hepatitis C crónica porque son incapaces de montar una respuesta inmunológica adecuada o bien el paciente se encuentra en el periodo de ventana (24).

En el primer ensayo inmunoenzimático para la detección de anti-VHC se utilizó el antígeno C100-3, el cual corresponde a una proteína viral no estructural (2,43). Este tipo de prueba ha sido desarrollado para la detección de anticuerpos del tipo IgG, ya que no han sido identificados anticuerpos del tipo IgM, ni tampoco existen pruebas de detección del antígeno del VHC (16).

En un estudio realizado por Roggendorf M. y Deinhardt F., en sujetos que adquirieron la infección por VHC con 1 ml de inmunoglobina usada para prevenir la sensibilización Rh, se observaron dos patrones: altos niveles de anticuerpos se asociaron a enfermedad crónica y bajos niveles de anticuerpos con la recuperación. Títulos por arriba de 10^4 indicaron una expresión continua de proteínas no estructurales del VHC debida a una respuesta inmunológica severa (38).

Respecto a la discusión de si el suero anti-VHC es infectante aún después de cierto tiempo, se ha demostrado que las muestras séricas obtenidas a lo largo de un periodo de seis años del mismo humano (con infección crónica asintomática por el VHC) son capaces de transmitir la infección a chimpancés inoculados vía intravenosa; esto demuestra la persistencia del virus en la sangre del paciente por un intervalo de tiempo de al menos seis años, aún cuando sus niveles de aminotransferasa sérica hayan regresado temporalmente a niveles normales (45).

Actualmente se cuenta con pruebas de laboratorio tales como ELISA, de las cuales las de primera generación detectan anticuerpos dentro de las 24 semanas que siguen al inicio de los síntomas (24). Las de tercera generación son capaces de detectar anti-VHC desde las primeras cuatro semanas del inicio de los síntomas. Se ha sugerido que los resultados falsos positivos para el anti-VHC pueden estar originados por una enfermedad autoinmune hepática y que dicho fenómeno puede causar reacciones cruzadas con sustancias del suero como auto-anticuerpos y anti-idiotipo(2,32); y se ha reportado un 86% de falsos positivos en la paraproteinemia (2).

Otro tipo de técnica es el RIBA (recombinant immunoblot assay) del cual hay dos tipos, uno con los antígenos S-1-1 y C-100 y otro llamado 4-RIBA que además de los dos mencionados antígenos posee el C33c que es de la región no estructural del VHC y el C22 que está asociado a la nucleocápside o "core" del VHC. Esta última técnica es más sensible y específica, aunque como prueba confirmatoria sólo se cuenta con el PCR para la detección del ARN viral (48).

En algunos estudios se ha demostrado que las muestras repetidamente reactivas por ELISA y RIBA tienen un potencial muy elevado para transmitir el VHC, ya que el 70% de dichas muestras tienen ARN del VHC (detectado por PCR) (49).

2.6.3. EPIDEMIOLOGIA DEL VHC

La hepatitis C se encuentra en todas las partes del mundo donde se ha realizado una búsqueda de anti-VHC. No existe otro reservorio animal en la naturaleza a excepción del hombre. El VHC se transmite principalmente por vía parenteral (11,35). Se presenta con frecuencia después de transfusiones sanguíneas, pinchazos accidentales con agujas contaminadas con sangre, en usuarios de drogas intravenosas, tatuajes o acupuntura (11,16,42).

Otros mecanismos de transmisión son el trasplante de órganos (35) y la transmisión sexual, si bien no todos los estudios están de acuerdo en esto último (7,29,33,39,42). La transmisión materno-neonatal ocurre en hijos nacidos de madres que cursaron con la infección aguda durante el tercer trimestre del embarazo (11). No obstante, en el aproximadamente 40% de las infecciones con el VHC la vía de transmisión permanece incierta, dando lugar a una hepatitis C esporádica, donde al parecer una exposición accidental percutánea pudiera ser la causa (11,7,42).

El contacto personal cercano como vía de transmisión ha sido reportado, pero no se ha demostrado del todo, por lo que el riesgo real por dicha transmisión es desconocido (9).

Incluso se considera, aunque no se cuenta con ninguna evidencia, que el VHC podría transmitirse por insectos, lo cual explicaría en parte el extraño patrón epidemiológico en ciertas regiones del mundo (20).

2.6.4. PROFILAXIS DEL VHC

No existe vacuna que confiera protección contra el VHC, de manera que la única estrategia a seguir es impedir la diseminación del VHC. En bancos de sangre es importante el establecimiento de la detección de anti-VHC de manera rutinaria a fin de disminuir la frecuencia de la hepatitis C postransfusional. Toda persona en contacto frecuente con sangre o productos de la sangre debe llevar a cabo las medidas de seguridad universales (como uso de guantes de látex, cubrebocas, batas, lentes, no reencapuchar agujas, etc.) para evitar el riesgo ocupacional. Asimismo, deben evitarse conductas de alto riesgo como el uso de drogas intravenosas y la promiscuidad sexual (7).

2.7. VIRUS DE LA HEPATITIS DELTA (VHD)

A mediados de los 70's Mario Rizzeto, gastroenterólogo de Turín, Italia detectó un antígeno nuclear no conocido en los hepatocitos de pacientes con hepatitis B crónica. Dicho antígeno nunca fue encontrado en biopsias de pacientes con hepatitis no-B, pero tampoco en todos los pacientes con hepatitis B. De manera similar, sólo una proporción de esos pacientes tenían anticuerpos contra ese antígeno nuevo. Inicialmente se creyó que se trataba de un antígeno desconocido del VHB; posteriormente se le llamó virus de la hepatitis delta (VHD) y fue reportado por vez primera en 1977 (11).

2.7.1. MORFOLOGIA DEL VHD

El VHD es un virus defectuoso que puede causar infección sólo en presencia de la infección activa por el VHB. El VHD es una partícula viral de 35-37 nm que posee una cadena sencilla de ARN (peso molecular de 500,000) y una proteína antigénica interna (HDAg) cubierto con HBsAg como proteína de superficie (5).

2.7.2. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL VHD

La fase aguda de la enfermedad por VHD se puede identificar por la presencia de HDAg en suero, sin embargo esto es poco frecuente. La técnica de diagnóstico más adecuada durante la infección aguda es el análisis inmunoenzimático para la detección de IgM anti-HD. Si la hepatitis delta aguda se resuelve, el HDAg y el IgM anti-HD desaparece a las 3-4 semanas, aunque los anti-HD totales pueden permanecer detectables por uno o dos años. Por lo tanto la presencia en suero de anti-HD totales no discierne entre una infección resuelta o activa por el VHD (37) (Fig. 7).

El diagnóstico de la infección crónica por el VHD se establece al demostrar la presencia de HDAg en tejido hepático mediante técnicas de inmunofluorescencia; sin embargo esta técnica es de tipo invasivo, es poco práctico para realizar un seguimiento al paciente, y está sujeto a error en la toma de muestra del tejido, por lo que la serología ofrece una alternativa más sencilla (37). En este caso la hepatitis delta crónica puede diagnosticarse tentativamente cuando los signos clínicos son evidentes y se encuentran títulos elevados de HBsAg y títulos altos sostenidos de anti-HD totales durante 6 meses o más (24).

Se han reportado casos de pacientes transplantados por una cirrosis terminal por el VHD, los cuales se reinfectaron con el VHD, pero no expresaron la hepatitis delta. En estos pacientes las pruebas hepáticas y séricas para el VHD se hallaban positivas en ausencia de marcadores de la reinfección por VHB. También en muchos pacientes transplantados reinfectados que experimentaron

recrudescencia de la enfermedad hepática, el VHD se volvió a presentar tempranamente sin recurrencia simultánea del VHB. La enfermedad hepática regresa sólo si el VHB también regresa al injerto. Este modelo de transplante de hígado indica que el VHD es capaz de establecer una infección independientemente del VHB, pero que no es patógeno por sí mismo. La activación de la expresión de la enfermedad requiere de una interacción con el VHB (20).

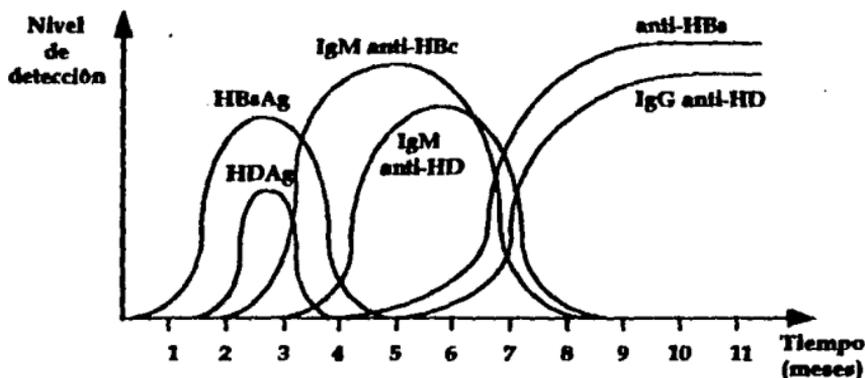


Figura 7. Curso serológico de la infección por el VHD

2.7.3. EPIDEMIOLOGIA DEL VHD

Las vías de transmisión del VHD son similares a las del VHB. La infección por el VHD afecta a los individuos en alto riesgo de contraer la infección por el VHB, particularmente en usuarios de drogas intravenosas y sujetos politransfundidos (5).

Todo individuo portador del HBsAg se encuentra en un riesgo elevado de contraer el VHD, especialmente si participan en actividades que las pongan frente a una exposición repetida al VHB. La infección por el VHD puede ocurrir como coinfección con el VHB o superinfección de un portador del VHB, cada uno de los cuales generalmente causa un episodio de hepatitis aguda. Ambos tipos de infección pueden provocar hepatitis fulminante (5).

Actualmente no hay medios que puedan prevenir la infección por VHD en portadores del HBsAg ya sea antes o después de la exposición (5).

2.7.4. PROFILAXIS DEL VHD

Dado que el VHD es dependiente del VHB para su replicación, la prevención de la infección de la hepatitis B será suficiente para prevenir la infección con el VHD en personas susceptibles a contraer la hepatitis B. La sangre y fluidos corporales de todo individuo positivo para el VHB y VHD deberá tratarse con las mismas precauciones que si estuviera infectado únicamente con el VHB (5).

2.8. TRATAMIENTO DE LAS HEPATITIS VIRALES

El interferón alfa-2b es la única terapia que actualmente ha demostrado cierto grado de efectividad contra los virus causales de hepatitis. Los interferones son proteínas que tienen efectos antivirales e inmunomoduladores. Existen tres clases de interferones: alfa, beta y gamma, cada uno de los cuales tienen diferentes estructuras y propiedades bioquímicas. El interferón alfa es producido por los linfocitos en respuesta a la presencia de los virus. El interferón beta es producido por los fibroblastos en respuesta a la infección viral. En cambio, el interferón gama posee efectos inmunomoduladores más potentes que actividad antiviral. La actividad antiviral de los interferones radica en la reducción de la entrada de los virus a la célula blanco, inhibir el desnudamiento viral e inhibición de la síntesis de proteínas virales.

Sin embargo, existen ciertos efectos colaterales que llevan a los pacientes a suprimir la terapia, como fatiga, mialgias, fiebre, trombocitopenia y leucopenia. Incluso puede presentarse depresión y alteraciones del estado mental, proteinuria y anomalías en el ritmo cardíaco (5).

Sin embargo, no existe un tratamiento totalmente efectivo, ya que se ha demostrado que, si bien la aplicación a largo plazo del interferón es capaz de controlar la enfermedad en algunos pacientes, no logra eliminar la infección, ya que al suspender el tratamiento en la mayoría de los casos se produce una reactivación de la replicación viral (6).

Otra alternativa es el uso de inmunosupresores como los corticosteroides, sin embargo, se ha demostrado que su uso puede exacerbar la enfermedad.

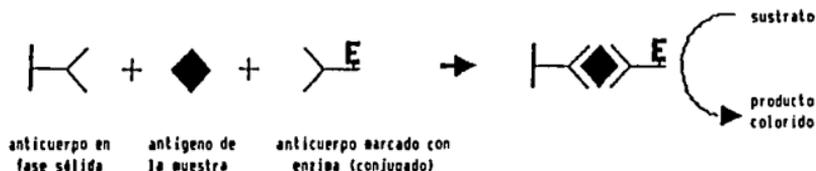
El arabinósido de adenina (Ara-A) y su derivado monofosfato (Ara-AMP) son agentes antivirales potentes, pero provocan una alta neurotoxicidad (6).

2.9. FUNDAMENTO DE LOS ENSAYOS INMUNENZIMATICOS

La técnica empleada en los diferentes ensayos fue la de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), la cual se basa en dos fundamentos llamados principio del "sandwich" y principio de inhibición del "sandwich".

2.9.1. Principio del "sandwich" para detección de antígenos:

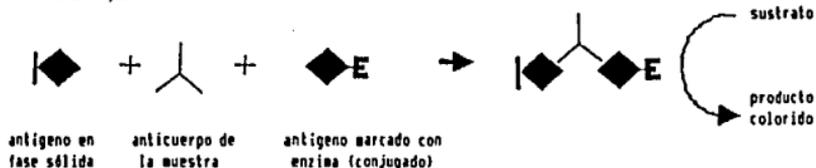
1. Se tiene en una fase sólida un anticuerpo dirigido contra el antígeno que se busca.
2. Se añade la muestra a analizar, la cual puede contener el antígeno buscado que se va a unir a la fase sólida para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Se incuba y lava para eliminar lo no adherido.
3. Posteriormente se agrega el conjugado, que va a ser un anticuerpo dirigido contra el antígeno buscado, ligado a una enzima; el conjugado se unirá al complejo antígeno-anticuerpo. Se incuba y lava.
4. Por último se agrega el sustrato enzimático, el cual por la acción de la enzima va a dar un producto colorido. Se incuba y se detiene la reacción con ácido diluido.



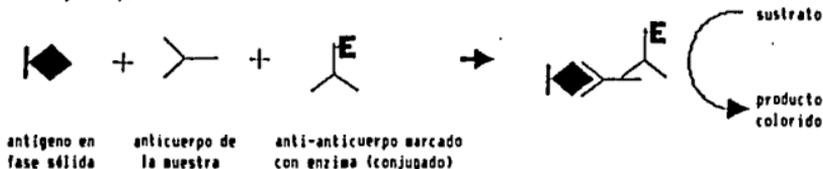
2.9.2. Principio del "sandwich" para detección de anticuerpos:

1. Se tiene en una fase sólida un antígeno contra el cual va dirigido el anticuerpo que se busca.
2. Se añade la muestra a analizar, la cual puede contener el anticuerpo buscado que se va a unir a la fase sólida para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Se incuba y lava.
3. Posteriormente se agrega el conjugado, que va a ser un antígeno para el anticuerpo buscado o un anti-anticuerpo contra el anticuerpo que se busca, ligados a una enzima; el conjugado se unirá al complejo antígeno-anticuerpo. Se incuba y lava.
4. Por último se agrega el sustrato enzimático, el cual por la acción de la enzima va a dar un producto colorido. Se incuba y se detiene la reacción con ácido diluido.

Primera opción



Segunda opción



2.9.3. Principio de inhibición del "sandwich" (o ensayo competitivo) para detección de anticuerpos con antígeno en fase sólida:

1. Se tiene en una fase sólida un antígeno contra el cual va dirigido el anticuerpo que se busca.
 2. Se añade la muestra a analizar, que puede contener el anticuerpo buscado.

3. Enseguida se agrega el conjugado, que va a ser un anticuerpo contra el antígeno en fase sólida, ligado a una enzima. Se incuba y lava.

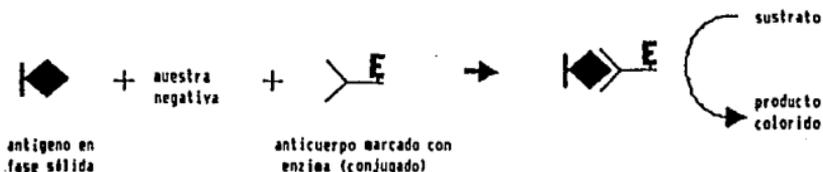
4. Por último se agrega el sustrato enzimático, el cual por la acción de la enzima va a dar un producto colorido. Se incuba y se detiene la reacción con ácido diluido.

En este caso, si la muestra es positiva no habrá desarrollo de color, ya que la fase sólida será ocupada por los anticuerpos de la muestra, impidiendo total o parcialmente al conjugado unirse, lo cual va a depender de la cantidad de anticuerpos de la muestra.

RESULTADO POSITIVO:



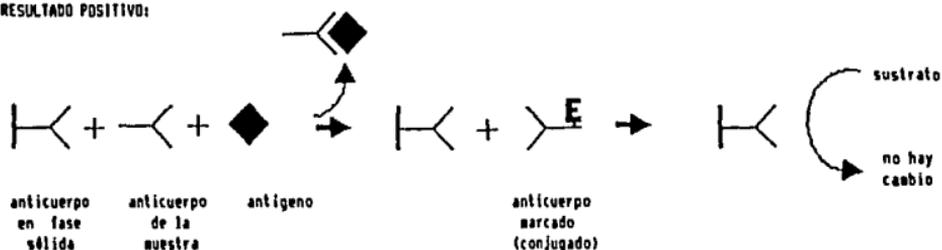
RESULTADO NEGATIVO:



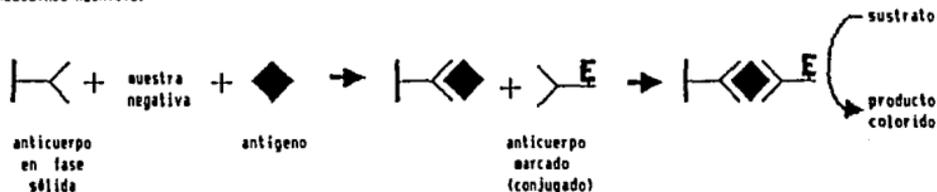
2.9.4. Principio de inhibición del "sandwich" (o ensayo competitivo) para detección de anticuerpos con anticuerpo en fase sólida:

1. Se tiene en una fase sólida un anticuerpo contra el antígeno contra el cual también va dirigido el anticuerpo que se busca.
 2. Se añade la muestra a analizar, que puede contener el anticuerpo buscado, enseguida se agrega el antígeno contra el que van dirigidos los anticuerpos en fase sólida y los buscados en la muestra; o puede incubarse primero la muestra junto con el antígeno, y esta mezcla se añade a la fase sólida. Se incuba y lava.
 3. Posteriormente se agrega el conjugado, que va a ser un anticuerpo dirigido contra el antígeno adicionado, ligado a una enzima.
 4. Por último se agrega el sustrato enzimático, el cual por la acción de la enzima va a dar un producto colorido. Se incuba y se detiene la reacción con ácido diluido.
- Como en el principio anterior, si la muestra es positiva no habrá desarrollo de color, ya que los anticuerpos de la muestra captarán al antígeno impidiendo que éste se una al anticuerpo en fase sólida, consecuentemente el conjugado no podrá unirse mediante el antígeno a la fase sólida.

RESULTADO POSITIVO:



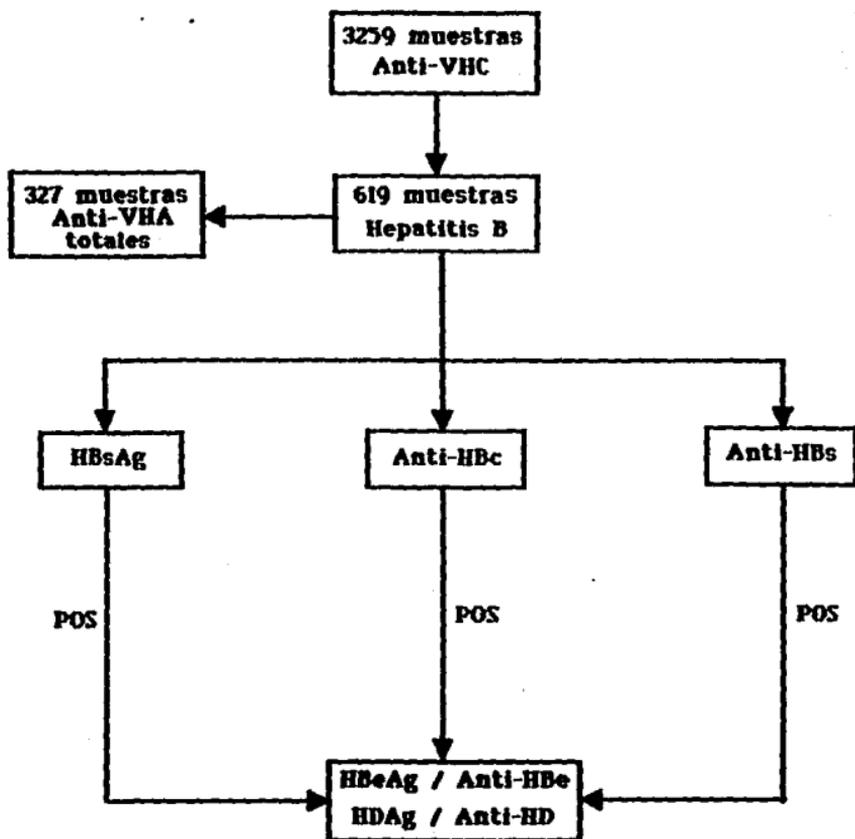
RESULTADO NEGATIVO:



CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA GENERAL



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

El estudio se basó en el examen de 3,259 muestras séricas obtenidas de la población mexicana de uno a 98 años de edad, provenientes de todas las entidades federativas del país, de los distintos estratos socioeconómicos y de asentamientos tanto urbanos como rurales. Los sueros fueron proporcionados por el Banco Nacional de Sueros de la Secretaría de Salud:

ESTADO	NO. DE SUEROS
Aguascalientes	30
Baja California Norte	60
Baja California Sur	13
Campeche	21
Coahuila	81
Colima	18
Chiapas	130
Chihuahua	97
Distrito Federal	331
Durango	54
Guanajuato	159
Guerrero	108
Hidalgo	74
Jalisco	216
México	393
Michoacán	143
Morelos	47
Nayarit	32
Nuevo León	123
Oaxaca	122
Puebla	158
Querétaro	43
Quintana Roo	20
San Luis Potosí	82
Sinaloa	89
Sonora	74
Tabasco	62
Tamaulipas	89
Tlaxcala	30
Veracruz	246
Yucatán	55
Zacatecas	52

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Algodón
Bulbo de seguridad
Microplacas con pocillos de fondo en 'v'
Cubrebocas
Gasa
Guantes desechables de látex
Pipetas automáticas de 10, 20, 100 y 1000 µl
Pipeta multicanal de 200 µl
Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml
Probetas de vidrio de 250 y 500 ml
Puntas desechables de plástico para pipeta automática
Reloj con alarma
Vasos de precipitado de 250 y 500 ml

3.2.3. REACTIVOS

3.2.3.1. REACTIVOS QUIMICOS

Agua destilada
Alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) al 70%
Acido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M
Cloruro de benzalconio al 10%
Hipoclorito de sodio (NaClO) 1:10

3.2.3.2. REACTIVOS DE DIAGNOSTICO

HAVAB EIA
ABBOTT
Lote: 7B320 M301
Caducidad: 13-Diciembre-1993

HBsAg HEPANOSTIKA
Organon-Teknika
Lote: 20309728
Caducidad: 28-Febrero-1993

Anti-HBc MONOLISA
Diagnostics Pasteur
Lote: 3C111-U
Caducidad: 1-Diciembre-1993

Anti-HBs HEPANOSTIKA
Organon-Teknika
Lote: 20403802
Caducidad: 28-Septiembre-1993

HBeAg / Anti-HBe HEPANOSTIKA
Organon-Teknika
Lote: 20312810
Caducidad: 28-Agosto-1993

Anti-HCV MONOLISA
Diagnostics Pasteur
Lote: 3C533. X.
Caducidad: 15-October-1993

UBI HCV EIA
Organon-Teknika
Lote: 30505058
Caducidad: 28-Abril-1994

Anti-HCV ENZYGNOST
Behring
Lote: 24299
Caducidad: 12-Mayo-1993

Lia-Tek III
Organon-Teknika

HDag / Anti-HD HEPANOSTIKA
Organon-Teknika

3.2.4. EQUIPO

Heating Block Microelisa System
Organon-Teknika
Model N202 110
Serie 23011

I.P.S. Microplate Incubator
Kallestad Diagnostics
Product Number 103022 A
Serie 92101499

LP 400 Microplate Reader
Kallestad Diagnostics
Product Number 103024 A
Serie 10505 2392

LP 35 Microplate Washer
Kallestad Diagnostics
Product Number 103020 A
Serie U5695

Microwell System Washer 200
Organon-Teknika
Cat. No. 00176 / P
Serie 89-053

PROQUANTUM Bead Washer and Reagent Dispenser
Abbott Laboratories
No. 1405-01
Serie No. R2-1925

QUANTUMATIC DUAL WAVE LENGHT ANALYZER
Abbott laboratories
No. 7523-02
Serie No. RQ-0248

Water Bath (0-100 C)
Precision Scientific Group
Cat. 66634
Serie No. 21AM-B

3.3 METODOLOGIA

3.3.1. TAMANO DE MUESTRA.

Como en este estudio se estimaron tres prevalencias, se manejaron tres tamaños de muestra calculados a partir de prevalencias teóricas estimadas en base a estudios seroepidemiológicos de menor magnitud efectuados en el país. Por lo tanto, se asumen las siguientes prevalencias de hepatitis:

HEPATITIS	PREVALENCIA
A	>90%
B	5%
C	1%

Los tamaños de muestra fueron establecidos y proporcionados por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. Los sueros fueron seleccionados con un muestreo sistemático, y el tamaño de muestra asignado a cada estado fue proporcional a su población (según el Censo 1990). De los sueros seleccionados para estimar la prevalencia de hepatitis C, se tomaron dos submuestras para estimar la prevalencia de hepatitis A y hepatitis B, de tal manera que los tamaños de muestra fueron los siguientes:

HEPATITIS	NO. DE SUEROS
A	327
B	619
C	3259

Como el agente delta depende de la presencia del VHB, la búsqueda del VHD se realizó únicamente en sueros positivos a cualquier marcador serológico del VHB.

3.3.2. SEROLOGIA.

Para la detección de cada agente viral causante de hepatitis se buscaron los siguientes marcadores serológicos:

HEPATITIS	MARCADOR SEROLOGICO
A	Anti-VHA totales
B	HBsAg Anti-HBc totales Anti-HBs HBeAg Anti-HBe
C	Anti-VHC
D	HDAg Anti-HD

3.3.3. ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS.

A continuación se describen los 10 ensayos inmunoenzimáticos que se utilizaron en la búsqueda de los diferentes marcadores serológicos.

3.3.3.1. HAVAB EIA (Abbott Laboratories)

HAVAB EIA es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio de inhibición del "sandwich", para la detección de anticuerpos totales para el virus de la hepatitis A (anti-VHA) en suero o plasma humanos.

Reactivos:

1. "PERLAS" SENSIBILIZADAS: Esferas de poliestireno recubiertas con virus de la hepatitis A.
2. CONTROL NEGATIVO: Plasma humano no reactivo para anti-VHA, HBsAg y anti-VIH-1.
3. CONTROL POSITIVO: Plasma humano reactivo para anti-VHA, no reactivo para HBsAg y anti-VIH-1.
4. SOLUCION DE LAVADO: Agua bidestilada.
5. CONJUGADO: Anti-VHA humano marcado con peroxidasa de rábano picante en tampón.
6. SUSTRATO: Tabletas de orto-fenilendiamina (OPD).

7. DILUYENTE DE SUSTRATO. Solución reguladora de citrato-fosfato con 0.02% de peróxido de hidrógeno.

8. SOLUCION DE PARO: Acido sulfúrico 1N.

Nota: Los reactivos sin preparar (tanto de éste como los de los otros ensayos) guardados a 2-8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad que se indica en el estuche.

Procedimientos:

1. Pipetear 10 µl de cada control y muestra en los pocillos apropiados de las placas de reacción (Tres controles negativos y dos controles positivos).
2. Pipetear 200 µl de conjugado en cada pocillo conteniendo control o muestra.
3. Añadir cuidadosamente una esfera a cada pocillo conteniendo control o muestra.
4. Cubrir con un adhesivo e incubar 3 hrs. a 40°C; ó 18 a 24 hrs. a 15-30°C.
5. Lavar las perlas con 5 ml de solución de lavado cada una utilizando el lavador automático de perlas.
6. Transferir las perlas a los tubos de ensayo anexos al equipo.
7. Pipetear 300 µl de solución de OPD recién preparada a cada tubo.
8. Cubrir e incubar 30 min. A 15-30°C.
9. Parar la reacción añadiendo 1 ml de la solución de paro a cada tubo.
10. Lectura fotométrica. Leer (dentro de las dos horas siguientes al paso 9) la absorbancia de la solución de los pocillos a 492 nm.

Cálculo de Resultados (establecido por el fabricante):

1. Determinar el promedio de los controles negativos: todo control negativo debe caer dentro de 0.7 a 1.3 veces el promedio de éstos, si uno de ellos se encuentra fuera de este rango, descartarlo y recalcular el promedio; si dos controles negativos caen fuera del rango, la prueba deberá repetirse.
2. Determinar el promedio de los controles positivos fuertes.

Para que la prueba sea válida, el valor de CN-CP \geq 0.400. Si ese no fuere el caso, el motivo puede ser una técnica incorrecta o un deterioro del reactivo y se deberá repetir el ensayo.

Calculo del valor de corte:

El valor de corte es igual a $\frac{CN - CP}{2}$

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M <$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M >$ valor de corte.

NOTA: Toda muestra inicialmente positiva debe repetirse ya que pueden presentarse ocasionalmente reacciones positivas falsas. Se recomienda que las muestras repetidamente positivas sean investigadas mediante pruebas adicionales más específicas.

3.3.3.2. HEPANOSTIKA HBsAg (Organon Teknika)

Hepanostika HBsAg es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio del "sandwich", para la detección del antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) en suero o plasma humano.

Reactivos:

1. TIRAS MICRODELISA: Tiras con 12 pocillos recubiertos con anti-HBs monoclonal.
2. CONTROL NEGATIVO: contiene suero humano HBsAg negativo.
3. CONTROL POSITIVO DEBIL: contiene 1 U de HBsAg.
4. CONTROL POSITIVO FUERTE: contiene 10 U de HBsAg.
5. TABLETA DE PEROXIDO DE UREA.
6. CONJUGADO: anti-HBs marcado con peroxidasa de rábano picante.
7. SUSTRATO: Tabletas de orto-fenilendiamina (OPD).
8. SOLUCION DE LAVADO. Solución reguladora de fosfato
9. SOLUCION DE PARO: ácido sulfúrico 1 ó 2 mol/l.

Procedimiento:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con el saquito de gel de sílice dentro. Durante el proceso, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. Pipetear 100 µl de cada muestra y de cada control en los pocillos; incluyendo un control negativo, un positivo débil y un positivo fuerte por cada tira.
3. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 60 min a 37 °C, ó 30 min a 50 °C.
4. Lavar cada pocillo. Aspirar por completo el líquido de todos los pocillos haciendo descender una punta aspiradora hasta el fondo; hay que procurar no raspar la superficie del fondo; después de la aspiración llenar los pocillos con 300 µl de solución de lavado; aspirar el líquido al menos 30 seg después del llenado. Realizar esta operación cuatro veces.
5. Pipetear 100 µl de conjugado .

6. Incubar 60 min a 37 °C.
7. Lavar cuatro veces.
8. Pipetear 100 µl de sustrato.
9. Incubar 30 min a 20-25 °C en la oscuridad.
10. Parar la reacción añadiendo 100 µl de la solución de paro a cada pocillo (en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que la solución de sustrato).
11. Lectura fotométrica. Leer (dentro de las dos horas siguientes al paso 10) la absorbancia de la solución a 492 nm.

Cálculo de Resultados (establecido por el fabricante):

Los cálculos deben hacerse por separado para cada soporte.

Abreviaturas:

CN = absorbancia media de los controles negativos.

CPd = absorbancia media de los controles positivos débiles.

CPf = absorbancia media de los controles positivos fuertes.

M = absorbancia de la muestra.

Eliminación de los valores aberrantes de los controles:

Calcular la absorbancia media de los controles. Antes de determinar los resultados, deben eliminarse los valores de los controles positivos y negativos que no cumplan con los siguientes criterios:

1. Controles negativos con una absorbancia $\geq 0.5(CN+CPd)$.
2. Controles positivos bajos con una absorbancia $\leq 1.4CN$.
3. Controles positivos bajos con una absorbancia $\geq 1.5CPd-0.5CN$.
4. Controles positivos bajos con una absorbancia $< 0.5(CN+CPd)$.

Eliminar todos los valores aberrantes, luego volver a calcular CN o CPd y pasar al paso siguiente usando los valores recalculados. Repetir esta eliminación hasta que no se hallen valores aberrantes. Una prueba sólo será válida si menos de la mitad del número de los controles ha sido eliminado; $CN < 0.400$; $CPd-CN > 0.100$. La absorbancia del control positivo fuerte es por lo general > 2.0 .

Cálculo del valor de corte:

El valor de corte es $0.5(CN+CPd)$.

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: Un resultado positivo indica que la muestra contiene HBsAg o un factor que reacciona de modo inespecífico. Sólo un resultado positivo repetible debe considerarse reactivo para el HBsAg.

3.3.3.3. MONOLISA Anti-HBc (Diagnostics Pasteur)

MONOLISA anti-HBc es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio de la inhibición del "sandwich", para la búsqueda de anticuerpos totales contra el antígeno central (core) del virus de la hepatitis B (HBcAg) en suero o plasma humanos.

Reactivos:

1. TIRAS MICROELISA: Tiras de 8 pocillos recubiertos con HBcAg.
2. CONTROL NEGATIVO: suero humano negativo para todos los marcadores de la hepatitis B.
3. CONTROL POSITIVO: suero humano con anti-HBc.
4. SOLUCION DE LAVADO: Solución reguladora TRIS concentrada.
5. CONJUGADO: anti-HBc humano purificado marcado con peroxidasa; para una tira, pipetear 200 µl de conjugado y llevar a 2 ml con diluyente de conjugado (dilución 1:10); debe usarse inmediatamente.
6. SUSTRATO: Tabletas de ortofenilendiamina.
7. DILUYENTE DE SUSTRATO: Solución reguladora de citrato de sodio pH 5.6 con 0.03% de peróxido de hidrógeno.
8. SOLUCION DE PARO: ácido sulfúrico 4 N.

Procedimiento:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con las tiras restantes y el saquito de gel de sílice. Durante la determinación, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. Lavar cada pocillo dos veces antes de usar con 360-400 µl cada lavado (para eliminar la capa proteica protectora que poseen).
3. Pipetear 50 µl de cada muestra y de cada control en los pocillos; incluyendo tres controles negativos y dos controles positivos por cada microplaca.
4. Pipetear 100 µl de conjugado diluido.
5. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 90 min a 40 °C en baño de agua.
6. Lavar cinco veces.
7. Pipetear 100 µl de sustrato.
8. Incubar 30 min a 20-25 °C en la oscuridad.
9. Pipetear 50 µl de la solución de paro (en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que la solución de sustrato).
10. Lectura fotométrica. Leer la absorbancia a 492 nm, teniendo como filtro de referencia 620 nm.

Cálculo de Resultados (establecido por el fabricante):

Calcular la media de los controles negativos (CN), que debe tener un valor de aceptación ≥ 1 .

Calcular la media de los controles positivos (CP), que debe tener un valor de aceptación ≤ 0.15 .

El porcentaje de inhibición es calculado aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{CN} - \text{muestra}}{\text{CN} - \text{CP}} \times 100$$

Interpretación de Resultados:

Muestras cuyo porcentaje de inhibición sea mayor al 60%, son consideradas como positivas.

Muestras cuyo porcentaje de inhibición sea menor al 60%, son consideradas como negativas.

Muestras cuyo porcentaje de inhibición se halla dentro de los límites de 54-66%, deben ser sometidas a una segunda determinación.

Muestras positivas reproducibles son consideradas como positivas.

3.3.3.4. HEPANOSTIKA anti-HBs (Organon Teknika)

Hepanostika anti-HBs es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio del "sandwich", para la detección de anticuerpos del antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBs) en suero o plasma humano.

Reactivos:

1. TIRAS MICROELISA: Tiras con 12 pocillos recubiertos con HBsAg.
2. SOLUCION DE LAVADO: Solución reguladora de fosfato.
3. CONTROL NEGATIVO: suero humano anti-HBs y HBsAg negativos.
4. CONTROL POSITIVO DEBIL: suero humano con 10 UI/l de anti-HBs contra determinantes antigénicos de HBsAg.
5. CONTROL POSITIVO FUERTE: suero humano con 100 UI/l de anti-HBs contra determinantes antigénicos de HBsAg.
6. CONJUGADO LIOFILIZADO: HBsAg subtipo "ad" marcado con peroxidasa de rábano picante.
7. DILUYENTE DE CONJUGADO: Suero humano diluido.
8. TABLETA DE PEROXIDO DE UREA.
9. DILUYENTE DE SUSTRATO.
10. SUSTRATO: Solución de tetrametilbencidina (TMB).
11. SOLUCION DE PARO: Ácido sulfúrico 1 ó 2 mol/l.

Procedimiento:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con las tiras restantes y el saquito de gel de sílice. Durante la determinación, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. Pipetear 100 µl de cada muestra y de cada control en los pocillos, incluyendo un control negativo, un control positivo débil y un control positivo fuerte por cada tira.
3. Cubrir las tiras con adhesivo e incubar 60 min a 37 °C.
4. Lavar cuatro veces.
5. Pipetear 100 µl de conjugado .
6. Cubrir las tiras con nuevo adhesivo e incubar 60 min a 37 °C.
7. Lavar cuatro veces.
8. Pipetear 100 µl de solución sustrato.
9. Incubar 30 min a 20-25 °C.
10. Añadir 100 µl de solución de paro (en el mismo orden y con los intervalos de tiempo que la solución sustrato).
11. Lectura fotométrica. Leer (dentro de 15 min siguientes al paso 10) la absorbancia de la soluciones a 450 nm.

Cálculo de Resultados (establecido por el fabricante):

Los cálculos deben hacerse por separado para cada soporte.

Abreviaturas:

CN = absorbancia media de los controles negativos.

CPd = absorbancia media de los controles positivos débiles.

CPf = absorbancia media de los controles positivos fuertes.

M = absorbancia de la muestra.

Eliminación de los valores aberrantes de los controles:

Calcular la absorbancia media de los controles. Antes de determinar los resultados, deben eliminarse los valores de los controles positivos y negativos que no cumplan con los siguientes criterios:

1. Controles negativos con una absorbancia $\geq 0.5(CN+CPd)$.
2. Controles positivos bajos con una absorbancia $\leq 1.4CN$.
3. Controles positivos bajos con una absorbancia $\geq 1.5CPd-0.5CN$.
4. Controles positivos bajos con una absorbancia $< 0.5(CN+CPd)$.

Eliminar todos los valores aberrantes, luego volver a calcular CN o CPd y pasar al paso siguiente usando los valores recalculados. Repetir esta eliminación hasta que no se hallen valores aberrantes. Una prueba sólo será válida si menos de la mitad del número de los controles ha sido eliminado; $CN < 0.400$; $CPd > 1.4CN$ y $CPf-CPd \geq 0.500$.

Cálculo del valor de corte:

El valor de corte es $0.5(CN+CPd)$.

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: En ocasiones pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que en la mayoría de los casos no se repiten. Se recomienda, por lo tanto, volver a probar todas las muestras inicialmente positivas.

3.3.3.5. HEPANOSTIKA HBeAg/anti-HBe (Organon Teknika)

Hepanostika HBeAg/anti-HBe es un ensayo inmunoenzimático que sirve para la detección del antígeno "e" de la hepatitis B (HBeAg) y/o los anticuerpos Ig totales frente al antígeno "e" (anti-HBe) en suero humano o plasma. La prueba está basada en el principio del "sandwich" (detección de HBeAg) y en el principio de inhibición del "sandwich" (detección del anti-HBe).

Reactivos:

1. TIRAS MICRODELISA: Cada tira posee doce pocillos recubiertos con anti-HBe humano.
2. TIRAS NO RECUBIERTAS: Cada tira posee doce pocillos para la preincubación.
3. CONTROL NEGATIVO: Suero humano HBeAg/anti-HBe negativo.
4. CONTROL POSITIVO HBeAg: Suero humano HBeAg positivo.
5. CONTROL POSITIVO anti-HBe: suero humano anti-HBe positivo.
6. SOLUCION DE LAVADO: Solución reguladora TRIS concentrada.
7. CONJUGADO LIOFILIZADO: anti-HBe humano marcado con peroxidasa de rábano picante.
8. DILUYENTE DE CONJUGADO: Cloruro de sodio 0.15 mol/l.
9. TABLETA DE PEROXIDO DE UREA.
10. TAMPON SUSTRATO.
11. SUSTRATO: Solución de tetrametilbencidina
12. SOLUCION DE PARO: Ácido sulfúrico 1 ó 2 mol/l.

Procedimiento para HBeAg:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con el saquito de gel de sílice dentro. Durante el proceso, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. En cada microplaca distribuir tres controles negativos y un control positivo (100 µl de cada uno). Pipetear 100 µl de cada muestra a analizar en los restantes pocillos.
3. Cubrir las tiras con adhesivo e incubar 120 min a 37 °C.

4. Lavar cuatro veces.
5. Pipetear 100 µl de conjugado reconstituido.
6. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 120 min a 37 °C.
7. Lavar cuatro veces.
8. Pipetear 100 µl de sustrato.
9. Incubar 30 min a 20-25 °C en la oscuridad.
10. Parar la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 2 mol/l en cada pocillo en el mismo orden y en los mismos intervalos de tiempo que el sustrato.
11. Lectura fotométrica: Leer (durante el periodo de 2 horas después del paso 10) la absorbancia de las soluciones a 450 nm.

Cálculo de Resultados para HBeAg (establecido por el fabricante):

Los cálculos deben realizarse para cada soporte de tiras.

Abreviaturas:

M = absorbancia de la muestra.

CN = absorbancia media de los controles negativos.

CP = absorbancia del control HBeAg positivo.

Para los controles debe seguirse el siguiente criterio:

CP > 0.5 y CN < 0.3 y sólo uno de los valores de los controles negativos podrá quedar fuera de 0.7CN y 1.3CN; de otra forma el proceso será invalidado y deberá repetirse. Excluir un control negativo de valor aberrante antes de calcular el valor de corte. Para las muestras el valor de corte es 1.6CN.

Interpretación de resultados para HBeAg.

Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: En ocasiones pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que en la mayoría de los casos no se repiten. Se recomienda, por lo tanto, volver a probar todas las muestras inicialmente positivas.

Procedimiento para Anti-HBe:

1. Tomar un soporte con el número necesario de tiras no sensibilizadas para la preincubación. Durante el proceso las tiras deben permanecer en el soporte.
2. Pipetear 50 µl de control positivo HBeAg a cada pocillo.
3. En cada soporte distribuir un control anti-HBe positivo y tres negativos (100 µl de cada uno) en tantas tiras como sea posible. Pipetear 100 µl de cada muestra en los restantes pocillos.
4. Cubrir las tiras con un adhesivo y mezclar repiqueando la parte lateral del soporte, e incubar 16-20 horas a 37 °C.

5. Transferir 100 µl de cada pocillo a los pocillos correspondientes de las tiras Microelisa sensibilizadas.
7. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 120 min a 37 °C.
8. Continuar tal y como se describe a partir del paso 4 en adelante.

Cálculo de Resultados de Anti-HBe (establecido por el fabricante):

Los cálculos deben realizarse separadamente para cada soporte de tiras.

Abreviaturas:

M = absorbancia de la muestra.

CN = absorbancia media de los controles negativos.

CP = absorbancia del control anti-HBe positivo.

Para los controles debe seguirse el siguiente criterio:

CP < 0.6CN y CN > 0.5, y sólo uno de los valores del control negativo puede quedar fuera de 0.8CN y 1.2CN; de otra forma se invalida el proceso y deberá repetirse. Excluir un control negativo aberrante antes de calcular el valor de corte. Para las muestras el valor de corte es de 0.8CN.

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \leq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M >$ valor de corte.

NOTA: En ocasiones pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que en la mayoría de los casos no se repiten. Se recomienda, por lo tanto, volver a probar todas las muestras inicialmente positivas.

3.3.3.6. HEPANOSTIKA HDV (Organon Teknika)

Hepanostika HDV es un equipo diagnóstico para la detección de anticuerpos frente al antígeno delta de la hepatitis (anti-HD) y/o del antígeno delta de la hepatitis (HDAg) en suero o plasma humano. La prueba de anti-HD es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio de inhibición del "sandwich"; la prueba de HDAg se basa en el principio del "sandwich".

Reactivos:

1. TIRAS MICROELISA: Tiras con 12 pocillos que se han sensibilizado con anti-HD humano.
2. CONTROL NEGATIVO: suero humano no reactivo para anti-HD y HDAg.

3. CONTROL POSITIVO: suero humano anti-HD reactivo.
4. SOLUCION DE LAVADO: Solución reguladora de fosfato.
5. CONJUGADO LIOFILIZADO: anti-HD humano marcado con peroxidasa de rábano picante.
6. HDAG LIOFILIZADO: contiene extracto de hígado humano o de chimpancé, HDag reactivo.
7. TABLETA DE PEROXIDO DE UREA.
8. DILUYENTE DE SUSTRATO.
9. SUSTRATO: Solución de tetrametilbencidina
10. SOLUCION DE PARO: ácido sulfúrico 1 ó 2 M.

Procedimiento para Anti-HD:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con las tiras restantes y el saquito de gel de sílice. Durante la determinación, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. Pipetear 50 µl de cada muestra y de cada control en los pocillos, incluyendo un control positivo y un control negativo por cada tira; pipetear 50 µl de HDAG en cada pocillo conteniendo muestra o control.
3. Cubrir las tiras con adhesivo, mezclar golpeando suavemente el lateral del soporte; incubar 60 min a 37 °C.
4. Lavar cuatro veces.
5. Pipetear 100 µl de conjugado.
6. Cubrir las tiras con nuevo adhesivo e incubar 60 min a 37 °C.
7. Lavar cuatro veces.
8. Pipetear 100 µl de solución sustrato.
9. Incubar 30 min a 20-25 °C.
10. Añadir 100 µl de solución de paro (en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que la solución sustrato).
11. Lectura fotométrica. Medir (dentro de 15 min del paso 10) la absorbancia de las soluciones a 450 nm.

Cálculo de Resultados para Anti-HD (establecido por el fabricante):

Los cálculos deben hacerse por separado para cada soporte de tiras:
Abreviaturas

- N = absorbancia media de los controles negativos
P = absorbancia media de los controles positivos
M = absorbancia de las muestras

Eliminación de los valores aberrantes de los controles:

Antes de determinar los resultados de la prueba, hay que eliminar los valores de los controles positivo y negativo que están fuera de rango.

1. Eliminar controles negativos individuales con absorbancia \leq 0.500.

2. Eliminar controles positivos individuales con absorbancia ≥ 0.400 .
3. Calcular N y P.
4. Eliminar controles positivos individuales con absorbancia $\geq 0.4N$
5. Recalcular P.
6. Eliminar controles negativos individuales con absorbancia $\leq 0.5(N + P)$.
7. Recalcular N y repetir el paso 6 en caso necesario.

Una serie es válida solamente si menos de la mitad de todos los controles han sido eliminados.

Cálculo del valor de corte:

El valor de corte es igual a $0.5(N+P)$

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \leq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M >$ valor de corte.

NOTA: En ocasiones pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que en la mayoría de los casos no se repiten. Se recomienda, por lo tanto, volver a probar todas las muestras inicialmente positivas.

Procedimiento para HDAs:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con las tiras restantes y el saquito de gel de sílice. Durante la determinación, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. Pipetear 50 μ l de cada muestra en los pocillos. Después de las muestras, pipetear los controles. Incluir al menos tres controles negativos distribuidos entre la mayor cantidad de tiras posible y al menos un control positivo en cada serie.
3. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 60 min a 37 °C (la incubación de una noche a temperatura ambiente aumentará la sensibilidad).
4. Lavar cuatro veces
5. Pipetear 100 μ l de conjugado.
6. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 60 min a 37 °C.
7. Lavar cuatro veces.
8. Pipetear 100 μ l de sustrato.
9. Incubar 30 min a 20-25 °C.
10. Parar la reacción añadiendo 100 μ l de solución de paro (en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que la solución sustrato).
11. Lectura fotométrica. Leer (dentro de los 15 min siguientes al paso anterior) la absorbancia de las soluciones a 450 nm.

Cálculo de resultados para HDAg (establecido por el fabricante):

Los cálculos deben hacerse por separado para cada soporte de tiras.
Abreviaturas:

CN = absorbancia media de los controles negativos.

CP = absorbancia media de los controles positivos.

M = absorbancia de la muestra.

Eliminación de los valores aberrantes de los controles:

Antes de determinar los resultados de la prueba, hay que eliminar los valores de los controles positivo y negativo que están fuera de límite con la siguiente secuencia:

1. Eliminar controles negativos individuales con absorbancia ≥ 0.200 .
2. Eliminar controles negativos individuales con absorbancia ≤ 0.400 .
3. Calcular CN y CP.
4. Eliminar controles negativos individuales con absorbancia $< 0.7CN$ o $> 1.3CN$.
5. Recalcular CN.

Una prueba es válida solamente si menos de la mitad de los controles positivos y menos de la mitad de los controles negativos han sido eliminados.

Cálculo del valor de corte:

El valor de corte es $CN + 0.100$.

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: En ocasiones pueden ocurrir reacciones falsas positivas, que en la mayoría de los casos no se repiten. Se recomienda, por lo tanto, volver a probar todas las muestras inicialmente positivas.

3.3.3.7. MONOLISA Anti-HCV (Diagnostics Pasteur)

MONOLISA Anti-HCV es una técnica inmunoenzimática basada en el principio del "sandwich" que permite la detección de anticuerpos asociados con una infección por el virus de la hepatitis C en suero humano.

Reactivos:

1. TIRAS MICROELISA: Tiras con 8 pocillos recubiertos con antígenos purificados; dos proteínas recombinantes producidas por Escherichia coli de clones seleccionados en el área estructural y el área no estructural del genoma del virus C
2. SOLUCION DE LAVADO: Solución reguladora TRIS concentrada.
3. CONTROL NEGATIVO: suero humano negativo para anti-HCV y negativo para los marcadores séricos del virus de la hepatitis B y negativo para anticuerpos contra HIV.
4. CONTROL POSITIVO: suero humano positivo para anti-HCV, negativo para HBsAg y negativo para los anticuerpos contra HIV.
5. DILUYENTE DE MUESTRA: Solución reguladora de citrato.
6. CONJUGADO: Anti-IgG humana marcada con peroxidasa.
7. SUSTRATO: Tabletas de orto-fenilendiamina (OPD).
8. DILUYENTE DE SUSTRATO: Solución reguladora de citrato de sodio pH 5.6 con 0.03% de peróxido de hidrógeno.
9. SOLUCION DE PARO: ácido sulfúrico 4 N.

Procedimiento:

1. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con las tiras restantes y el saquito de gel de sílice. Durante la determinación, las tiras deben mantenerse en el soporte.
2. Pipetear 90 µl de diluyente de la muestra en cada pocillo.
3. Pipetear 10 µl de cada muestra, incluyendo dos controles negativos y tres controles positivos. Homogeneizar la mezcla con un mínimo de tres aspiraciones con la pipeta de 10 µl.
4. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 60 min a 40 °C en baño de agua, o en un incubador de microplaca en seco.
5. Lavar tres veces.
6. Pipetear 100 µl de conjugado.
7. Cubrir las tiras con un adhesivo e incubar 60 min a 40 °C.
8. Lavar cuatro veces.
9. Pipetear 100 µl de la solución sustrato en cada pocillo.
10. Incubar 30 min a 20-25 °C en la oscuridad.
11. Pipetear 50 µl de la solución de paro (en la misma secuencia e intervalos de tiempo con que se colocó la solución sustrato).
12. Lectura fotométrica: Leer la absorbancia a 492 nm con un filtro de referencia de 620 nm (en un plazo no mayor de 30 min después del paso 11).

Cálculo de Resultados (establecido por el fabricante):

Calcular la media de la absorbancia de los controles positivos (CP).

Calcular el valor de corte

El valor de corte es igual a CP/4

El criterio de validación es el siguiente:

Para el control negativo: Cada valor de absorbancia individual debe ser < 0.200 .

Para el control positivo: Cada valor de absorbancia individual debe ser ≥ 0.9 o ≤ 2.50 . Si uno de los controles positivos individuales difieren en más de un 30% de la media, calcule ésta de nuevo con los dos valores de los controles positivos restantes.

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: Toda muestra inicialmente positiva debe repetirse ya que pueden presentarse ocasionalmente reacciones positivas falsas. Se recomienda que las muestras repetidamente positivas sean investigadas mediante pruebas adicionales más específicas.

3.3.3.8. ENZYGNOST Anti-HCV (Behring)

Enzygnost Anti-HCV es una prueba inmunoenzimática basada en el principio del "sandwich", para la detección de anticuerpos IgG contra el virus de la hepatitis C (VHC).

Reactivos:

1. TIRAS MICROELISA: Tiras con 8 pocillos recubiertos con un péptido sintético elaborado a partir de la proteína no estructurada de la zona NSP4 y con un péptido sintético del "core".
2. CONTROL NEGATIVO: Suero humano sin anticuerpos contra el VHC.
3. CONTROL POSITIVO: Suero humano con anticuerpos contra el VHC.
4. DILUYENTE DE MUESTRAS: Contiene TRIS (9.7%) y cloruro de sodio (4.7%).
5. CONJUGADO: Anti-IgG humana marcada con peroxidasa.
6. SUSTRATO: Diclorhidrato de tetrametilbenzidina al 0.5 %.
7. DILUYENTE DE SUSTRATO: Peróxido de hidrógeno (0.01%) en solución reguladora de acetato.
8. SOLUCION DE LAVADO: Solución de diluyente de sustrato con adición de Tween y cloruro de sodio(9%).
9. SOLUCION DE PARO: Acido sulfúrico 0.5 N.

Procedimiento:

1. Lavar dos veces el número de tiras necesarias con aproximadamente 0.3 ml de la solución de lavado.
2. Pipetear en cada pocillo 50 μ l de diluyente de muestras.

3. Pipetear en 4 pocillos 50 μ l de control negativo y en 2 pocillos 50 μ l de control positivo en cada uno, así como en cada uno de los pocillos restantes 50 μ l de muestra.
4. Cubrir con un adhesivo e incubar 30 min a 37°C.
5. Lavar cuatro veces.
6. Pipetear 100 μ l de conjugado.
7. Cubrir e incubar 30 min a 37 °C.
8. Lavar cuatro veces.
9. Pipetear 100 μ l de sustrato.
10. Incubar 30 min a 20-25 °C en la oscuridad.
11. Parar la reacción añadiendo 100 μ l de la solución de paro (en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que la solución de sustrato).
12. Lectura fotométrica. Leer (dentro de la hora siguiente al paso 11) la absorbancia de la soluciones a 450 nm.

Cálculo de Resultados:

Los valores individuales de los controles negativos deben ser menor o igual 0.100; los valores individuales de los controles positivos deben ser mayor, o igual a 0.600.

Si uno de los valores de absorbancia de los controles negativos se halla fuera de límite, no se toma en cuenta para el cálculo. Los valores de los controles positivos, en cambio, deben de estar ambos dentro del límite especificado. Si no se cumplen estos requisitos, hay que repetir la prueba.

Cálculo del valor de corte:

CN= Promedio de los controles negativos.

El valor de corte es igual a $CN + 0.250$

Interpretación de Resultados:

Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.

Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: Toda muestra inicialmente positiva debe repetirse ya que pueden presentarse ocasionalmente reacciones positivas falsas. Se recomienda que las muestras repetidamente positivas sean investigadas mediante pruebas adicionales más específicas.

3.3.3.9. UBI HCV EIA (Organon Teknika)

La prueba UBI HCV EIA es un inmunoensayo enzimático basado en el principio de "sandwich", para la detección in vitro de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis C (VHC) en suero o plasma humanos.

Reactivos:

1. MICROPLACA (96 pocillos): Cada pocillo de la microplaca contiene péptidos sintéticos del VHC adsorbidos.
2. DILUYENTE DE LA MUESTRA: Solución reguladora de fosfato que contiene suero de cabra normal.
3. BLANCO: Solución reguladora de fosfato que contiene suero de cabra normal.
4. CONTROL NEGATIVO: Suero humano normal inactivado, diluido en un diluyente de muestra que no es reactivo para el HBsAg, ni para los anticuerpos HIV-1,2 y HTLV-I.
5. CONTROL POSITIVO DEBIL: Plasma humano inactivado diluido en un diluyente de muestra que contiene un título bajo de anticuerpos específicos para los antígenos péptidos del VHC. No reactivo para el HBsAg, ni anti-HIV-1,2 y anti-HTLV-I..
6. CONTROL POSITIVO FUERTE: Plasma humano inactivado diluido en un diluyente de muestra que contiene un elevado título de anticuerpos específicos para los antígenos péptidos del VHC. No reactivo para el HBsAg, ni anti-HIV-1,2 y anti-HTLV-I.
7. SOLUCION DE LAVADO: Solución reguladora de fosfato.
8. CONJUGADO: Inmunoglobulina antihumana de cabra marcada con peroxidasa de rábano picante.
9. DILUYENTE DE CONJUGADO: Solución reguladora de fosfato con suero de cabra normal
10. SUSTRATO: Tabletas de O-fenilendiamina-2HCl.
11. DILUYENTE DE SUSTRATO: Solución reguladora de citrato-fosfato con peróxido de hidrógeno.
12. SOLUCION DE PARO: Acido sulfúrico 1M.
13. MICROPLACA DE DILUCION: Microplaca para la predilución de las muestras.

Procedimiento:

1. Dispensar el blanco y los controles directamente de sus recipientes a la microplaca de dilución. No se requiere ninguna dilución previa. Dispensar 220 µl de cada uno por duplicado.
2. Dilución de muestras(1:21). Dispensar 15 µl de cada muestra a los pocillos de la microplaca de dilución, seguidos de 300 µl de diluyente de muestra.
3. Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número necesario de tiras Microelisa. Cerrar la bolsa con la sílica gel dentro.

4. Transferir 200 µl del blanco, controles y muestras diluidas desde cada pocillo de la microplaca de dilución a su pocillo correspondiente en la microplaca.
5. Cubrir con un adhesivo e incubar 15 min a 37°C.
6. Lavar seis veces.
7. Pipetear 100 µl de la solución de conjugado.
8. Cubrir e incubar 15 min a 37°C.
9. Lavar 6 veces.
10. Pipetear 100 µl de la solución sustrato.
11. Cubrir e incubar durante 15 minutos a 37°C.
12. Parar la reacción añadiendo 100 µl de la solución de paro (en el mismo orden y con los mismos intervalos de tiempo que la solución de sustrato).
13. Lectura fotométrica. Leer (dentro de las dos horas siguientes al paso 12) la absorbancia de las soluciones a 492 nm, y una longitud de referencia de 620 nm. Leer a 450 nm si los valores individuales de los controles positivos fuertes son superiores a 2.00 a 492 nm.

Cálculo de Resultados (establecido por el fabricante):

1. Determinar el promedio de los blancos (todos los valores de absorbancia para los controles y las muestras se obtienen por sustracción del valor de absorbancia promedio de los dos blancos).
2. Determinar el promedio de los controles negativos (los valores individuales del control negativo corregidos por el blanco deben ser menores o iguales a 0.100 unidades de absorbancia).
3. Determinar el promedio de los controles positivos fuertes (la absorbancia individual del control positivo fuerte corregida por el blanco debe ser superior a 0.40, y debe encontrarse el promedio del control positivo fuerte en el rango comprendido entre 0.5 y 1.5).

Para que la prueba sea válida, el valor de CPf-CN debe ser ≥ 0.400 . Si ese no fuere el caso, el motivo puede ser una técnica incorrecta o un deterioro del reactivo y se deberá repetir el ensayo. El control positivo débil es suministrado para que sea más confiable la positividad de la prueba.

Cálculo del valor de corte:

El valor de corte es igual a $0.15(CPf)$

Interpretación de Resultados:

- Una muestra es positiva si $M \geq$ valor de corte.
 Una muestra es negativa si $M <$ valor de corte.

NOTA: Toda muestra inicialmente positiva debe repetirse ya que pueden presentarse ocasionalmente reacciones positivas falsas. Se recomienda que las muestras repetidamente positivas sean investigadas mediante pruebas adicionales más específicas.

3.3.3.10. Lia Tek HCV III (Organon Teknika)

Lia Tek es un ensayo inmunoenzimático de tipo inmunoblot basado en el principio de "sandwich", para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (VHC) en suero o plasma humanos. La prueba detecta anticuerpos específicos dirigidos contra proteínas del VHC.

Reactivos:

1. TIRAS DE PRUEBA: Recubiertas con antígenos sintéticos y recombinantes (E2/NS1, NS3, NS4, NS5 y epitopes del "core") del VHC, IgG humana y anti-IgG (de oveja) y estreptavidina.
2. CONTROL NEGATIVO: Suero humano normal no reactivo para anti-HCV, el HBSAg, ni para anti-HIV-1,2 y anti-HTLV-I.
3. CONTROL POSITIVO: Suero humano reactivo para anti-VHC. No reactivo para el HBSAg, ni anti-HIV-1,2 y anti-HTLV-I.
4. DILUYENTE DE LA MUESTRA.
5. CONJUGADO: Anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina.
6. DILUYENTE DE CONJUGADO.
7. SUSTRATO: Bromocloro-indoilsulfato en dimetilformamida.
8. DILUYENTE DE SUSTRATO.
9. SOLUCION DE LAVADO
10. SOLUCION DE PARO: Acido sulfúrico 0.1 M.
11. CHAROLAS DE INCUBACION CON CANALES.

Procedimiento:

1. Colocar en la charola el número de canales necesarios (incluyendo dos canales para los controles) y poner una tira de prueba en cada canal.
2. Pipetear 1 ml de diluyente de muestra en los canales destinados a las muestras (no pipetear diluyente de muestra en los canales para los controles).
3. Añadir 10 µl de muestra a sus canales correspondientes.
4. Pipetear 1 ml de control negativo y positivo a sus respectivos canales.
5. Cubrir los canales con un adhesivo e incubar con agitación 14-18 hrs a 20-25°C.
6. Lavar las tiras de prueba: Aspirar el líquido contenido y agregar 1 ml de solución de lavado, agitar por 1 min usando un agitador orbital. Repetir el procedimiento dos veces más.
7. Pipetear 1 ml de conjugado diluido.
8. Incubar con agitación por 30 min a 20-25°C.
9. Lavar las tiras dos veces con solución de lavado y una vez con diluyente de sustrato.
10. Pipetear 1 ml de sustrato diluido.
11. Incubar con agitación por 30 min a 20-25°C.

12. Aspirar el líquido de los canales y pipetear 1 ml de solución de paro.

13. Incubar con agitación 10-30 min a 20-25°C.

14. Colocar las tiras sobre un papel absorbente con el lado recubierto hacia arriba y dejar secar completamente (se puede utilizar una pistola de aire o guardarlas en la oscuridad por 30 min).

Resultados:

Las tiras desarrollan bandas de color púrpura. Las lecturas de reactividad deben ser hechas individualmente para cada tira.

tira de identificación:



Intensidad del color

Lectura

menor que el nivel +/-

-

mayor o igual que el nivel +/-
y menor que el nivel 1+

±

igual que el nivel 1+

1+

mayor que el nivel 1+
y menor que el nivel 3+

2+

igual que el nivel 3+

3+

mayor que el nivel 3+

4+

Interpretación de Resultados:

Una muestra es negativa para anti-VHC si todas las líneas de antígenos del VHC tienen una lectura negativa (-).

Una muestra es positiva para anti-VHC si al menos una línea de antígenos de VHC tiene una lectura de 2+ o mayor, o si al menos dos líneas de antígenos de VHC tiene una lectura de 1+ o mayor.

Una muestra es indeterminada si las lecturas no pueden ser interpretadas como positivas.

3.3.4. ANALISIS ESTADISTICO.

Se estimaron las tasas de seroprevalencia de los distintos agentes virales para la República Mexicana; así como para el sexo y la edad.

Las tasas de seroprevalencia se calcularon en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de seroprevalencia} = \frac{\text{Número total de casos seropositivos}}{\text{Población total}} \cdot 100$$

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. RESULTADOS

HEPATITIS A

La seroprevalencia encontrada, para hepatitis A en la República Mexicana fue del 93.27%, hallándose una distribución homogénea de los casos positivos en las 32 entidades.

El cuadro I y la figura I muestran la presencia de anticuerpos contra el VHA por grupos de edad. En la población menor a 10 años se encontró una seroprevalencia del 78.66%, la cual tuvo un aumento progresivo hasta alcanzar el 100% a partir de los 30 años.

Los resultados de seroprevalencia según el sexo se indican en el cuadro II.

HEPATITIS B

Se halló una seroprevalencia de hepatitis B del 4.84% en el país; la figura II muestra la distribución geográfica de casos positivos. En el cuadro III y la figura III se observa la prevalencia del VHB por grupos de edad, con seropositividad desde los primeros años de vida (2.08%), triplicándose al llegar a los 49 años (6.38%), para luego presentar un gran incremento a partir de los 60 años (24.49% en promedio).

El cuadro IV muestra los resultados de seroprevalencia de acuerdo al sexo.

Las prevalencias de HBsAg, anti-HBc y anti-HBs se dan en el cuadro V. De los 30 casos positivos a algún marcador, el 36.66% resultó positivo para anti-HBe y ninguno para HBeAg.

HEPATITIS C

La seroprevalencia del VHC encontrada en México fue del 0.36%; la distribución geográfica se aprecia en la figura IV.

En el cuadro VI y la figura V se muestra la seroprevalencia del VHC según grupos de edad; la seropositividad aumenta conforme a la edad, pero en el grupo de 30-39 años se da un drástico incremento (1.47%).

En el cuadro VII se aprecian los resultados de seroprevalencia según el sexo.

HEPATITIS DELTA

Sólo se trabajaron los 30 sueros que resultaron positivos a algún marcador serológico del VHB. No se encontró ningún caso positivo para el VHD.

CUADRO I. Seroprevalencia de Hepatitis A según grupos de edad

Grupo de edad (años)	Población muestral	Seropositivos	
		Población	Porcentaje
1 - 9	75	59	78.66
10 - 19	80	74	92.50
20 - 29	52	51	98.07
30 - 39	50	50	100.00
40 - 49	27	27	100.00
50 - 59	17	17	100.00
60 - 69	12	12	100.00
70 y más	14	14	100.00
Total	327	305	93.27

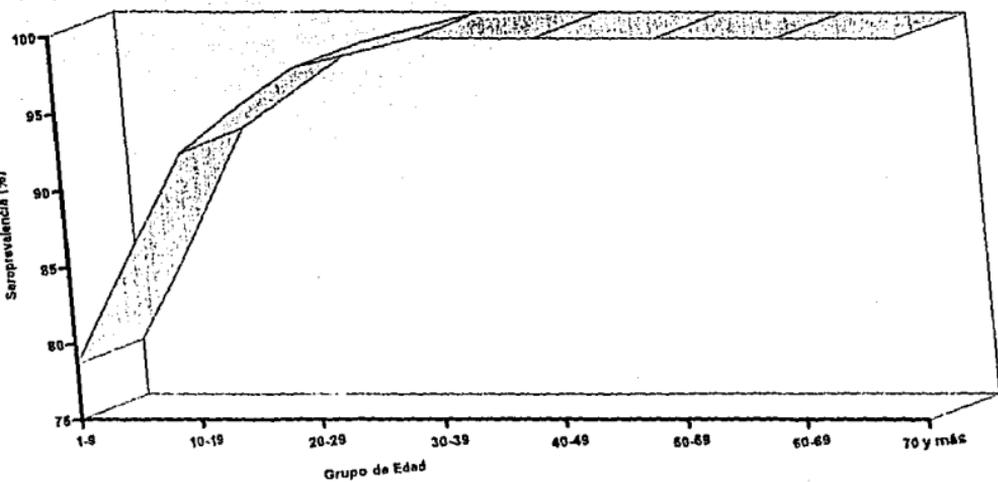


FIGURA I. Seroprevalencia de Hepatitis A según grupos de edad

CUADRO II. Seroprevalencia de Hepatitis A según sexo

Sexo	Población muestral	Seropositivos	
		Población	Porcentaje
Femenino	168	160	95.23
Masculino	159	145	91.19
Total	327	305	93.27



FIGURA II. Distribución geográfica de la Hepatitis B

CUADRO III. Seroprevalencia de Hepatitis B según grupos de edad

Grupo de edad (años)	Población muestral	Seropositivos	
		Población	Porcentaje
1 - 9	144	3	2.08
10 - 19	161	3	1.86
20 - 29	89	3	3.37
30 - 39	90	4	4.44
40 - 49	47	3	6.38
50 - 59	35	1	2.85
60 - 69	27	7	25.92
70 y más	26	6	23.07
Total	619	30	4.84

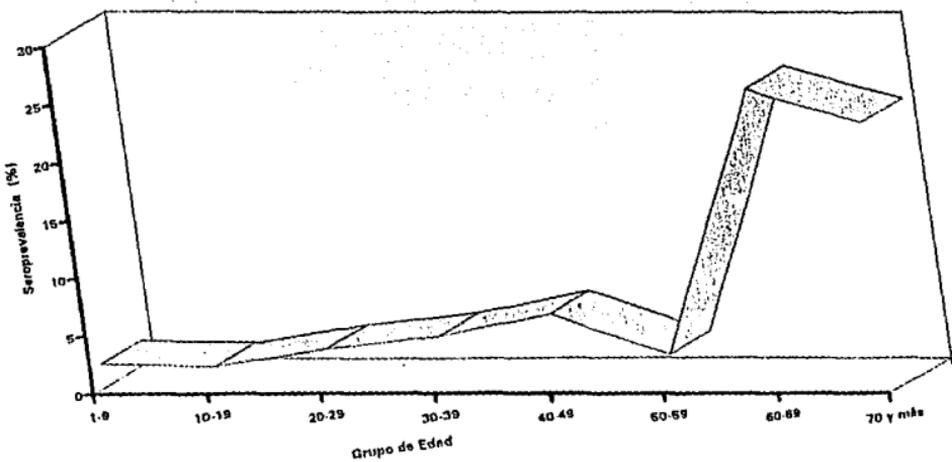


FIGURA III. Seroprevalencia de Hepatitis B según grupos de edad

CUADRO IV. Seroprevalencia de Hepatitis B según sexo

Sexo	Población muestral	Seropositivos	
		Población	Porcentaje
Femenino	340	15	4.41
Masculino	279	15	5.37
Total	619	30	4.84

CUADRO V. Seroprevalencia de marcadores serológicos de Hepatitis B

Marcador serológico	Seropositivos	Porcentaje
HBsAg	1	0.16
Anti-HBc	19	3.06
Anti-HBs	26	4.20



FIGURA IV. Distribución geográfica de la Hepatitis C

CUADRO VI. Seroprevalencia de Hepatitis C según grupos de edad

Grupo de edad (años)	Población muestral	Seropositivos	
		Población	Porcentaje
1 - 9	751	0	0.00
10 - 19	671	1	0.14
20 - 29	438	1	0.22
30 - 39	340	5	1.47
40 - 49	625	2	0.32
50 - 59	194	1	0.51
60 - 69	138	1	0.72
70 y más	102	1	0.98
Total	3259	12	0.36

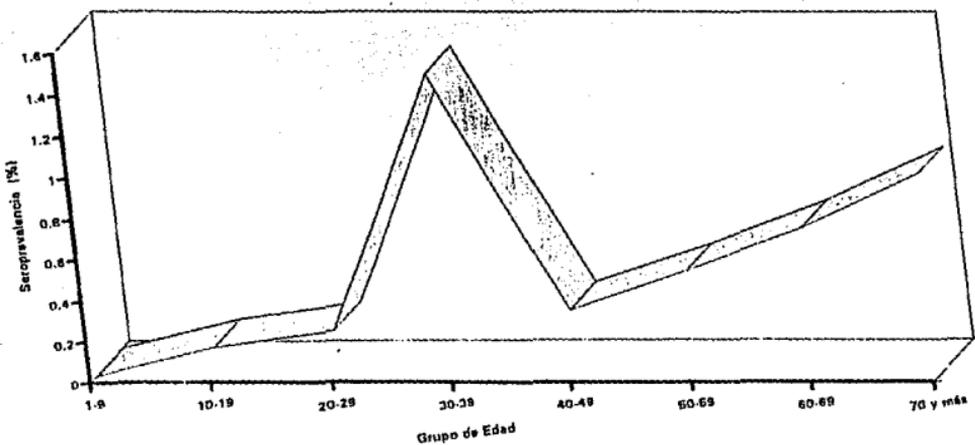


FIGURA V. Seroprevalencia de Hepatitis C según grupos de edad

CUADRO VII. Seroprevalencia de Hepatitis C según sexo

Sexo	Población muestral	Seropositivos	
		Población	Porcentaje
Femenino	1940	8	0.41
Masculino	1319	4	0.30
Total	3259	12	0.36

4.2. DISCUSIONES

HEPATITIS A

Para evaluar la prevalencia del VHA fue necesario determinar inmunoglobulinas del tipo IgG, en una muestra representativa de la República Mexicana.

La seroprevalencia del 93.27% encontrada está distribuida en todo el país de manera uniforme.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la seroprevalencia de anti-VHA totales se incrementa en forma progresiva con la edad, lo que indica que la población mexicana tiene contacto con el VHA desde etapas tempranas de la vida; a partir de los 10 años de edad más del 90% de la población ya presenta hallazgos de contacto con el VHA.

La tasa de seroprevalencia entre ambos sexos fue muy similar, siendo la diferencia estadística de sólo un 3.74%. Esto indica que tanto hombres como mujeres están expuestos por igual a una infección con VHA.

HEPATITIS B

La finalidad de haber realizado la detección de diversos marcadores serológicos, fue el rastrear todo contacto que la población mexicana pudiera tener con el VHB. La seroprevalencia de infección por el VHB observada fue del 4.84%, con una mayor frecuencia de positividad para el marcador anti-HBs.

Al contrario que con el VHA, existe una diferencia en cuanto a prevalencia de infección por zonas geográficas, siendo las entidades de mayor riesgo las fronterizas, costeras y con alto índice demográfico.

A partir de los 20 años de edad la seropositividad comienza a incrementarse debido probablemente al contacto con el virus, ya sea vía sexual o parenteral. El gran incremento observado a partir de los 60 años puede deberse principalmente a que la búsqueda del VHB en la sangre y sus productos tiene poco tiempo; la primeras pruebas para detectar el VHB se introdujeron a México a principios de la década de los setentas, siendo hasta 1986 cuando se estableció como obligatoria la búsqueda del VHB en la sangre y sus productos.

La tasa de seroprevalencia de los hombres fue estadísticamente un 21.76% mayor que la de las mujeres, y esto se explica por el mayor número de probabilidades de infección que tiene el sexo masculino, sobre todo por vía sexual.

De los casos positivos, cabe mencionar que el único positivo para HBsAg, lo fue también para anti-HBs, anti-HBc y anti-HBe; este resultado se explica por la existencia de anticuerpos heterotípicos los cuales a pesar de estar presentes en el suero no son capaces de

neutralizar el virus por estar dirigidos a un serotipo distinto de HBsAg. De los 30 casos positivos a algún marcador, 26 (86.66%) fueron positivos para el anti-HBs, lo cual habla de inmunidad; los 4 casos restantes (13.33%) que fueron negativos para el anti-HBs indican la presencia de portadores crónicos en el país.

HEPATITIS C

La encuesta reveló una seropositividad a los anti-VHC del 0.36% a nivel República; la prevalencia en la mayoría de los estados fue nula, concentrándose los casos positivos en entidades hacia la zona oeste y centro. No se obtuvo un aumento progresivo de seropositividad con la edad, y solo se observa un pico en el grupo de edad de 30-39 años debido quizás en primer lugar a que los anti-VHC no permanecen de por vida, y al riesgo de adquirir el virus de manera transfusional por este grupo. El sexo femenino presentó una seroprevalencia mayor estadísticamente en un 36.66% respecto al sexo masculino; dado que la principal vía de transmisión de la hepatitis C es la parenteral, el parto puede considerarse factor de riesgo para adquirir la infección.

HEPATITIS DELTA

Debido a que sólo se realizó la búsqueda del VHD en pacientes positivos para el VHB, el número de muestras procesadas para el VHD fue muy pequeño, por lo que no se considera una población representativa, y es necesario una muestra mayor.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

HEPATITIS A

Los resultados aquí expuestos muestran que en México, como en otros países en vías de desarrollo, la seroprevalencia del VHA es muy alta (93.27%), y se ajustó a las estimaciones hechas con anterioridad que se suponían mayores al 90%.

La información más importante que se deriva de este estudio es que el riesgo de contacto con el VHA, según lo indica la seroprevalencia, está ampliamente distribuido en la República Mexicana, en todos los estratos socioeconómicos, edades, sexos y asentamientos tanto urbanos como rurales.

En consecuencia, es de suma importancia establecer normas para el control de la transmisión del VHA, que deben enfocarse a la totalidad de la comunidad y a la elevación integral de las condiciones de vida y salubridad del país, y no a grupos concretos y medidas aisladas.

HEPATITIS B

La seroprevalencia de la hepatitis viral tipo B en México es del 4.84% la cual fue muy próxima al valor estimado del 5%.

El verdadero motivo de relizar una encuesta seroepidemiológica de este tipo es la prevención de la enfermedad, especialmente ahora que existe una vacuna eficaz, aunque debe evaluarse la relación costo-beneficio por el precio relativamente alto de la vacuna. No obstante, como una alternativa más accesible para un país en desarrollo como el nuestro, podría ofrecerse información de cómo evitar el contagio aunado a alguna campaña de prevención de enfermedades de transmisión sexual en los medios de comunicación masivos (actualmente se considera a la transmisión sexual como el mecanismo más factible para adquirir la infección por el VHB); así como la administración de la vacuna principalmente a grupos de riesgo como personal de salud. Podría recurrirse también a la detección de portadores asintomáticos para frenar la diseminación del virus.

HEPATITIS C

Si bien la prevalencia obtenida en la encuesta fue del 0.36%, y las estimaciones previas eran del 1%, debe hacerse notar que la estimación se basó en estudios realizados en años anteriores al desarrollo de una prueba confirmatoria para hepatitis C, y sólo se contaba con pruebas del tipo inmunoenzimático, las cuales, a pesar de su sensibilidad y especificidad, siempre dan cierto porcentaje

de falsos positivos. Si se considera el total de muestras repetidamente reactivas por ELISA para anti-VHC, se obtiene una seroprevalencia del 0.8%, la cual se aproxima considerablemente a la estimación del 1%; por ello sí se puede considerar al tamaño muestral como representativo y a los resultados obtenidos como confiables.

Con la información obtenida, deberían iniciarse otros estudios para encontrar el mecanismo de transmisión de la hepatitis C en ciertas zonas del país, donde se halla una concentración marcada de casos positivos. Dado que no se cuenta con medicamentos ni vacunas totalmente eficaces, sólo puede recurrirse a una difusión de información acerca de las vías de transmisión conocidas del VHC como medida profiláctica.

HEPATITIS DELTA

No se logró conocer la seroprevalencia para el VHD, para lo cual es recomendable realizar un estudio seroepidemiológico más extenso.

Las hepatitis virales son un problema de salud en México, no sólo por lo común de las infecciones, pues además de la morbi-mortalidad a la que están asociadas no existe a la fecha un tratamiento eficaz, y a excepción de la hepatitis B, no hay vacuna para prevenirlas; por tanto los enfoques de prevención van dirigidos en algunos casos (Hepatitis B, C y delta) hacia el tamizaje de donadores para transfundir sangre segura, y en otros (Hepatitis A y las demás transmitidas entéricamente) al mejoramiento de condiciones de higiene.

La importancia de este trabajo es haber proporcionado información actual y confiable de la prevalencia de las hepatitis virales en la República Mexicana que ayudarán al establecimiento de estrategias para la prevención y control de estas enfermedades.

Es necesario realizar otros estudios como el presente para ampliar el conocimiento de la prevalencia de infección con otros agentes virales causales de hepatitis, como el virus de la hepatitis delta y el virus de la hepatitis transmitido entéricamente (VHE).

BIBLIOGRAFIA

1. Barriga Gustavo, Yxcapa Silvia, Ruiz Dora, Peredo Miguel. Exposición ocupacional a la hepatitis viral del tipo B en un centro médico. Rev Med IMSS. 22 (3): 169-175. 1987.
2. Brind A., Codd A., Cohen B., Gabriel G. Low prevalence of antibody to hepatitis C virus in North East England. J Med Virol. 1990; 32: 243-248
3. Bustamante M., Alvarez M. Prevención de la hepatitis A. VACUNAS, CIENCIA Y SALUD. Secretaría de Salud. 1a. edición. Pags. 381-387. México 1992.
4. Bustamante M., Alvarez M., Muñoz D. Hepatitis viral en México. Boletín Mensual Epidemiología. 2 (5): 50-54. 1987.
5. Centers for Disease Control. Protection against viral hepatitis: recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee. MMWR. 39(No.RR-2): 1-24. 1990.
6. Dienstag J. Viral hepatitis type A. Clinics in Gastroenterology. 9 (1): 135-149. 1980
7. Dindzans Vincents J. Hepatitis Profilaxis. Postgraduate Medicine. 92 (4): 43-52. 1992.
8. Editorials: Hepatitis C virus upstanding. Lancet. 335: 1431-1432. 1990.
9. Everhart, J. Di Bisceglie, A. y Col. Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. Ann Int Med. 112 (7): 544-546. 1990.
10. Fenner F. VIROLOGIA MEDICA. La Prensa Médica Mexicana 2a. edición. México 1981
11. Fields B., Knipe D. VIROLOGY. Raven Press. 2a. edición. Pags. 2137-2287. E.U.A. 1990
12. Francis D., Maynard J. The transmission and outcome of hepatitis A, B and non-A non-B: a review. Epidemiologic Reviews. 1: 17-27. 1979.
13. Fujirebio Inc. Serodia-HBs and Serodia-Anti HBs, hemagglutination tests for detection of Hepatitis B surface antigen and antibody. Technical information of Fujirebio Inc. Japón. 1988.

14. Fukuda Y., Nagura H., Takayama T., Imoto M. Correlation between detection of anti-viral antibody and histopathological disease activity in an epidemic of hepatitis C. Arch Virol, 126: 171-178. 1992.
15. Henry J. y Davidsohn I. DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO. Salvat Editores. 6a. edición. Pags. 632-634, 825-256. México 1981.
16. Hepatitis Surveillance. Centers for Disease Control. Report Number 53; 1990.
17. Hibbs J., Issaragrisil S., Young N. High prevalence of hepatitis C viremia among aplastic anemia patients and controls from Thailand. Am J Trop Med Hyg. 46 (5): 564-570. 1992.
18. Informe Técnico del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 1993-1994. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. Pag. 165. México. 1994.
19. Isselbacher Kurt. Ictericia y hepatomegalia. HARRISON PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA. Ed. Interamericana. 12a. edición. México 1991.
20. Iwarson S. The main five types of viral hepatitis: an alphabetical update. Scand J Infect Dis. 24: 129-135. 1992.
21. Kershenovich D., Hurtado R., Collawn Cynthia. Seroprevalencia de marcadores virales de hepatitis B en profesionales de la salud: estudio multicéntrico en México. Rev Invest Clin. 42 (4): 251-256. 1990.
22. Krause, D.S. Hepatitis B in the emergency department. N Engl J Med. 327: 1032. 1992.
23. Krogsgaard K. Hepatitis B virus DNA in serum, applied molecular biology in the evaluation of Hepatitis B infection. Liver, 8 (5): 257-283. 1988.
24. Kumar Shashi, Pound David C. Serologic Diagnosis of Viral Hepatitis. Postgraduate Medicine. 2 (4): 55-65. 1992.
25. Kusuya Nishioka. Hepatitis C virus antibody and hepatocellular carcinoma. Update Testing in the Blood Bank. 4 (1): 2-3. 1990.
26. Leenders WPJ, Hertogs K, Moshage H, Yap SH. Host and tissue tropism of hepatitis B virus. Liver. 12: 51-55. 1988.
27. Lehne Carlos, Mollinedo José, Mancilla Raúl, Landa Luis. Hepatitis en los pacientes de trasplante renal. Rev Med IMSS. 23 (1): 43-48. 1985.

28. Lemon SM. Viral Hepatitis. In: Holmes K. y Col. SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES. Mc Graw Hill. Pags. 479-496. E.U.A. 1984.
29. Levinson W., Wormser G., Forseter G., Calmann M. Hepatitis C virus seroprevalence in the developmentally disabled. Arch Intern Med. 152: 2309-2311. 1992.
30. Lisker, Milman. Marcadores de Hepatitis. Rev Invest Clin 42: 4-7. 1990.
31. Lynch M., Raphael S., Spare P. METODOS DE LABORATORIO. Nueva Editorial Interamericana. 2a. edición. Pags. 197-201, 334-345, 386-390, 809-811. México 1991.
32. Mc Farlane G., Smith M., Johnson J. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? Lancet. 335: 754-757. 1990.
33. Melbye M., Biggar R., Wantzin P., Krogsgaard K. Sexual transmission of hepatitis C virus: cohort study (1981-9) among European homosexual men. Bt Med J. 210-212. 1990.
34. Mutsunori S., Toshitaka A., Pendleton D. Induction of cytotoxic T cells to a cross-reactive epitope in the hepatitis C virus nonstructural RNA polimerase-like protein. J Virol. 66 (7): 4098-4106. 1992.
35. Pereira B., Milford E., Kirkman R. Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. N Engl J Med. 327 (No. 13): 910-914. 1992.
36. Purcell R. y Hoofnagle J. Hepatitis viruses. In: Schmidt N. y Emmons R. DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTIONS. 6a. edición. Pags. 957-963. E.U.A. 1989.
37. Ramirez JA y Col. Diagnóstico serológico de la hepatitis por virus A, B y agente delta. Bol Med Hosp Infant Mex. 45: 394-400. 1988.
38. Roggendorf M. Deinhardt F. Prevalence of anti-HCV in chronic liver disease. Update Testing in the Blood Bank. 4 (1): 4-5. 1990.
39. Sánchez A., Rey C., Aguado I. Hepatitis C virus infection in sexually promiscuous groups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 9: 610-612. 1990.
40. Schaechter M., Medoff G., Schlessinger D. MECHANISMS OF MICROBIAL DISEASE. Williams & Wilkins. 422-433. U.S.A. 1989.

41. Sheen Shyan, Liaw Yun-Fan, Chu Chia-Ming, Pao Chia-C. Role of hepatitis C virus infection in spontaneous hepatitis B surface antigen clearance during chronic hepatitis B virus infection. J Infect Dis. 165: 831-834. 1992.
42. Stary A., Kopp H. Seroepidemiologic study of hepatitis C virus in sexually transmitted disease risk groups. Sexually Transmitted Diseases 19 (No. 5): 252-258. 1992.
43. Stevens C. Hepatitis C virus at long last. Update Testing in the Blood Bank. 3 (2): 1-3. 1988.
44. Stevens C., Taylos P., Pindyck J., Choo D., Bradley D., Kuo G., Houghton M. Epidemiology of Hepatitis C Virus. JAMA. 263 (1): 49-53. 1990.
45. Tabor Edward. The chimpanzee model for non-A, non-B hepatitis. Update Testing in the Blood Bank. 4 (1): 5. 1990.
46. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. Nature. 317: 489-495. 1985.
47. Trepo, C. Impact of anti-HCV testing in liver diseases. Update Testing in the Blood Bank. 3 (2): 5-6. 1988.
48. Van Der Poel C., Cuypers M., Reesink W. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. Lancet. 337 (No. 2): 317-319. 1991.
49. Weidner A., Truett M., Han J., Polito A. HCV testing in low-risk population. Lancet. 336: 695. 1990.
50. Williams, A y Dodd, R. The serology of hepatitis C virus in relation to post-transfusion hepatitis. Annals of Clinical and Laboratory Science. 20 (3): 192-199. 1990.
51. Wright Teresa. Chronic hepatitis B and C. Postgraduate Medicine. 92 (4): 75-80. 1992.

APENDICE

PREPARACION DE REACTIVOS

HAVAB EIA (Abbot Laboratories)

1. SUSTRATO: Cada tableta de ortofenilendiamina (OPD) se disuelve en 5 ml de diluyente de sustrato. La solución sustrato se debe preparar inmediatamente antes de utilizarla. Una vez preparada, la solución es estable durante 60 min a la temperatura ambiente.

Hepanostika HBsAg (Organon Teknika)

1. SOLUCION DE LAVADO: Diluir solución reguladora de fosfato concentrado 1:25 con agua destilada. La solución de lavado diluida es estable dos semanas a 2-8°C.

2. PEROXIDO DE UREA: La tableta de peróxido de urea se disuelve en 10 ml de agua destilada (el material insoluble presente no afecta a la prueba); si se guarda en la oscuridad a 2-8 °C es estable durante un año.

3. SUSTRATO. Cada tableta de OPD se disuelve en 2.5 ml de agua destilada; guardar en la oscuridad hasta su completa disolución, lo cual ocurre en aproximadamente 15 min; añadir 100 µl de peróxido de urea por cada 2.5 ml de solución de OPD. La solución sustrato debe emplearse de inmediato.

MONDLISA Anti-HBc (Diagnostics Pasteur)

1. SOLUCION DE LAVADO: Diluir 1:10 con agua destilada; es estable quince días a 2-8 °C.

2. SUSTRATO: Disolver cada tableta de OPD en 10 ml de diluyente de sustrato; debe emplearse en máximo media hora y tenerlo alejado de la luz directa.

Hepanostika anti-HBs (Organon Teknika)

1. SOLUCION DE LAVADO: Diluir la solución reguladora de fosfato concentrado 1:25 con agua destilada. La solución de lavado diluida es estable dos semanas a 2-8°C.

2. CONJUGADO: Reconstituir cada vial de conjugado con 5.6 ml de solvente para conjugado, dejar que se disuelva por completo (unos tres minutos) y homogeneizar. Mezclar los contenidos en caso de utilizar más de un vial; el conjugado reconstituido es estable cuatro semanas a 2-8 °C.

3. PEROXIDO DE UREA: La tableta de peróxido de urea se disuelve en 10 ml de agua destilada (el material insoluble presente no afecta a la prueba); en la oscuridad a 2-8 °C es estable durante un año.
4. PEROXIDO/TAMPON SUSTRATO: De la solución de peróxido de urea se añade 1 ml al vial que contiene el diluyente de sustrato; es estable un año a 2-8 °C.
5. SUSTRATO: Para preparar 5.6 ml de solución sustrato se añaden 0.5 ml de peróxido/tampón sustrato a 5 ml de agua destilada y mezclar; añadir 100 µl de tetrametilbencidina (TMB) y mezclar. La solución sustrato tiene que ser (casi) incolora cuando se emplee; su estabilidad es muy poca, por lo que debe prepararse y emplearse de inmediato (máximo media hora).

Hpanostika HBeAg/anti-HBe (Organon Teknika)

1. SOLUCION DE LAVADO: La solución de lavado debe diluirse 1:10 con agua destilada antes de su uso. La solución de lavado diluida es estable a 2-8 °C durante ocho semanas.
2. CONJUGADO: cada vial debe reconstituirse con 6 ml de cloruro sódico 0.15 mol/l; un vial es suficiente para cuatro tiras. El conjugado reconstituido es estable ocho semanas a -20 °C y puede ser congelado no más de dos veces.
3. PEROXIDO DE UREA: La tableta de peróxido de urea se disuelve en 10 ml de agua destilada (el material insoluble presente no afecta a la prueba); si se guarda en la oscuridad a 2-8 °C es estable durante un año.
4. PEROXIDO/SUSTRATO: De la solución de peróxido de urea se añade 0.5 ml al vial que contiene el diluyente de sustrato; es estable un año a 2-8 °C en la oscuridad.
5. SUSTRATO: Por cada 0.3 ml de peróxido/sustrato se añaden 2.7 ml de agua destilada, mezclar; añadir 25 µl de solución TMB y mezclar. La solución sustrato tiene que ser (casi) incolora cuando se emplee; su estabilidad es muy poca, por lo que debe prepararse y emplearse de inmediato (máximo media hora).

Hpanostika HDV (Organon Teknika)

1. SOLUCION DE LAVADO: Diluir la solución reguladora de fosfato concentrada 1:25 con agua destilada. La solución de lavado diluida es estable dos semanas a 2-8 °C.
2. HDAG: Cada vial debe reconstituirse con 1 ml de agua destilada para la prueba de anti-HD y 0.5 ml de agua destilada para la prueba de HDAG (Nota: la solución de HDAG se utiliza como control HDAG positivo en la técnica de HDAG); el HDAG reconstituido no permanece estable, por lo que debe emplearse en un plazo no mayor de dos horas.
3. CONJUGADO: Reconstituir cada vial de conjugado con 1.5 ml de agua destilada, mezclar los contenidos en caso de utilizar más de

un vial; el conjugado reconstituido no permanece estable, por lo que debe emplearse en un plazo no mayor de dos horas.

4. PEROXIDO DE UREA: La tableta de peróxido de urea se disuelve en 10 ml de agua destilada (el material insoluble presente no afecta a la prueba); si se guarda en la oscuridad a 2-8 °C es estable durante un año.

5. PEROXIDO/SUSTRATO: De la solución de peróxido de urea se añade 1 ml al vial que contiene el diluyente de sustrato; es estable un año a 2-8 °C.

6. SUSTRATO: Para preparar 5.6 ml de solución sustrato se añaden 0.5 ml de peróxido/sustrato a 5 ml de agua destilada y mezclar; añadir 100 µl de solución TMB y mezclar. La solución sustrato tiene que ser (casi) incolora cuando se emplee; su estabilidad es muy poca, por lo que debe prepararse y emplearse de inmediato (máximo media hora).

MONOLISA Anti-HCV (Diagnostics Pasteur)

1. SOLUCION DE LAVADO: Diluir la solución de lavado 1:10 en agua destilada; es estable quince días a 2-8 °C.

2. SUSTRATO: Disolver cada tableta de orto-fenilendiamina en 10 ml de diluyente de sustrato; su estabilidad es muy poca, por lo que debe emplearse de inmediato y mantenerse alejado de la luz directa.

Enzygnost Anti-HCV (Bhering)

1. Diluir la solución de lavado 1:20 con agua destilada. Una vez preparado, la solución de lavado diluida es estable durante una semana a 2-8°C.

2. Diluir el sustrato 1:11 con el diluyente de sustrato, antes de utilizarlo. Utilizar la solución de conjugado preparada, en menos de ocho horas, guardada en la oscuridad a 18-25°C.

UBI HCV EIA (Organon Teknika)

1. SOLUCION DE LAVADO: Diluir la solución de lavado 1:10 con agua destilada. Una vez preparado, la solución de lavado diluida es estable durante tres meses.

2. CONJUGADO: Diluir el conjugado 1:101 con el diluyente de conjugado, antes de utilizarlo. Utilizar la solución de conjugado preparada, en menos de ocho horas.

3. SUSTRATO: La solución sustrato de OPD se debe preparar inmediatamente antes de utilizarla. Una vez preparada, la solución es estable durante 60 min. a la temperatura ambiente. Cada tableta de OPD se disuelve en 3 ml de diluyente de OPD.

Lia Tek HCV III (Organon Teknika)

1. Diluir la solución de lavado 1:5 con agua destilada. Una vez preparado, la solución de lavado diluida es estable durante dos semanas guardado a 2-8°C.
2. Diluir el conjugado 1:100 con el diluyente de conjugado, antes de utilizarlo. Utilizar la solución de conjugado preparada, en menos de ocho horas, guardada en la oscuridad.
3. Diluir el sustrato 1:100 con el diluyente de sustrato, antes de utilizarlo. Utilizar la solución de conjugado preparada, en menos de ocho horas, guardada en la oscuridad a 18-25°C.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**