

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
BIOQUÍMICA CLÍNICA

IDENTIFICACIÓN DE HEPATITIS B OCULTA (OBI) EN DONANTES  
VOLUNTARIOS DE SANGRE CON SEROLOGÍA REACTIVA,  
MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR, EN LA UNIDAD DE  
BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL “CARLOS ANDRADE MARÍN”  
EN EL PERÍODO 2015

YADIRA ARACELY MOSQUERA RIVERA

NATHALY ANABEL RIVERA RUEDA

DIRECTOR: MÁSTER. CÉSAR YUMISEVA

QUITO, 2016

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, YADIRA ARACELY MOSQUERA RIVERA, C.I. 1721498044; autora del trabajo de graduación intitulado: Identificación de hepatitis b oculta (OBI) en donantes voluntarios de sangre con serología reactiva, mediante la técnica molecular de PCR, en la unidad de banco de sangre del hospital “Carlos Andrade Marín” en el período 2015, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

*Yadira Mosquera.*

YADIRA ARACELY MOSQUERA RIVERA, C.I. 1721498044

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, NATHALY ANABEL RIVERA RUEDA, C.I. 1720802436; autora del trabajo de graduación intitulado: Identificación de hepatitis b oculta (OBI) en donantes voluntarios de sangre con serología reactiva, mediante la técnica molecular de PCR, en la unidad de banco de sangre del hospital “Carlos Andrade Marín” en el período 2015, previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



NATHALY ANABEL RIVERA RUEDA, C.I. 1720802436

## DEDICATORIA

A Dios que me dio la vida, a mis padres el mejor ejemplo de cariño, sacrificio, amor y a mis hermanos por su comprensión y apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

Con Cariño,

Yadira.

A mis padres Xavier y Nancy, a mi hermano Carlos y por supuesto a mi amado esposo Esteban, por su apoyo y amor incondicional y por ser el cimiento para la construcción de mi vida profesional, en ellos tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes de responsabilidad, sacrificio y superación me llevan a admirarlos cada día más.

Nathaly Rivera Rueda

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por permitirnos llegar a este momento tan especial de nuestras vidas. Por los triunfos y los momentos difíciles.

A nuestros amados padres, quienes nos han acompañado durante todo nuestro trayecto estudiantil y de vida.

A César, nuestro director, quien ha estado con nosotros guiándonos y exigiendo lo máximo de nuestras capacidades para realizar este trabajo.

A nuestras maestras Rosita y Giss, quienes nos han guiado en este proceso que lo veíamos casi imposible de culminar.

A Marthita y Wilson por permitirnos hacer posible este trabajo, abriéndonos las puertas de sus establecimientos y aportando su conocimiento.

A la PUCE por darnos la dicha de estar en sus instalaciones aprendiendo día a día con profesionales de tan alto nivel, no solo intelectual sino humano.

## RESUMEN

*Identificación de hepatitis B oculta (OBI) en donantes voluntarios de sangre con serología reactiva, mediante la técnica molecular de PCR, en la unidad de Banco de Sangre del Hospital “Carlos Andrade Marín” en el período 2015*

**Introducción:** En Ecuador el tamizaje de hepatitis B (HB) se realizó a partir de 1984. Actualmente el 100% de las unidades sanguíneas son tamizadas para 6 marcadores serológicos obligatorios en los bancos de sangre pertenecientes a la Red pública Integral de Salud y servicios complementarios; investigaciones demuestran que a lo largo de 30 años existe un nuevo tipo de virus HB (HBV) que ocasiona la denominada infección oculta (OBI), la que únicamente es detectada mediante el uso de pruebas moleculares. Este nuevo reto en la detección de OBI debe ser asumido por los bancos de sangre, sin embargo, el incluir una nueva metodología es costoso, por lo que se ha considerado un algoritmo de detección basado en la utilización de los marcadores serológicos como la detección del antígeno de superficie (HBsAg) y la búsqueda de anticuerpos contra el core del virus (anti-core). Es por esta razón, que la presente investigación pretende establecer la presencia de donantes con hepatitis B oculta, al presentar serología reactiva en uno o los dos marcadores serológicos (HBsAg y anti-core) utilizados en bancos de sangre.

**Materiales y Métodos:** Es un estudio de tipo descriptivo, observacional y transversal que describe la frecuencia de hepatitis B oculta y su relación con los otros marcadores serológicos, se analizó un total de 165 muestras de donantes con serología reactiva para el marcador serológico de hepatitis B, se obtuvieron las muestras (165) del banco de sangre del hospital “Carlos Andrade Marín” de la ciudad de Quito, durante el año 2015. A las cuales se les realizaron pruebas serológicas para HBsAg y anti-core y moleculares para detección de ADN-Virus Hepatitis B. **Resultados:** La frecuencia de donantes de sangre con serología reactiva y OBI positivo fue del 32,38%, lo cual confirma la infección por VHB; el 20,29% de HBsAg reactivos, como indicativo de infección activa; mostrando infección aguda o crónica el 44, 44% anti – core positivo; 100,00% ADN – VHB y HBsAg, 25,84% ADN – VHB y anti – core, 10,23% ADN – VHB, HBsAg y anti – core.

**Conclusiones y Recomendaciones:** El virus de hepatitis B es un problema de Salud Pública a nivel mundial, la hepatitis B oculta impacta diversos aspectos clínicos y epidemiológicos como la transmisión de la infección por productos sanguíneos y/o el trasplante de órganos; en la hepatitis B oculta se da en la carga viral que es muy baja, por lo tanto la sensibilidad de las pruebas de detección serológica son críticas lo que lleva a la necesidad de implementar métodos diagnósticos (PCR) que ayuden a disminuir la incidencia de contagio por VHB.

## ABSTRACT

*Identification of occult hepatitis B (OBI) in blood donors with positive serology by molecular PCR, in the unity of the Hospital Blood Bank "Carlos Andrade Marín" in the period 2015*

**Introduction:** In Ecuador hepatitis B screening was conducted from 1984. Currently, 100% of blood units are screened for 6 mandatory serological markers in blood banks belonging to the Integrated Public Health Network and related services; Research shows that over 30 years there is a new type of HB virus that causes the so-called occult infection (OBI), which is detected only by using molecular tests. This new challenge in detecting OBI must be assumed by blood banks, however, include a new methodology that is expensive, so it was considered a detection algorithm based on the use of serum markers as detection surface antigen (HBsAg) and search for antibodies against the virus core (anti-core). It is for this reason that the present investigation seeks to establish the presence of donors with occult hepatitis B, introducing serology in one or both serological markers (HBsAg and anti-Core) used in blood banks. **Materials and Methods:** A descriptive study, observational and transversal describing the frequency of occult hepatitis B and its relation with other serological markers, a total of 165 donor samples was analyzed with positive serology for hepatitis B serological marker. The samples of the blood bank of the hospital "Carlos Andrade Marín" of Quito were obtained during 2015. which were performed serological tests for HBsAg and anti - core and molecular detection of DNA - Hepatitis Virus B. **Results:** The frequency of blood donors with positive serology and OBI was 32.38%, confirming HBV infection; 20.29% of the HBsAg reactive, as indicative of active infection; showing 44 acute or chronic infection, 44% anti - positive core; 100.00% HBV - DNA and HBsAg, 25.84% HBV - DNA and anti - core, 10.23% HBV - DNA, HBsAg and anti - core. **Conclusions and Recommendations:** The hepatitis B virus is a public health problem worldwide, hepatitis B hidden impacts various clinical and epidemiological aspects as the transmission of infection by blood products and / or organ transplantation; in hepatitis B hidden occurs in viral load is very low, therefore the sensitivity of tests for serological screening are critical leading to the need to implement diagnostic methods (PCR) to help reduce the incidence of infection HBV.

## TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	10
1.1 JUSTIFICACIÓN .....	10
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
1.3 OBJETIVOS .....	13
1.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	13
1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	13
1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO .....	13
CAPÍTULO II.....	14
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	14
2.2.1 ANTECEDENTES .....	14
2.2 MARCO TEÓRICO .....	15
2.2.1 VIRUS DE LA HEPATITIS B.....	15
2.2.1.1 Infección de Hepatitis B oculta (OBI): variabilidad genética .....	18
2.2.2 HEPATITIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	19
2.2.3 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.....	20
2.2.4 HEPATITIS OCULTA.....	21
2.2.5 ANTÍGENOS VIRICOS DE LA HEPATITIS B .....	21
2.2.6 ANTICUERPOS DE HEPATITIS B .....	22
2.2.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS .....	23
2.2.7.1 PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	23
2.2.7.2 ENZIMA INMUNO ENSAYO (EIA).....	23
2.2.7.3 ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA (CLIA).....	24
2.2.7.4 PRUEBAS MOLECULARES.....	24
2.3 MARCO CONCEPTUAL.....	26
CAPÍTULO III.....	28
3.1 MARCO METODOLÓGICO.....	28
3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1.1.1 Tipo de Estudio:.....	28
3.1.1.2 Tipo de Muestreo.....	28
3.1.1.3 Tamaño de Muestra.....	28
3.1.1.4 Criterios de Inclusión .....	28
3.1.1.5 Criterios de Exclusión .....	29

3.1.1.6	Análisis Estadístico.....	29
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	29
3.2.1	Variable dependiente.....	29
3.2.2	Variable independiente.....	29
3.3	MATERIALES Y PROCESO.....	31
3.3.1	Materiales.....	31
3.3.2	Reactivo.....	31
3.3.3	Control de Calidad.....	32
3.4	PROCEDIMIENTO.....	33
3.4.1	Fase Uno.....	33
3.4.2	Fase Dos.....	33
3.4.3	Fase Tres.....	33
3.4.4	Fase Cuatro.....	33
3.5	CONTROL DE CALIDAD.....	38
3.5.1	Control de Calidad EIA.....	38
3.5.2	Control de Calidad CLIA.....	38
3.5.3	Control de Calidad de Pruebas moleculares.....	39
CAPÍTULO IV	.....	40
4.1	RESULTADOS.....	40
4.2	DISCUSIÓN.....	49
4.3	CONCLUSIONES.....	53
4.4	RECOMENDACIONES.....	55
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
6.	ANEXOS.....	61

## LISTA DE TABLAS

**Tabla N°1** Presencia de hepatitis B oculta (OBI) en donantes con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core)

**Tabla N°2** Frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de HBsAg.

**Tabla N°3** Frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de anti – HBc.

**Tabla N°4** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de HBsAg.

**Tabla N°5** Gráfica N° 5 Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de anti-core.

**Tabla N°6** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo en los marcadores serológicos de HBsAg y anti-core.

**Tabla N°7** Donantes que mediante la técnica de PCR para la detección del AND viral VHB resultaron negativos

**Tabla N°8** Prueba de chi-cuadrado entre HBSAg y anti – HBc.

**Tabla N°9** Prueba de chi-cuadrado entre HBsAg y ADN – VHB.

**Tabla N°10** Prueba de chi-cuadrado entre anti – HBc y ADN – VHB.

**Tabla N°11** Correlación de Spearman.

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfica N°1** Presencia de hepatitis B oculta (OBI) en donantes con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core).

**Gráfico N°2** Frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de HBsAg.

**Gráfico N°3** Frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de anti-HBc.

**Gráfica N°4** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de HBsAg.

**Gráfica N°5** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de anti-core.

**Gráfica N°6** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo en los marcadores serológicos de HBsAg y anti-core.

**Gráfica N°7** Donantes que mediante la técnica de PCR para la detección del AND viral VHB resultaron negativos.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura N° 1** Estructura del Virus de Hepatitis B.

**Figura N°2** Proteínas codificadas por el VHB.

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1:** Datos de donantes del Hospital “Carlos Andrade Marín”.

**Anexo 2:** Solicitud de autorización del Hospital “Carlos Andrade Marín”.

**Anexo 3:** Solicitud de autorización de recolección de muestras Banco de Sangre HCAM.

**Anexo 4:** Recolección de muestras de donantes.

**Anexo 5:** Realización de la prueba de EIA.

**Anexo 6:** Realización de la prueba de CLIA.

**Anexo 7:** Extracción de ADN viral.

**Anexo 8:** Análisis en PCR.

## LISTA DE SIGLAS

**OBI:** Hepatitis B oculta.

**VHB:** Virus de Hepatitis B.

**HBsAg:** Antígeno de superficie.

**HBc:** Anti-core.

**EIA:** Enzima de inmuno ensayo.

**CLIA:** Electroquimioluminiscencia.

**VHC:** Virus de hepatitis C.

**NAT:** Amplificación de ácido nucleico.

**PCR:** Reacción de la cadena polimerasa.

**DNA:** Acido desoxirribonucleico.

**Pre-S-S:** Pre – superface – superface.

**Pre-C-C:** Pre – core – core.

**ID-NAT:** Nucleic acid testing.- Identification

**Pre-C-C:** Pre – core – core.

**Ac Anti-HBs:** Anticuerpo frente a Ag de superficie.

**Ac Anti- HBc:** Anticuerpo frente a Antígeno core.

**dNTP's:** Dinucleotidos trifosfatados.

## INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) constituye un problema de gran impacto en salud pública a nivel mundial. Aproximadamente un tercio de la población mundial ha sido infectada por el VHB (Mason, 2000). Pese a la disponibilidad de una vacuna efectiva, este virus continúa siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad, particularmente en países en vías de desarrollo (Ríos-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014). La infección por el VHB es diagnosticada el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) en sangre, el cual corresponde al primer marcador serológico en aparecer; adicionalmente, otros marcadores serológicos y virológicos como detección de anticuerpos contra la proteína core del VHB tipo inmunoglobulina M (anti-HBc IgM) e inmunoglobulina G (anti-HBc IgG), anti-HBs (anticuerpos contra el HBsAg), antígeno e (HBeAg), ADN viral y niveles elevados de aminotransferasas (ALTs) son importantes para el diagnóstico del período de infección. Después de la exposición al virus se estima hay un periodo de incubación de 1-6 meses. La evidencia de infección aguda corresponde a la detección del HBsAg y de anti-HBc (IgG e IgM) (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013). La infección aguda puede ser sintomática o asintomática, siendo esta última una enfermedad subclínica que no es comúnmente diagnosticada.

La infección oculta por el virus de hepatitis B (VHB) se caracteriza por la presencia de actividad de replicación viral en ausencia de marcadores serológicos usuales: las infecciones residuales se producen en ausencia de superficie VHB (Ags HB) y en presencia de anticuepos anti-HBc y las infecciones "silentes" se caracterizan por la ausencia de marcadores serológicos de la hepatitis B. La presencia de variantes virales del VHB pueden ser la causa de la baja actividad de replicación viral y por ende el desarrollo de estas infecciones ocultas. El diagnóstico de hepatitis en tales individuos se hace difícil, dado que los marcadores virales tanto en suero como en hígado, con frecuencia se encuentran por debajo del límite de detección de los inmunoensayos corrientemente utilizados (García C. G., 2000).

La identificación de OBI en los bancos de sangre es de gran importancia ya que la transmisión de una enfermedad infecciosa es una de las complicaciones de la transfusión de sangre y componentes. La detección de marcadores serológicos para infecciones transmisibles por transfusión ha reducido de manera importante el impacto de esta complicación transfusional en las últimas décadas, a pesar de la utilización de métodos de tercera generación (radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis), de mucha mayor

sensibilidad, siguen existiendo riesgos post-transfusional debido a esta infección oculta que puede manifestarse, es por ello que se ha sugerido el uso de técnicas altamente sensibles de amplificación de los ácidos nucleicos que pudieran ser útiles en la determinación de estas infecciones (García C. G., 2000).

La técnica molecular PCR ha expuesto su gran utilidad en el diagnóstico de OBI, puesto que a pesar de que las muestras analizadas en el estudio (165) eran serológicamente positivas para uno o dos marcadores estudiados, los resultados revelaron que únicamente el 32,38% de estas fueron ADN – VHB positivas, lo que nos lleva a reflexionar sobre la gran importancia de implementar técnicas que permitan vigilar y caracterizar la tendencia de casos de Hepatitis B, con el fin de orientar la toma de decisiones en salud y la generación de políticas públicas, pues la infección por VHB afecta a la población en general.

Finalmente, se debería continuar con esta investigación en los donantes de sangre por ser un aspecto relevante para el Sistema Nacional de Bancos de Sangre.

# CAPÍTULO I

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la organización Mundial de la Salud a nivel mundial existen aproximadamente 350 millones de habitantes portadores del virus de la hepatitis B (VHB) (Ramírez & Huichi, 2012). En Ecuador el tamizaje de hepatitis B se realiza a partir de 1984; en el año 1994 se reportaron 33 casos de hepatitis post-transfusional y en el año 2000 llegaron a 288 casos (Berger, 2014).

Actualmente el 100% de las unidades sanguíneas son tamizadas para 6 marcadores serológicos obligatorios: HIV, HBsAg, HCV, Chagas, Sífilis y anti-core (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008); a pesar de los esquemas y campañas de vacunación alrededor del mundo contra el VHB, investigaciones demuestran que a lo largo de 30 años existe un nuevo tipo de VHB que ocasiona la denominada infección oculta (OBI), que únicamente es detectada mediante el uso de pruebas moleculares (VHB-DNA) (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014). Este nuevo reto en la detección de OBI debe ser asumido por los bancos de sangre, sin embargo el incluir una nueva metodología es costoso, por lo que en las unidades de Banco de Sangre se ha implementado un algoritmo de detección basado en la utilización de los marcadores serológicos como la detección del antígeno de superficie (HBsAg) y la búsqueda de anticuerpos contra el core del virus (anti-core) (Arora, Doda, & Kirtania, 2014). Sin embargo, en ciertos individuos la carga viral de OBI es muy baja, lo que bloquea la producción del antígeno de superficie a niveles detectables por medios serológicos (ELISA o CLIA), por lo que es necesario determinar la presencia del ADN viral (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014) y de esa manera determinar un algoritmo de detección que permita prevenir una transmisión del virus HB luego de una transfusión sanguínea; adicionalmente existe la hipótesis de que esta infección oculta ocurra ante la presencia de mutaciones del virus (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014).

Es por esta razón, que la presente investigación pretende establecer la presencia de donantes con hepatitis B oculta, al presentar serología reactiva en uno o los dos marcadores serológicos (HBsAg y anti-core) utilizados en bancos de sangre.

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los bancos de sangre se han establecido varias estrategias para disminuir el riesgo de transmisión de hepatitis B (VHB) como son: el tamizaje serológico, criterios adecuados de selección de donantes y vacunación efectiva contra el virus de la hepatitis B (Alizadeh, Milani, & Sharifi, 2014).

A pesar, de todas estas estrategias se ha determinado que existe todavía la probabilidad de transmisión de VHB a través de una transfusión sanguínea, esto debido a que en países considerados endémicos existe la presencia de donantes portadores del virus de hepatitis B con niveles de antígenos indetectables (Alizadeh, Milani, & Sharifi, 2014).

Según en INEC, en Ecuador se ha determinado que 266.380 personas tienen hepatitis B lo que corresponde al 2 % de la población (INEC, 2013). Según indicadores del Ministerio de Salud Pública la tasa de prevalencia de hepatitis B en el Ecuador es de 32.6%, (Ministerio de Salud activa plan para controlar Hepatitis, 2011), convirtiéndole así en un país con endemia baja, debido a la no detección de OBI, limitándose a los estudios serológicos (HBsAg y anti-core) (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008). Una de las características serológicas de hepatitis oculta (OBI) es el bajo nivel del virus circulante lo que ocasiona que el antígeno de superficie no se detecte; sin embargo la presencia de anticuerpos contra el virus denominado anti-core y la ausencia de anticuerpos contra el antígeno de superficie anti-HBsAg es considerado un indicativo de hepatitis oculta (Sagnelli, Pisaturo, Martini, Filippini, Sagnelli, & Coppola, 2014) (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014).

En los bancos de sangre del país, el tamizaje de hepatitis B en donantes se realiza a través de la utilización de dos marcadores serológicos: el que detecta el antígeno de superficie y el que determina la existencia de anticuerpos contra el “core” del virus. Estudios realizados han descubierto que el 1,62% de personas sanas presentan positividad en anti-core (anti-HBc) sin presentar la infección de VHB, por lo que se requiere de una prueba de mayor sensibilidad y especificidad para confirmar la presencia del ADN VHB (Muselman, Wafa, & Fawza, 2014).

Pruebas moleculares permiten su determinación, se ha publicado que la prevalencia del ADN viral en portadores asintomáticos con resultados positivos en anti-core es muy variable con valores entre el 2,9% y 22,8%, este porcentaje varía de acuerdo al nivel endémico de VHB en la población estudiada (Muselman, Wafa, & Fawza, 2014). Ecuador es considerado como un país de endemicidad media (Jaramillo, 2008), por lo cual la

detección y diagnóstico del VHB OBI se dificulta por la baja carga viral que mantienen los portadores, para lo cual son necesarias tomar medidas que permitan detectar el VHB especialmente en donantes de sangre mediante pruebas de mayor sensibilidad como las moleculares.

Estudios demuestran que un anti-core “solo” es sinónimo de un falso positivo para VHB (Alizadeh, Milani, & Sharifi, 2014) (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014), por lo que los bancos de sangre reportan un descarte de unidades exagerado y diferimiento de donantes que ocasiona una pérdida de componentes en su stock, lo cual demanda una investigación que permita corroborar si existen portadores asintomáticos de hepatitis B con anti-core reactivo y antígeno de superficie negativo, mediante el uso de una prueba molecular.

**Pregunta del problema:** ¿Cuál es la frecuencia de donantes de sangre en el Hospital “Carlos Andrade Marín” de la ciudad de Quito con hepatitis B oculta con anti-core “solo” reactivo?.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de hepatitis B oculta (OBI) en donantes con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core) en el Hospital “Carlos Andrade Marín” en la ciudad de Quito.

### **1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Establecer la frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de anti-core (HBc).
- Establecer la frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de HBsAg.
- Determinar la prevalencia del antígeno de superficie de hepatitis B en donantes de sangre durante el período enero – agosto de 2015.
- Identificar la presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de HBsAg.
- Detectar la presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de anti-core.
- Detectar la presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo en los marcadores serológicos de HBsAg y anti-core.
- Correlacionar los resultados obtenidos en los marcadores serológicos de ADN-VHB, HBsAg y anti-core.

### **1.3.3 LIMITACIÓN DEL ESTUDIO**

Una de las limitaciones del estudio es los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas (CLIA y ELISA)

## CAPÍTULO II

### 2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.2.1 ANTECEDENTES

El virus de la hepatitis B (VHB) es un grave problema de salud pública que causa más de un millón de muertes anuales en todo el mundo. (EASL, 2012). La transmisión del virus de VHB a través de transfusiones sanguíneas se demostró a principios de 1978, en Medellín, Colombia, debido al uso de derivados sanguíneos provenientes de donantes asintomáticos y con resultados negativos para el marcador serológico del antígeno de superficie o HBsAg (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014). Esta situación es común en los países en desarrollo como el Ecuador, donde la prevalencia de VHB es alta y los procedimientos para la selección de donantes de sangre y la detección de marcadores de infección es limitada (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014).

En las últimas tres décadas se ha reconocido, una nueva infección por el virus VHB denominada hepatitis B oculta (OBI). Esta forma clínica es diagnosticada por la detección del genoma del VHB (HBV-DNA) en el tejido hepático y / o muestras de suero, en ausencia del antígeno de superficie del virus (HBsAg) (Raimondo G, 2008). VHB oculta (OBI) se caracteriza por una carga viral muy baja (<200 UI / ml) (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014); es por esta razón, que se ha introducido la prueba de amplificación de ácido nucleico (NAT) en suero con el fin de mejorar la seguridad en transfusión sanguínea (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014); esta prueba tiene la capacidad de detectar la presencia del ADN del VHB durante el periodo de ventana a diferencia de la detección serológica ( Arora, Doda, & Kirtania, 2014).

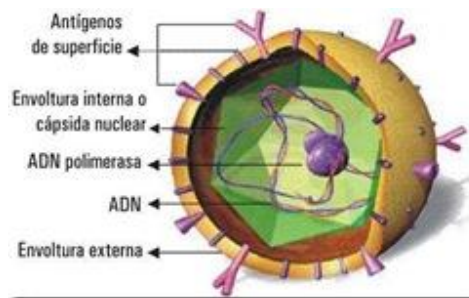
El estudio realizado por Arora,*et al.* 2014 en Estados Unidos en bancos de sangre con baja prevalencia de infección por hepatitis B demostraron que el uso de "Individual nucleic acid testing" (ID-NAT) es efectivo en la detección de portadores asintomáticos de hepatitis B oculta (OBI) ( Arora, Doda, & Kirtania, 2014). Otro aspecto a ser considerado en Ecuador es el uso de la metodología de enzima inmuno ensayo (EIA) y/o Electroquimioluminiscencia (CLIA) para el tamizaje serológico de donantes, la variabilidad

existente de resultados ocasiona un elevado descarte de productos sanguíneos, la discrepancia en los resultados surge cuando se obtienen resultados: HBsAg (negativo) y anti-core (positivo); investigaciones han determinado que la presencia de “anti-core aislado” puede presentar una frecuencia entre 1,4% al 20,8%, diferencia relacionada con la endemicidad de la enfermedad (Wael, Wafa, & Fawza, 2014). La presencia de este marcador es una alerta de probabilidad de hepatitis oculta, sin embargo también existe un elevado porcentaje de resultados falsos positivos (Wael, Wafa, & Fawza, 2014). En los individuos portadores de hepatitis B existen múltiples antígenos y anticuerpos en respuesta al virus HVB, por lo que el uso de dos marcadores serológicos de detección del virus de hepatitis B, constituye una de las mejores estrategias en bancos de sangre con bajos recursos económicos para la implementación de pruebas NAT ( Arora, Doda, & Kirtania, 2014).

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 VIRUS DE LA HEPATITIS B

El virus de hepatitis B (VHB) (Figura N°1) se encuentra formado por una molécula de ADN de 3200 pares de base, pertenece a la familia *Hepadnaviridae* y es el único caso conocido de un virus diferente de los retrovirus que en un paso de su replicación requiere de la transcripción inversa. El virión completo, que se denomina partícula de Dane en honor al investigador que lo observó por primera vez mediante microscopía electrónica, tiene forma esférica, mide 42nm de diámetro, presenta una envoltura proteolipídica de 7 nm de espesor que contiene el antígeno de superficie frente al anticuerpo neutralizante. El virus de la hepatitis B consta de ocho genotipos (A-H) (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).



**Figura N°1** Estructura del Virus de Hepatitis B

**Autor:** Salvador Rasino

**Fuente:** (Rasino, 2015)

En el interior de las partículas se ubica el núcleo esférico de 22 nm - 25 nm de diámetro que contiene el ADN viral, una proteína con actividad ADN polimerasa (proteína P), antígeno del core (HBcAg) y proteínas del huésped. Existe otro tipo de antígeno viral que no forma parte de la estructura del VHB, denominado antígeno "e" (HBeAg), sin embargo este antígeno "e", se sintetiza a partir del gen que codifica la proteína del core (Rodríguez, Jardi, & Frias, 2012).

El core contiene el genoma viral (DNA circular, laxo y bicatenario, en el cual una cadena está completa y la otra es incompleta) y una polimerasa viral, que es la responsable de la síntesis del DNA viral en las células infectadas (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

El virus de Hepatitis B tiene una cadena larga denominada L (-) tiene un tamaño de 3.2 Kb con sus extremos 5' y 3' fijos constituyendo un círculo casi continuo. La cadena corta denominada S (+), tiene un tamaño variable puede ser incluso más corta que la cadena larga, con un extremo 5' fijo y 3' variable y libre (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La estructura circular del genoma se asegura por las regiones de cohesión (220 nucleótidos), ubicadas en los extremos 5' de cada cadena. En la región existe en una secuencia de 11 nucleótidos repetidos directamente en el otro extremo de la región de cohesión. Las secuencias se denominan DR1 situada en la cadena larga L (-) y DR2 situada en la cadena corta S (+), estas secuencias están directamente implicadas en la integración y replicación del genoma del virus en los hepatocitos (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La cadena larga L (-) consta de cuatro regiones abiertas de transcripción (ORF), conservadas en los subtipos de VHB, que representan los genes codificantes. El virus aumenta la capacidad codificante al existir un solapamiento importante entre las regiones abiertas de transcripción (ORF) (Figura N°2) (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

ORF	Proteína	Función
S	Antígeno de superficie (HBsAg). Forma: Mayor (L), Medio (M) y pequeño (S).	Permiten la adhesión y penetración de la partícula viral a la célula hospedera. Blanco de respuesta inmunológica.
P	Polimerasa viral.	ADN polimerasa, transcriptasa reversa (RT) y ARNasa H.
C	Core (Antígeno Core: HBcAg) Antígeno e (HBeAg)	Subunidad estructural de la cápside viral. Se sugiere como inmunomodulador.
X	Proteína X (HBx)	Transactivador de elementos reguladores virales y celulares, actividad oncogénica sugerida.

**Figura N°2** Proteínas codificadas por el VHB  
**Autor:** Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, *et al.*  
**Fuente:** (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013).

Las regiones abiertas (ORF) son: El primero se denomina pre S-S (*pre – superface – superface*) correspondientes a las proteínas de envoltura del antígeno de superficie de VHB. Esta región codifica los antígenos pre-S1, pre-S2 y HBsAg. Este último está ubicado en la envoltura del virus y se denomina antígeno de superficie. Desde el punto de vista clínico, es el de mayor importancia, puesto que su presencia en el suero indica infección productiva por el virus hepatitis B (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La segunda secuencia genética importante es la pre C-C (*pre – core – core*), correspondiente a la codificación de la cápside viral (HBcAg o antígeno core) y de una proteína no estructural, que por su modificación postraduccional es secreta constituyendo el antígeno “e” (HBeAg) (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La tercera codifica la proteína P, una enzima multifuncional con actividad de transcriptasa inversa, involucrada tanto en la síntesis del DNA viral como en la encapsidación del genoma del virus (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La última región del genoma codifica la proteína X, que actúa como el regulador multifuncional. Que no sólo es esencial para la replicación y disminución de virus in vivo, sino que, además, está involucrada en la inducción de hepatocarcinomas relacionados con la infección crónica por este virus (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010). Además de las partículas de Dane, en el suero de los individuos infectados pueden observarse partículas no infectadas, esféricas o filamentosas, constituidas casi totalmente por el antígeno de superficie y lípidos celulares. (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

### **2.2.1.1 Infección de Hepatitis B oculta (OBI): variabilidad genética**

Estudios describen numerosas mutaciones respecto a las regiones ORF S y el core dando lugar a modificaciones antigénicas y alteraciones a nivel de la síntesis de las proteínas de VHB, a esto se asocia con la no detecciones de los antígenos virales mediante la técnica de Elisa (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013).

Otra mutación se determinó en la región ORF pre-S1, su función es la estimulación de la síntesis del ARN sub-genómico, la mutación se da en la capacidad de disminuir el nivel de expresión del HBsAg y por lo tanto afecta en la formación de nuevas partículas virales (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013).

En el caso de ORF core existen también mutaciones relacionadas con la presencia de una carga viral baja (< 200 UI/ mL). La mutación se debe a una disminución en la síntesis del agARN y a su vez disminuye el nivel de la síntesis del core y de las polimerasas con menor número de copias del genoma viral (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013).

La mutación A1896G en la región ORF pre-c, encargada de la codificación de la señal de encapsidación en pgARN, necesaria para la interacción del core y la polimerasa en la formación de la nucleocápside, en donde se realiza la síntesis de nuevos genomas virales, su mutación provoca la disminución del nivel de expresión de HBeAg y HBcAg (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013).

Otros mecanismos implicados con el Virus de Hepatitis B oculta (OBI) son: la integración del genoma del VHB hacia el genoma celular. En la integración el genoma viral puede perder la expresión de antígenos virales como HBsAg, reducción de la producción de

nuevos viriones y producir la disminución de la carga viral. Explicado así la no detección del HBsAg y de la carga viral < 200 UI/ mL de OBI. La integración del genoma viral es un proceso que ocurre de manera aleatoria en la infección de VHB, lo que puede generar cambios en la secuencia como: presencia de una delección, inestabilidad e inserción cromosómica. Aunque no es necesario la integración del genoma del VBH para la replicación viral, en la presencia de una infección de OBI causa este desarrollo (Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, 2013).

## **2.2.2 HEPATITIS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B**

Hepatitis significa literalmente "inflamación del hígado" y puede deberse a varias causas. La causa más común es la infección por un tipo de virus, más frecuentemente virus de hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (VHC) (COBAS, 2011).

El VHB puede causar una infección tanto aguda como crónica, y la infección crónica es difícil de eliminar ya que el ADN viral puede integrarse en el genoma huésped. En una infección aguda, el período de incubación es 1-6 meses después de la infección; durante este tiempo, el virus se está extendiendo a través del tejido hepático (Alcaraz , 2013). El sistema inmune del huésped entonces ataca el virus para resolver la infección.

La lesión hepática vinculada a VHB es provocada fundamentalmente por mecanismos inmunitarios, mediados por la lisis de los hepatocitos infectados por los linfocitos T citotóxicos. Recientemente se han identificado los mecanismos patogénicos precisos responsables de la hepatopatía necro inflamatoria crónica y aguda vinculada a VHB y los factores virales y/o del huésped que determinan la gravedad de la enfermedad. La respuesta inmunitaria del huésped a los antígenos relacionados con VHB es importante para determinar la evolución de la infección aguda por VHB (J. Heathcote, 2008).

La intensidad de la respuesta inmunitaria del huésped es crucial para eliminar el virus, pero esto a la vez provoca daño hepático (es decir, una forma de "hepatitis" manifestada por una elevación de las transaminasas que ocurre antes de haberse alcanzado la desaparición del virus) (J. Heathcote, 2008). Los sujetos que contraen la infección crónica son incapaces de sostener una respuesta inmune contra VHB y por lo tanto sufren episodios intermitentes de destrucción hepatocítica (hepatitis). (J. Heathcote, 2008). (COBAS, 2011).

### 2.2.3 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

El VHB se encuentra formado por una molécula de ADN circular de doble hélice. La cadena larga denominada L (-) tiene un tamaño de 3.2 Kb con sus extremos 5´ y 3´ fijos constituyendo un círculo casi continuo. La cadena corta denominada S (+), tiene un tamaño variable puede ser incluso más corta que la cadena larga, con un extremo 5´ fijo y 3´ variable y libre (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La estructura circular del genoma se asegura por las regiones de cohesión (220 nucleótidos), ubicadas en los extremos 5´ de cada cadena. En la región existe en una secuencia de 11 nucleótidos repetidos directamente en el otro extremo de la región de cohesión. Las secuencias se denominan DR1 situada en la cadena larga L (-) y DR2 situada en la cadena corta S (+), estas secuencias están directamente implicadas en la integración y replicación del genoma del virus en los hepatocitos (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La cadena larga L (-) consta de cuatro regiones abiertas de transcripción (ORF), conservadas en los subtipos de VHB, que representan los genes codificantes. El virus aumenta la capacidad codificante al existir un solapamiento importante entre las regiones abiertas de transcripción (ORF) (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

Las regiones abiertas (ORF) son: El primero se denomina pre S-S (*pre – surface – surface*). Esta región codifica los antígenos pre-S1, pre-S2 y HBsAg. Este último está ubicado en la envoltura del virus y se denomina antígeno de superficie. Desde el punto de vista clínico, es el de mayor importancia, puesto que su presencia en el suero indica infección productiva por el virus hepatitis B (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010). La segunda secuencia genética importante es la pre C-C (*pre – core – core*), que codifica los antígenos HBcAg (antígeno del core) y HBeAg (antígeno e) (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010). La tercera codifica la proteína P, una enzima multifuncional con actividad de transcriptasa inversa, involucrada tanto en la síntesis del DNA viral como en la encapsidación del genoma del virus (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

La última región del genoma codifica la proteína X, que no sólo es esencial para la replicación y disminución de virus in vivo, sino que, además, está involucrada en la inducción de hepatocarcinomas relacionados con la infección crónica por este virus (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010). Además de las partículas de Dane, en el suero de los individuos infectados pueden observarse partículas no

infectadas, esféricas o filamentosas, constituidas casi totalmente por el antígeno de superficie y lípidos celulares. (Negroni, 2009) (Ray, 2012) (Jerzy Jaroszewicz, 2010).

#### **2.2.4 HEPATITIS OCULTA**

La infección oculta por VHB (OBI) se define como la presencia del ADN-HBV circulante en ausencia de antígeno de superficie (HBsAg negativo). El ADN del VHB puede estar presente en pacientes con marcadores serológicos de infección previa (anti-HBc y / o en pacientes anti-HBs positivo) o sin marcadores serológicos (anti-HBc y / o anti-HBs negativo) (Hong Kim, 2015) (Haimanti Bhattacharya, 2015)

En el pasado, el aclaramiento de la expresión de HBsAg en pacientes con hepatitis B crónica se consideró como remisión de la enfermedad y la desaparición del ADN viral. Sin embargo, el "oculto" o forma "silenciosa" de la infección por el VHB fue reportado por primera vez a finales de 1970 en los donantes de sangre con anti-hepatitis B core (anti-HBc) de anticuerpos sin HBsAg que transmite la hepatitis B (Haimanti Bhattacharya, 2015).

El significado de esta entidad clínica fue revisado en 1998 por un grupo de científicos europeos y estadounidenses como parte de las pruebas serológicas patrón "anti-HBc" solo. La demostración de esta entidad clínica ha traído consigo el concepto de "oculta" o infección por el VHB "silenciosa", lo que indica la presencia de ADN-HBV en ausencia de HBsAg detectable, esto se identificó mediante el uso de técnicas de biología molecular altamente sensible (Kim, 2014).

#### **2.2.5 ANTÍGENOS VIRICOS DE LA HEPATITIS B**

**HBsAg (Ag de superficie):** el primer marcador que aparece, es un Ag precoz que aparece entre la semana 3 y 6 alcanzado su máxima fase aguda o clínica, pero desaparece en las semanas ultimas de la fase clínica (Resino, 2014). Este marcador puede dar un resultado negativo en tres casos, el primero cuando la infección es reciente, es decir menos de un mes de exposición, segundo cuando no aparece el anticuerpo anti-HBsAg y tercero al tratarse de alguna mutación que impide la síntesis de HBsAg. Puede aparecer en los periodos de infección aguda o crónica e incubación constituyendo el

marcador serológico inicial para la determinación del virus (Serra, Servicio de Hepatología, 2013).

**Ag del core:** indica la replicación activa (Resino, 2014). Esta proteína es de poca utilidad clínica por el desarrollo de técnicas moleculares que permiten la detección de ADN, se puede detectar su presencia por medio de una biopsia hepática utilizando técnicas de inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia (Serra, Servicio de Hepatología, 2013).

**ADN polimerasa:** está presente en el hepatocito, lo que indica que en la replicación activa del virus (Resino, 2014). Se utiliza específicamente para valorar el pronóstico y ver la evolución de los tratamientos antivirales en el paciente (Krajden, McNabb, & Petric, 2012).

**Antígeno e (HBeAg):** es un marcador que proviene de la unión de la proteína “core” y “precore”, se relaciona la presencia de este antígeno con estados de la enfermedad de HBeAg +, siendo una cepa salvaje lo que se relaciona con una mutación pre-core por lo tanto no es sintetizado y se considera HBeAg +: portador inactivo (Serra, Servicio de Hepatología, 2013).

## 2.2.6 ANTICUERPOS DE HEPATITIS B

**Ac Anti-HBs (Ac frente a Ag de superficie):** son anticuerpos de protección estos se forman luego de la vacuna o un contacto previo con el virus HVB (Resino, 2014). Se presenta el marcador por una infección pasada o en personas que fueron vacunadas, permanece varios años activo, su detección se realiza por pruebas de inmunoensayo, un valor mayor a 10 UL es indicativo de protección para la persona (Alcaraz , 2013).

**Ac Anti- HBe:** detecta la presencia del virus en bajas concentraciones del mismo presente en la sangre, es buen pronóstico y alcanza su máximo cuando el virus se encuentra en la fase de convalecencia (Resino, 2014). Se utiliza en conjunto con otros marcadores de DNA viral, como una respuesta a la infectividad de tratamientos terapéuticos o para una identificación de cepas mutantes (Serra, Servicio de Hepatología, 2013).

**Ac Anti- HBc (Anticuerpo frente a Antígeno core):** lo que indica es la infección de Virus de Hepatitis B en algún momento IgM o IgG (Resino, 2014). Aparece cuando se genera la respuesta frente al HBcAg, es un buen indicativo de la infección incluso dura un periodo de 2 años después de la aparición (Serra, Servicio de Hepatología, 2013).

**Anticuerpo frente a antígeno core tipo IgM (anti-HBc IgM):** se utiliza para la determinación de hepatitis B aguda, además en aquellos pacientes que no tienen presente otros marcadores serológicos, debido a que se encuentran en el periodo de ventana (Alcaraz , 2013).

## **2.2.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**

### **2.2.7.1 PRUEBAS SEROLÓGICAS**

El virus en un primer contacto produce los síntomas asociados generando los antígenos y anticuerpos, con lo que es posible el diagnóstico y determinación del estado de la infección. La detección se realiza por una muestra de suero o plasma enfrentándolo con diferentes marcadores serológicos ( García & Torres, 2013). Actualmente no solo se utilizan pruebas convencionales como el inmunoensayo, sino también métodos moleculares, PCR, carga viral con el fin de obtener un correcto diagnóstico y control ( García & Torres, 2013).

Los diversos componentes del virus y los anticuerpos generados durante la infección aparecen y desaparecen en etapas concretas de la infección en estrecha relación con el curso de la enfermedad. Los marcadores séricos empleados habitualmente para el diagnóstico y seguimiento de la hepatitis B son HBsAg, anti-HBs, anti-HBc totales, IgM anti-HBc, HBeAg y anti-HBe. Los métodos que se emplean para determinar estos marcadores se basan en la tecnología de enzimoimmunoensayo (ELISA). En los últimos años, se han comercializado inmunoensayos totalmente automatizados que usan micropartículas como soporte de la fase sólida, con detección colorimétrica (MEIA) o quimioluminiscente (CLIA). (Joaquín Balanzó Tintoré, 2007).

### **2.2.7.2 ENZIMA INMUNO ENSAYO (EIA)**

Técnicas ELISAs específicas para la detección de antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), utilizan un anticuerpo anti-HBsAg en fase sólida, que se une al antígeno presente en el suero del paciente, el cual reacciona frente a un conjugado marcado con una enzima, la que en contacto con un sustrato apropiado, desarrolla una reacción colorimétrica, la que puede ser leída visual o instrumentalmente. (Mohiadeen Kurdi, 2014)

(Ray, 2012) La sensibilidad mínima exigida para una técnica ELISA es que detecte al menos 1 ng/ml de HBsAg (Instituto de Salud Pública, 2015).

Existen técnicas más rápidas para la detección de este antígeno, pero son menos sensibles que los ELISAs, y su lectura es generalmente visual (Instituto de Salud Pública, 2015). Dado que existen resultados falsos positivos que tienen estas técnicas de tamizaje, se recomienda confirmarlas con técnicas suplementarias. Estas últimas se basan en la neutralización del HBsAg, presente en la muestra del paciente, a través de su anticuerpo específico, las que son corridas en una prueba ELISA en paralelo, semejante al tamizaje, y en donde se mide posteriormente la absorbancia de la muestra no neutralizada y la neutralizada. (Instituto de Salud Pública, 2015).

### **2.2.7.3 ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA (CLIA)**

El método para la determinación de los anticuerpos anti-HBc cualitativamente es un ensayo competitivo, se realiza en dos etapas. Se utiliza un antígeno recombinante HBc con la finalidad de recubrir las partículas magnéticas y Ac monoclonales de ratón dirigidas contra el HBcAg. En la primera incubación, los Ac anti-HBc que se encuentran en los calibradores, muestras o controles se enlazan a una cantidad fija lo que limita HBcAg recombinante de la fase sólida. En la segunda incubación, el anticuerpo conjugado tiene que enlazar los epitopes que se encuentran libres de HBcAg. Mediante el ciclo de lavado se elimina el material no enlazado. Se procede añadir los reactivos induciendo una reacción de quimioluminiscencia, que se mide mediante un fotomultiplicador en unidades relativas de luz indicando que la medida es inversa a la concentración de Ac anti-HBc (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

### **2.2.7.4 PRUEBAS MOLECULARES**

El ADN del virus de la hepatitis B (DNA-VHB) es el primer marcador de infección por VHB que se detecta; aparece en el período de incubación de dos a cuatro semanas antes que el HBsAg. Es el mejor indicador de la replicación vírica, ya que se correlaciona estrechamente con la concentración de virus en la sangre y en el hígado. La determinación de la viremia es imprescindible para clasificar de manera adecuada a los pacientes crónicos, siendo muy útil para efectuar el pronóstico de evolución de la enfermedad y llevar a cabo una correcta selección de los pacientes que pueden beneficiarse de tratamiento antiviral y comprobar la eficacia terapéutica (Mayo-Clinic, 2015) (Shipeng Sun, 2011) (Mohiadeen Kurdi, 2014).

Actualmente, existen diversos métodos moleculares para detectar y cuantificar el DNA-VHB en el suero o en el plasma. La prueba se basa en dos grandes procesos: (1) preparación de la muestra para aislar el ADN del VHB y (2) amplificación simultánea por PCR de ADN diana y el engaño de la sonda de doble etiquetado escindido de detección oligonucleótido específica a la diana. La presencia de ADN del VHB en el suero es un marcador fiable de la replicación del VHB activo. Los niveles de ADN del VHB son detectables por 30 días después de la infección, por lo general alcanzan un máximo en el momento de la hepatitis aguda, y disminuyen y desaparecen cuando la infección se resuelve espontáneamente. En los casos de hepatitis viral aguda con resultados de la prueba de HBsAg equívocos, las pruebas de ADN del VHB en el suero puede ser un complemento útil en el diagnóstico de la infección por VHB aguda, ya que el ADN del VHB se puede detectar aproximadamente 21 días antes de HBsAg aparece típicamente en el suero. (Mayo-Clinic, 2015) (Shipeng Sun, 2011) (Mohiadeen Kurdi, 2014).

Los pacientes con infección crónica por VHB no logran eliminar el virus y permanecen HBsAg positivo. Tales casos pueden ser clasificados como (replicativa) VHB crónica activa (altos niveles de HBV, hepatitis Be antígeno [HBeAg] -positivo) o inactivos (nonreplicative) VHB crónica (niveles bajos o indetectables de ADN del VHB, HBeAg-negativo). Los niveles de ADN del VHB en el suero son útiles para determinar el estado de la infección crónica por VHB, mediante la diferenciación entre los estados de enfermedad activa e inactiva. (Shipeng Sun, 2011).

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**Virus:** Conjunto de genes, compuestos de ADN o ARN, empacados en un recubrimiento que contiene proteínas (Kenneth Ryan, 2010) (Murray & Rosenthalr, 2013).

**Hepatitis viral:** enfermedad sistémica que afecta principalmente al hígado. (Jawetz, 2010).

**Hepatitis B:** virus de DNA con envoltura perteneciente a la familia Hepadnaviridae. (Kenneth Ryan, 2010).

**Virión:** Partícula viral completa formada por una o más moléculas de ADN o ARN rodeada por una cubierta de proteínas simple o por cubiertas más complejas que contienen carbohidratos, lípidos y proteínas. (Murray & Rosenthalr, 2013) (Dinamarca, 2007).

**Genoma viral:** consiste en una doble cadena parcial de DNA con un trozo corto de cadena simple. (Kenneth Ryan, 2010).

**Anti – core:** es el anticuerpo contra el antígeno core, se presenta en hepatitis B agudas como IgM anticore y en infecciones crónicas se presenta como IgG. (Benaderette , 2010).

**Antígeno de Superficie:** envoltura formada por una doble capa de lípidos que contiene el antígeno de superfi cie de la hepatitis B. (Kenneth Ryan, 2010).

**OBI:** hepatitis oculta puede deberse a la presencia de virus con mutaciones en el HBsAg lo que produce que se modifique. (Ríos-Ocampo, Restrepo, Cortés, Correa, & Navas, 2013)

**Carga viral:** cantidad de virus presentes en sangre, esperma o saliva (Rios-Ocampo, Cortes-Mancer, Camilo Olarte, Soto, & Navas, 2014)

**Período de ventana:** o de seroconversión, demostración de la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno concreto en el suero de un individuo, previamente negativo para dicha especificidad antigénica (Alcaraz , 2013).

**PCR:** reacción en cadena de a polimerasa, técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. (Stirling, 2003).

**ELISA:** método immuno-enzimático utilizado para evidenciar la presencia de anticuerpos o de antígenos específicos en una muestra de sangre. Este examen utiliza una proteína llamada enzima, que se fija a ciertos componentes específicos. Ensayo que se basa en placas diseñadas para la detección y cuantificación de sustancias como proteínas, anticuerpos, péptidos, antígenos y hormonas (Overview of ELISA, 2015).

**CLIA:** Ensayo inmunológico para la determinación cualitativa de los anticuerpos totales dirigidos contra el antígeno de un virus (DiaSorin-S.p.A., LIAISON XL MUREX HBsAg Quant, 2014).

## CAPÍTULO III

### 3.1 MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1 MATERIALES Y MÉTODOS

**3.1.1.1 Tipo de Estudio:** Es un estudio de tipo descriptivo, observacional y transversal debido a que los resultados permitirán describir la frecuencia de hepatitis B oculta y su relación con los otros marcadores serológicos, observacional porque no se manipulará ninguna variable y transversal porque la investigación se llevará a cabo en un determinado período.

**3.1.1.2 Tipo de Muestreo:** Se utilizará un muestreo aleatorio simple en el período 2015, todas las muestras de donantes que acuden al banco de sangre del HCAM tienen la misma probabilidad de formar parte del estudio.

**3.1.1.3 Tamaño de Muestra:** Se utilizó la fórmula de población finita con un grado de confianza del 99% y un error alfa del 0.1, se conoce que el total de donantes anuales que acuden al Banco de Sangre del Hospital Carlos Andrade Marín es de 12.000.

$$n = \frac{N\sigma^2 Z^2}{(N-1)e^2 + \sigma^2 Z^2}$$

$$n = \frac{(12000) * (0,5^2) * (2,58^2)}{(12000 - 1) * (0,1^2) + (0,5^2) * (2,58^2)}$$

$$n = 164,14$$

Dónde:

n = el tamaño de la muestra.

N = tamaño de la población.

$\sigma$  = Desviación estándar de la población  
0,5

Z = Valor obtenido mediante niveles de confianza 99% de confianza equivale  
2,58

e = Límite aceptable de error muestral  
10% = 0,1

**Decisión:** con un nivel de confianza del 99% y un error alfa de 0,1 se establece un total de 164 muestras para el análisis molecular, estas muestras deberán mantener los criterios de inclusión determinados para el estudio.

**3.1.1.4 Criterios de Inclusión:** Todas las muestras que sean positivas para el marcador serológico de HBsAg y/o anti-core.

**3.1.1.5 Criterios de Exclusión:** Todas las muestras que son negativas para los dos marcadores serológicos.

**3.1.1.6 Análisis Estadístico:** Las variables serán recolectadas en una base de datos creada en el programa Excel y analizados en el programa SPSS V0.20; se aplicará una estadística descriptiva para la presentación de frecuencias relacionadas con datos cualitativos. Para la relación entre las variables se utilizará la prueba estadística de chi-cuadrado y la prueba de correlación de Spearman.

## **3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

**3.2.1 Variable dependiente:** Presencia de Hepatitis Oculta

**3.2.2 Variable independiente:** Marcadores serológicos: HBsAg, anti-core, HVB-ADN.

## Operacionalización de Variables

Variable dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo de variable	Técnica
Hepatitis B oculta.	Se define a aquella infección hepática que presenta un perfil serológico negativo (Muselman, Wafa, & Fawza, 2014)	Presencia de ADN viral para VHB	Ausencia o presencia de una amplificación en geles de poliacrilamida	Presencia de la banda pb.	Nominal	Cualitativa	Aplicación de la técnica PCR.
Variables independientes	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala	Tipo de variable	Técnica
Anti-core total	Respuesta humoral ante la presencia del virus de la hepatitis B (Muselman, Wafa, & Fawza, 2014)	Presencia o ausencia para anticuerpos anti-core total	Reactivo No-Reactivo	Total de muestras reactivas anti-core/Total de donantes analizados. Total de muestras no reactivas anti-core/ Total de donantes analizados	Nominal	Cualitativa	Resultados de las pruebas CLIA/ELISA.
HBsAg	Constituye el primer marcador serológico que se manifiesta en las primeras 4 semanas luego de la infección (Alcaraz , 2013)	Presencia o ausencia de antígenos de superficie de VHB	Reactivo No-Reactivo	Total de muestras reactivas HBsAg/Total de donantes analizados. Total de muestras no reactivas HBsAg/ Total de donantes analizados	Nominal	Cualitativa	Resultados de las pruebas CLIA/ELISA.
ADN VHB	Composición del virus de HB y detectado por las técnicas moleculares ( Arora, Doda, & Kirtania, 2014)	Replicación viral	Positivo Negativo	Número de muestras positivas para ADN/Total de muestras positivas HBsAg. Número de muestras positivas para ADN/Total de muestras positivas para anti-core total. Número de muestras negativas para ADN/Número de muestras positivas para HBsAg Número de muestras negativas para ADN/Número de muestras positivas para anti-core total	Nominal	Cualitativa	Resultados de la prueba molecular y su correlación con las pruebas serológicas.

### 3.3 MATERIALES Y PROCESO

#### 3.3.1 Materiales

Los materiales a ser utilizados en esta investigación dependerán del tipo de metodología:

- ✓ LIAISON XL Analyzer – DiaSorin
- ✓ TECAN – freedom EVOlyzer
- ✓ Centrifuga de mesa universal modelo z 383 THERMO SCIENTIFIC REF: 272.00 V08
- ✓ Microcentrífuga THERMO SCIENTIFIC REF: 75002465
- ✓ Termociclador Mastercycler de EPPENDORF estándar y a tiempo real
- ✓ Cámara de electroforesis – sistema de electroforesis de amplio gel THERMO SCIENTIFIC REF: D2
- ✓ Transiluminadores UV CLEAVER REF: CSLUVTS254
- ✓ Tubos de vidrio Serum Plus blood Tube BD Vacutainer REF: 367820
- ✓ Agujas para toma múltiple, 21G x 38 mm BD Vacutainer REF: 360213
- ✓ Alcohol Prep Pad VanSwab
- ✓ Crio-viales tapa rosca con seguro de caucho 3ml
- ✓ Tubos para PCR de 0,5 ml, pared fina EPPENDORF REF: 0030 124.537
- ✓ Pipetas EPPENDORF
- ✓ Puntas para pipetas BIOCLEAN

#### 3.3.2 Reactivo

**ELISA:** Kit Murex HBsAg Version 3 DiaSorin REF: 9F80-01/-05, GE34/36

**CLIA:** Kit Liaison anti – HBc DiaSorin REF: 310130

**EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL:** Kit de extracción AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit AXYGEN REF: AP-MN-BF-VNA-50

#### PCR

- › Master Mix
- › dNTP's (Dinucleotidos trifosfatados)
- › Cebadores “primers”

- › DNA molde
- › Polimerasa
- › Ladder: 270 pb
- › Control positivo: Beta-Globina humana Takara-ClonTech
- › DNAzap

### 3.3.3 Control de Calidad

**ELISA:** Los resultados de un ensayo son válidos si los controles cumplen los requisitos siguientes: Control negativo: la A450/Ref media del control negativo es inferior a 0.15 o la A450 media del control negativo es inferior a 0.2. Control positivo: la A450/Ref o la A450 del control positivo es superior a 0.8 por encima de la A450/Ref o a la A450 media del control negativo. Los ensayos que no cumplen estos criterios se deben repetir. También se utilizaron sueros con reactividad conocida (DiaSorin, 2009).

**CLIA:** Los controles LIAISON se deben analizar individualmente para evaluar las prestaciones del test. El control de calidad se debe realizar analizando los controles LIAISON® Anti-HBc (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

- (a) por lo menos una vez por cada día de trabajo,
- (b) cuando se usa un nuevo integral de reactivos,
- (c) cuando se calibra el kit,
- (d) cuando se usa un nuevo lote de reactivos starter,
- (e) cuando se determina la adecuación de las prestaciones del integral de reactivos abierto con más de ocho semanas de anterioridad, o según las disposiciones legislativas y las reglamentaciones vigentes en cada país (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

Los valores de los controles tienen que estar comprendidos entre los rangos esperados: cada vez que uno o ambos valores estén fuera de los rangos esperados habrá que volver a efectuar la calibración y probar de nuevo los controles. Si los valores experimentales de los controles estén de nuevo fuera de los rangos predefinidos después de la calibración, habrá que repetir el test usando un frasco de control no abierto. Si los valores de los controles estén fuera de los rangos esperados, los resultados de las muestras no deben ser notificados (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

Las prestaciones de otros controles se deben evaluar para asegurar su compatibilidad con este test antes del uso. Por lo tanto es indispensable establecer los intervalos de los valores de los materiales usados para el control de calidad (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

**PCR:** La validación y el control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realizan mediante el set de control de Beta-globulina humana, el cual contiene un conjunto de cebadores de PCR que reconoce el gen de la beta-globina humana en el cromosoma 11. El set de control beta-globina humana puede ser utilizado como un control positivo experimental durante protocolos tales como PCR. (Takara-ClonTech). Como control negativo se utiliza agua ultra pura. (Alencar, 2008).

### **3.4 PROCEDIMIENTO**

El estudio se realizó en cuatro fases:

**3.4.1 Fase Uno:** Consentimiento informado (ANEXO 1).

Solicitud de autorización del Hospital “Carlos Andrade Marín” (ANEXO 2).

Solicitud de autorización de recolección de muestras Banco de Sangre HCAM (ANEXO 3).

**3.4.2 Fase Dos:** La recolección de toma de muestras se realizó a partir del mes de enero de 2015 hasta agosto de 2015 con ayuda de profesionales del Banco de Sangre, se ingresarán los datos de los donantes en una base de datos realizada en EXCEL, las muestras serán seleccionada mediante muestreo aleatorio simple.

**3.4.3 Fase Tres:** La recolección de muestra de suero se realizó tomando 3 ml del tubo piloto de los donantes de sangre a los crio-viales, se procedió a rotular correctamente llevando un registro en la base de datos y en físico, se mantuvo la cadena de frío a -20°C hasta el procesamiento de las mismas (ANEXO 4).

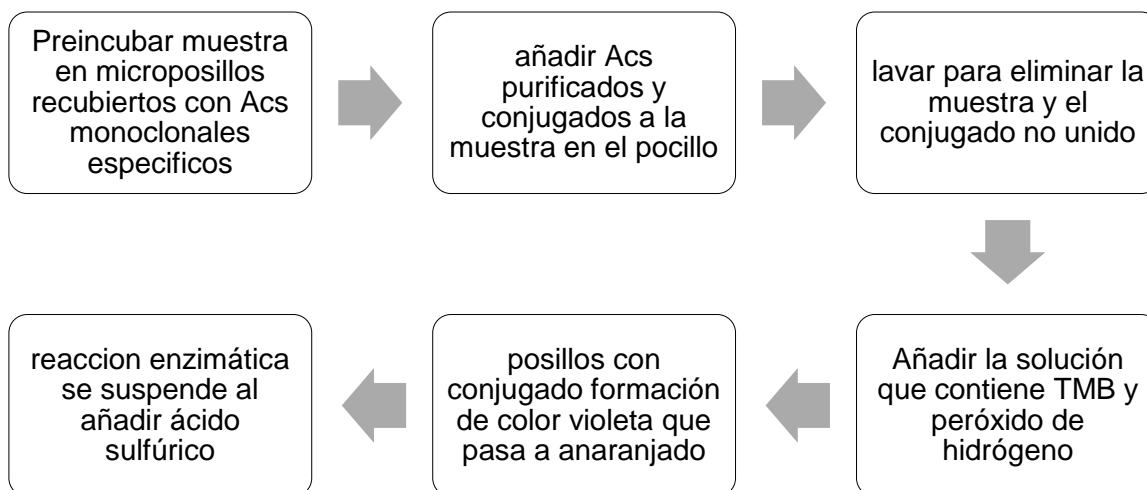
**3.4.4 Fase Cuatro:** Conservación de las muestras y técnicas

Conservación de las muestras se realizó a temperatura -20°C.

### Realización de la prueba de EIA

Fundamento de la prueba: semiautomático. Murex HBsAg Version 3 es un enzimoimmunoanálisis rápido y sensible para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en suero o plasma humano; el agente causante de la hepatitis sérica es el virus de la hepatitis B (VHB), que es un virus de DNA con envoltura. Durante la infección, el VHB produce un exceso de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), también conocido como antígeno Australia, que se puede detectar en la sangre de los individuos infectados. El HBsAg es el primer marcador serológico después de la infección por el VHB y aparece entre la 1ª y la 10ª semana después de la aparición de la hepatitis. El HBsAg persiste durante la fase aguda y desaparece en la fase tardía de la convalecencia. En el caso de que el HBsAg no desaparezca en los 6 meses siguientes, el paciente se convierte en portador crónico del HBsAg. La sangre de los individuos en la fase aguda o crónica de la enfermedad es potencialmente infecciosa y no se debe utilizar para transfusiones. Este ensayo permite detectar muestras de suero, plasma con EDTA o plasma con citrato potencialmente infecciosas. (DiaSorin, 2009) (ANEXO 5).

Procedimiento:



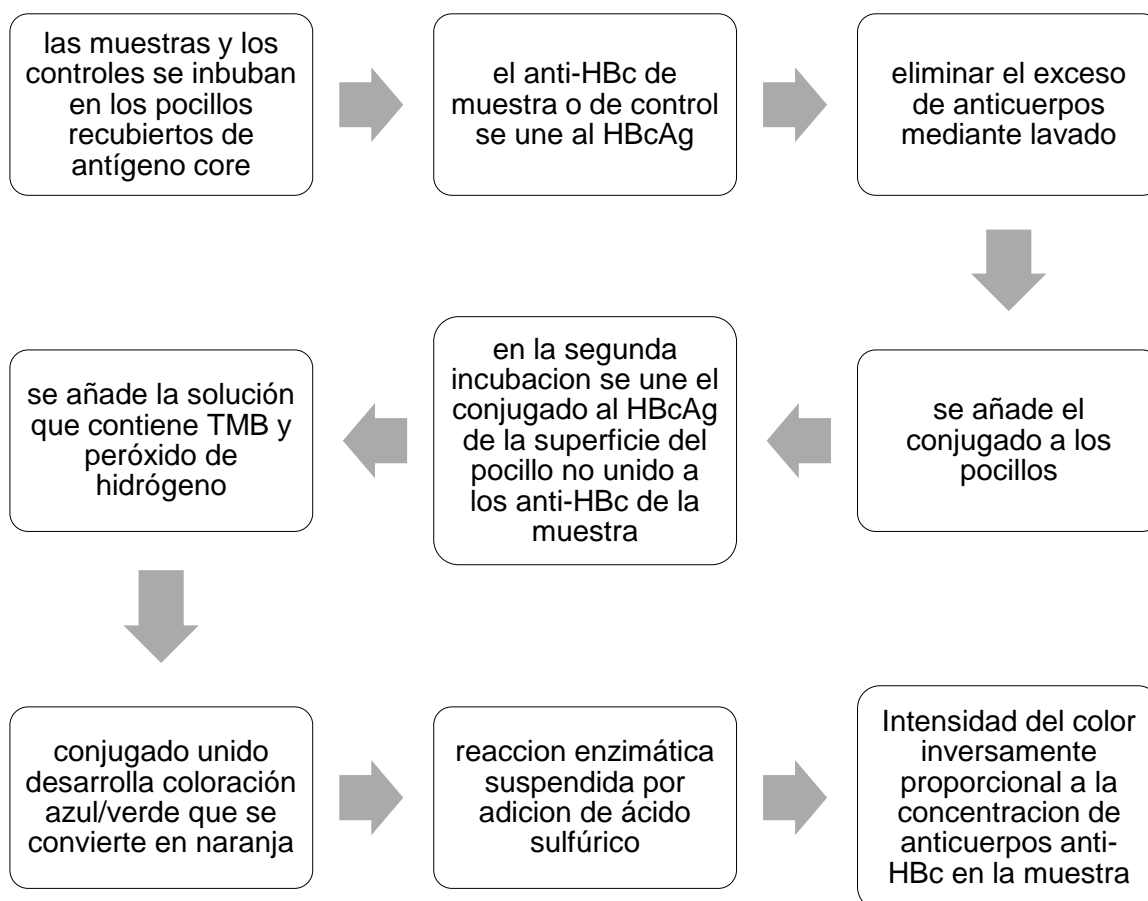
(DiaSorin, 2009).

### Realización de la prueba de CLIA

Fundamento de la prueba: Murex anti-HBc (total) se utiliza para la detección de los anticuerpos frente al antígeno core de la hepatitis B (anti-HBc) en suero o plasma; es un enzimoimmunoanálisis para la detección de los anticuerpos frente al antígeno core del

virus de la hepatitis B (anti-HBc). Los títulos del antiHBc aumentan rápidamente después de la exposición al VHB1 y pueden persistir durante varios años a títulos más bajos después de la eliminación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y de la resolución de la infección.<sup>2</sup> La presencia de anti-HBc es, por tanto, un indicio de una exposición al VHB ya pasada o de una infección activa en el período agudo/crónico. Durante la infección activa, tanto las inmunoglobulinas M (IgM) como las G (IgG) anti-HBc están normalmente presentes y pueden ser el único marcador serológico de una infección por el VHB durante el "período ventana", cuando el HBsAg se ha eliminado pero antes de que los anticuerpos frente al HBsAg sean detectables.<sup>3</sup> El ensayo Murex anti-HBc (total) detecta los anticuerpos IgG e IgM frente al antígeno core del virus de la hepatitis B. (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014) (ANEXO 6).

Procedimiento:

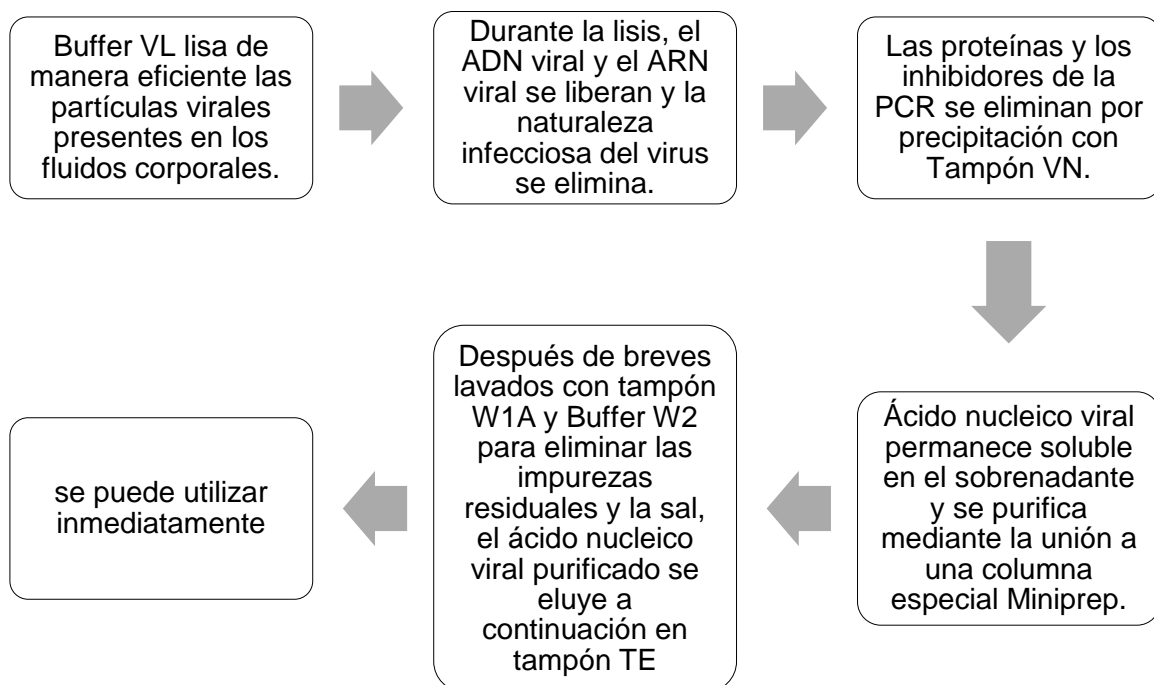


(DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

### Extracción de ADN viral

Fundamento de la técnica: Los virus no sólo son potencialmente patógenos, también juegan un papel importante en la biología molecular y la investigación biomédica. El aislamiento eficiente de ADN viral y ARN viral con alta pureza y la integridad es a menudo un desafío. El Kit AxyPrep Viral DNA / RNA Miniprep proporciona un método simple, rápido y eficaz para la purificación de ácido nucleico viral a partir de 200 uL de fluido corporal, incluyendo plasma, suero, ascitis, sobrenadante de cultivo celular, fluido cerebroespinal, orina, etc. (Axygen-Biosciences, 2009) (ANEXO 7).

Procedimiento:



(Axygen-Biosciences, 2009).

\*El ácido nucleico purificado por este método está libre de contaminantes, tales como proteínas, lípidos, pigmentos e inhibidores cuantitativos PCR / RT-PCR, y es especialmente adecuado para los exigentes análisis PCR / RT-PCR. Tanto el ADN y el ARN viral se purifican simultáneamente por este método. (Alencar, 2008).

## Análisis en PCR (ANEXO 8)

### Oligonucleótidos

Primer 1778	5' GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT 3'
Primer 2017	5' ATG GGA TCC CTG GAT GCT GGG TCT TCC AAA 3'
Primer 2032	5' CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT 3'
Primer 1763	5'GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA 3'

(Alencar, 2008)

Tamaño del fragmento 200pb

#### Procedimiento:

Primera amplificación: Se realiza la primera amplificación, se añade 5 ul de ADN extraído, se coloca en el termociclador utilizando 35 ciclos a una temperatura de 94 ° C por 15 segundos, a una temperatura de 50 ° C por 15 segundos y a una temperatura de 72 °C por 30 segundos.

Agua Mili Q	32.75 ul
Buffer 10 X (s/MgCl <sub>2</sub> )	5 ul
dNTPs 10 mM	1.00 ul
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2.00 ul
Taq polimerasa	0.25 ul
Primer 1763	2.00 ul
Primer 2032	2.00 ul
Muestra DNA	5.00 ul

(Alencar, 2008)

Segunda amplificación: Se realiza la primera amplificación, se añade 5 ul de ADN extraído de la primera amplificación, se coloca en el termociclador utilizando 35 ciclos a una temperatura de 94 ° C por 15 segundos, a una temperatura de 50 ° C por 15 segundos y a una temperatura de 72 °C por 30 segundos.

Agua Mili Q	32.75 ul
Buffer 10 X (s/MgCl <sub>2</sub> )	5 ul
dNTPs 10 mM	1.00 ul
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2.00 ul
Taq polimerasa (5U/uL)	0.25 ul
Primer 1778 (10pmoles/ul)	2.00 ul
Primer 2017 (10pmoles/ul)	2.00 ul
Muestra primera amplificación	5.00 ul

(Alencar, 2008)

## **3.5 CONTROL DE CALIDAD**

### **3.5.1 Control de Calidad EIA**

Los resultados de un ensayo son válidos si los controles cumplen los requisitos siguientes: Control negativo: la A450/Ref media del control negativo es inferior a 0.15 o la A450 media del control negativo es inferior a 0.2. Control positivo: la A450/Ref o la A450 del control positivo es superior a 0.8 por encima de la A450/Ref o a la A450 media del control negativo. Los ensayos que no cumplen estos criterios se deben repetir. También se utilizaron sueros con reactividad conocida (DiaSorin, 2009).

### **3.5.2 Control de Calidad CLIA**

Los controles LIAISON se deben analizar individualmente para evaluar las prestaciones del test. El control de calidad se debe realizar analizando los controles LIAISON® Anti-HBc (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

- (a) por lo menos una vez por cada día de trabajo,
- (b) cuando se usa un nuevo integral de reactivos,
- (c) cuando se calibra el kit,
- (d) cuando se usa un nuevo lote de reactivos starter,
- (e) cuando se determina la adecuación de las prestaciones del integral de reactivos abierto con más de ocho semanas de anterioridad, o según las disposiciones legislativas y las reglamentaciones vigentes en cada país (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

Los valores de los controles tienen que estar comprendidos entre los rangos esperados: cada vez que uno o ambos valores estén fuera de los rangos esperados habrá que volver a efectuar la calibración y probar de nuevo los controles. Si los valores experimentales de los controles estén de nuevo fuera de los rangos predefinidos después de la calibración, habrá que repetir el test usando un frasco de control no abierto. Si los valores de los controles estén fuera de los rangos esperados, los resultados de las muestras no deben ser notificados (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

Las prestaciones de otros controles se deben evaluar para asegurar su compatibilidad con este test antes del uso. Por lo tanto es indispensable establecer los intervalos de los

valores de los materiales usados para el control de calidad (DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014).

### **3.5.3 Control de Calidad de Pruebas moleculares**

La validación y el control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realizan mediante el set de control de Beta-globulina humana, el cual contiene un conjunto de cebadores de PCR que reconoce el gen de la beta-globina humana en el cromosoma 11. El set de control beta-globina humana puede ser utilizado como un control positivo experimental durante protocolos tales como PCR (Takara-ClonTech). Como control negativo se utiliza agua ultra pura. (Alencar, 2008).

## CAPÍTULO IV

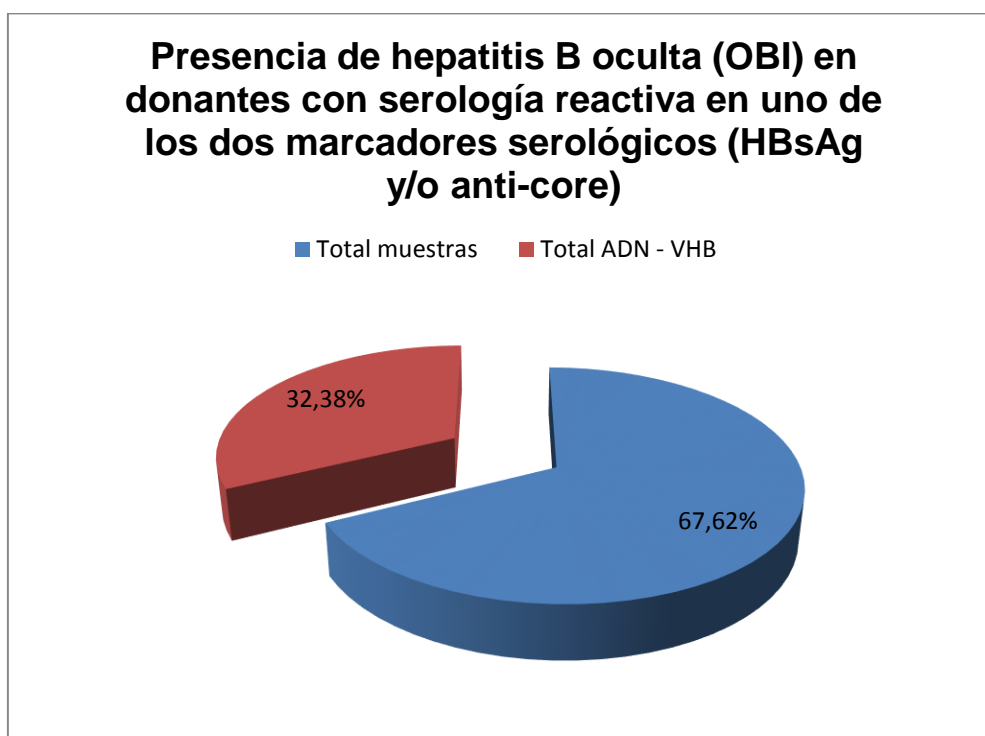
### 4.1 RESULTADOS

El presente analizó un total de 165 donantes de sangre con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core) en el Hospital “Carlos Andrade Marín” en la ciudad de Quito, realizado en el período 2015.

Del total de donantes (165) con serología reactiva HBsAg y/o anti-core (IgM e IgG), un total de 69 resultaron positivos en la detección de ADN – VHB mediante la técnica de PCR; los resultados se exponen en la Tabla N°1, determinando la presencia de hepatitis B oculta (OBI) en donantes con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core) (Gráfico N°1).

	Número de donantes
Total de muestras con serología reactiva	165
Total de muestras ADN - VHB positivo	79

**Tabla N°1** Presencia de hepatitis B oculta (OBI) en donantes con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core)

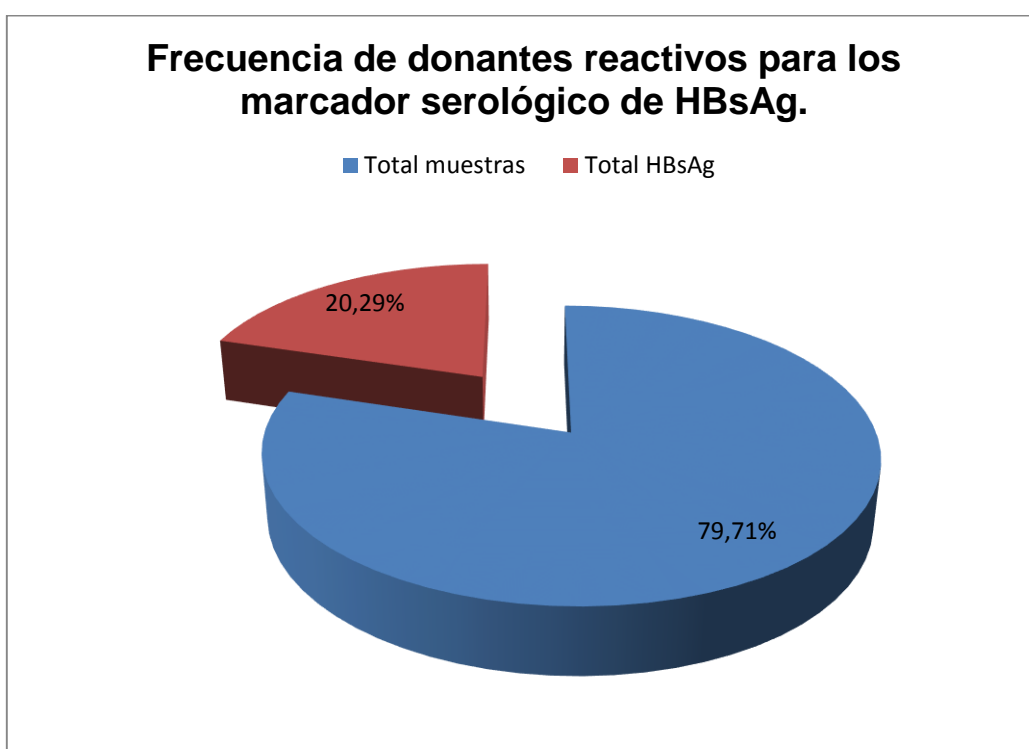


**Gráfico N°1** Presencia de hepatitis B oculta (OBI) en donantes con serología reactiva en uno de los dos marcadores serológicos (HBsAg y/o anti-core).

El 20,29% (42) de donantes fueron HBsAg reactivo, dicho resultados fueron determinados por la técnica de ELISA específica para la detección de antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), se presentan en la Tabla N°2, revelando la frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de HBsAg (Gráfico N°2).

	Número de donantes	Frecuencia
Total de muestras con serología reactiva	165	79,71%
Total de muestras con serología reactiva - HBsAg	42	20,29%

**Tabla N°2** Frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de HBsAg

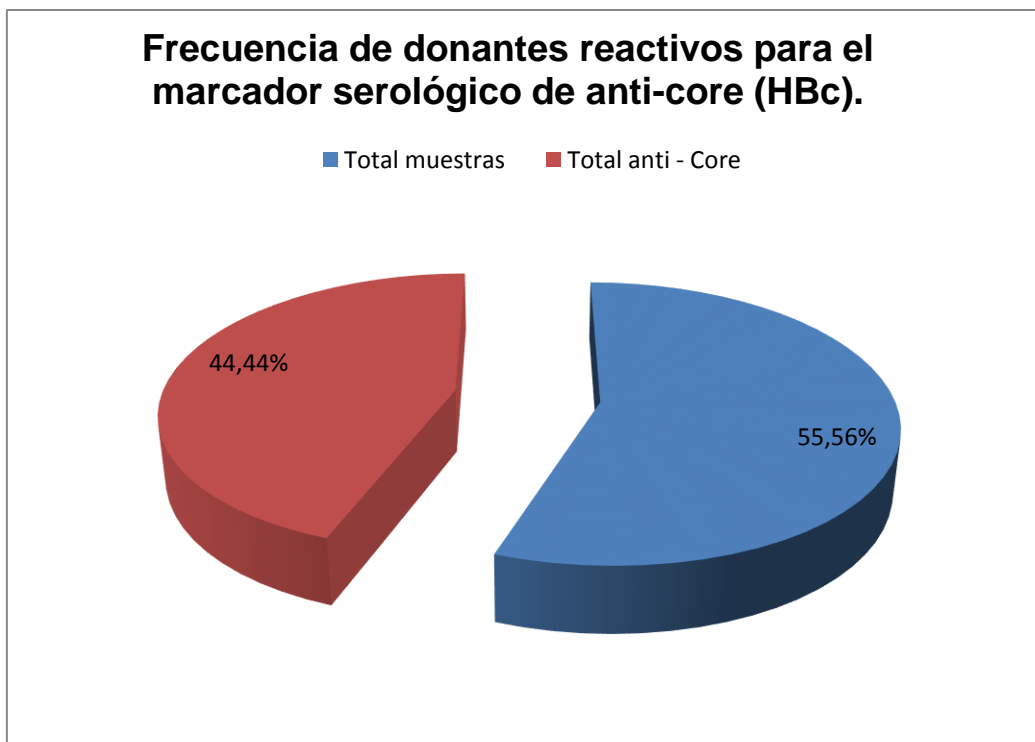


**Gráfico N°2** Porcentaje de donantes reactivos para el marcador serológico de HBsAg.

El 44,44% (132) de donantes resultaron ser anti-core positivo, estos resultados se evidenciaron mediante el método para la determinación de los anticuerpos anti-HBc resultaron positivos, se evidencia en la Tabla N°3, mostrando la frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de anti-HBc (Gráfico N°3).

	Número de donantes	Frecuencia
Total de muestras con serología reactiva	165	55,56%
Total de muestras con serología reactiva – anti-HBc	132	44,44%

**Tabla N°3** Frecuencia de donantes reactivos para el marcador serológico de anti – HBc

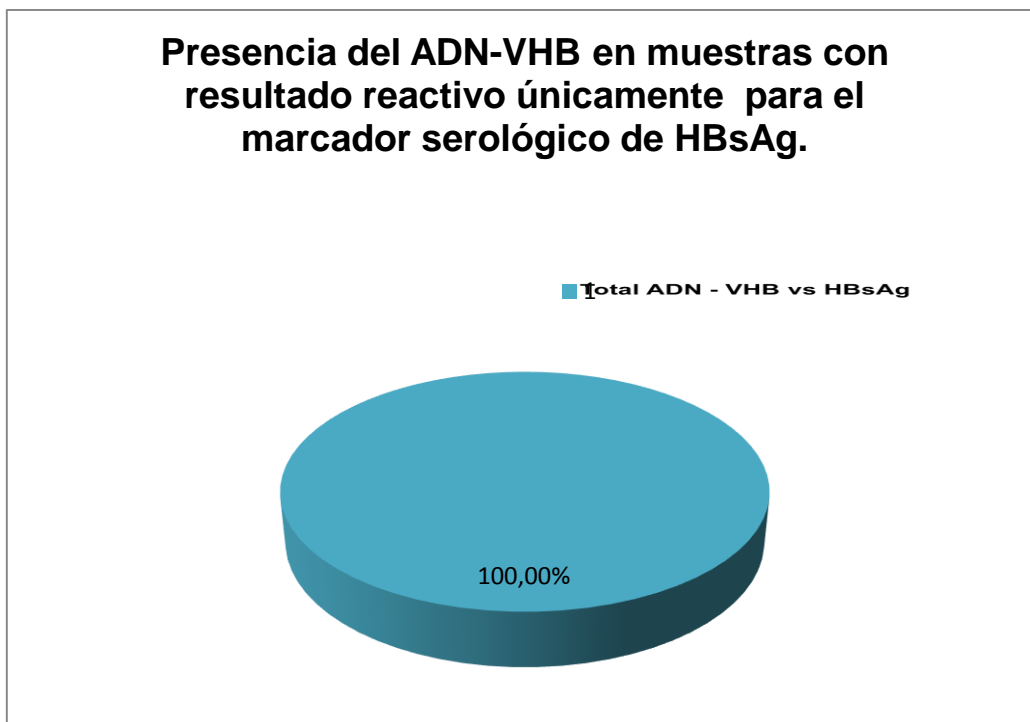


**Gráfico N°3** Porcentaje de donantes reactivos para el marcador serológico de anti-HBc.

Del total de donantes de sangre con resultados reactivos en HBsAg, el 100% presentaron ADN – VHB, los resultados se muestran en la Tabla N°4 - Gráfica N°4, demostrando así la presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de HBsAg.

	Número de donantes
Total de muestras con serología reactiva - HBsAg	42
Total de muestras ADN – VHB	42

**Tabla N°4** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de HBsAg

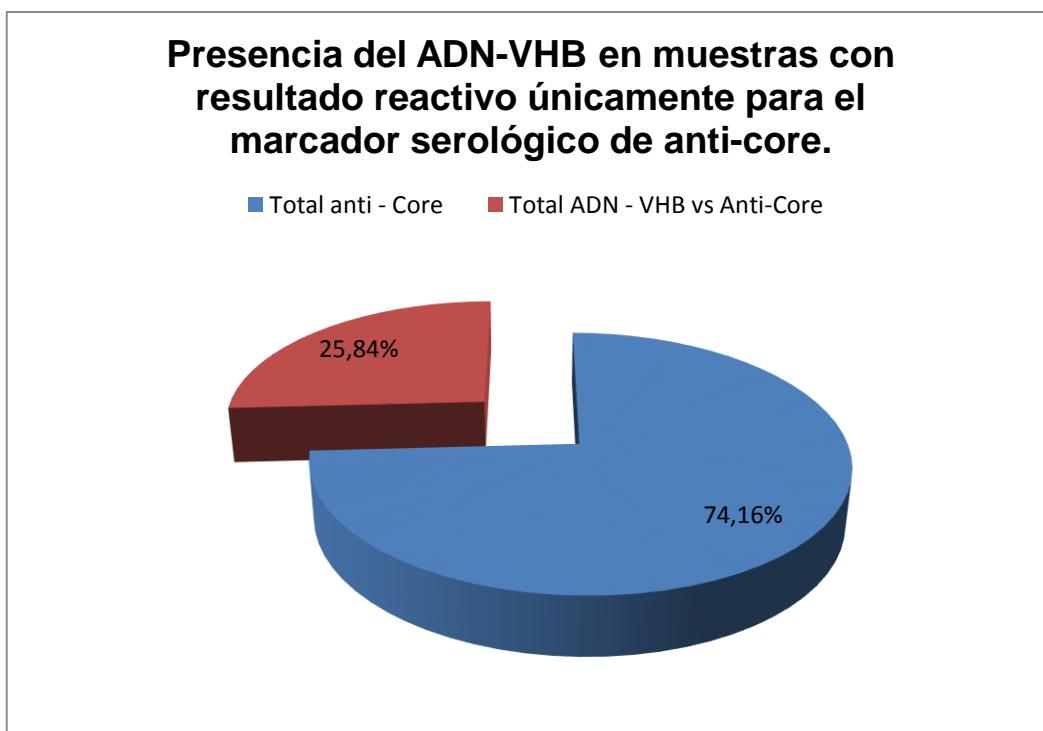


**Gráfica N°4** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de HBsAg

Del total de donantes de sangre con resultados positivos para anti-HBc, el 74,16% presentaron ADN – VHB, los resultados se muestran en la tabla N°5 – Gráfica N° 5, evidenciando la presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de anti-core.

	Número de donantes	Frecuencia
Total de muestras con serología reactiva – anti-HBc	132	25,84%
Total de muestras ADN – VHB	46	74,16%

**Tabla N°5** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de anti-core.

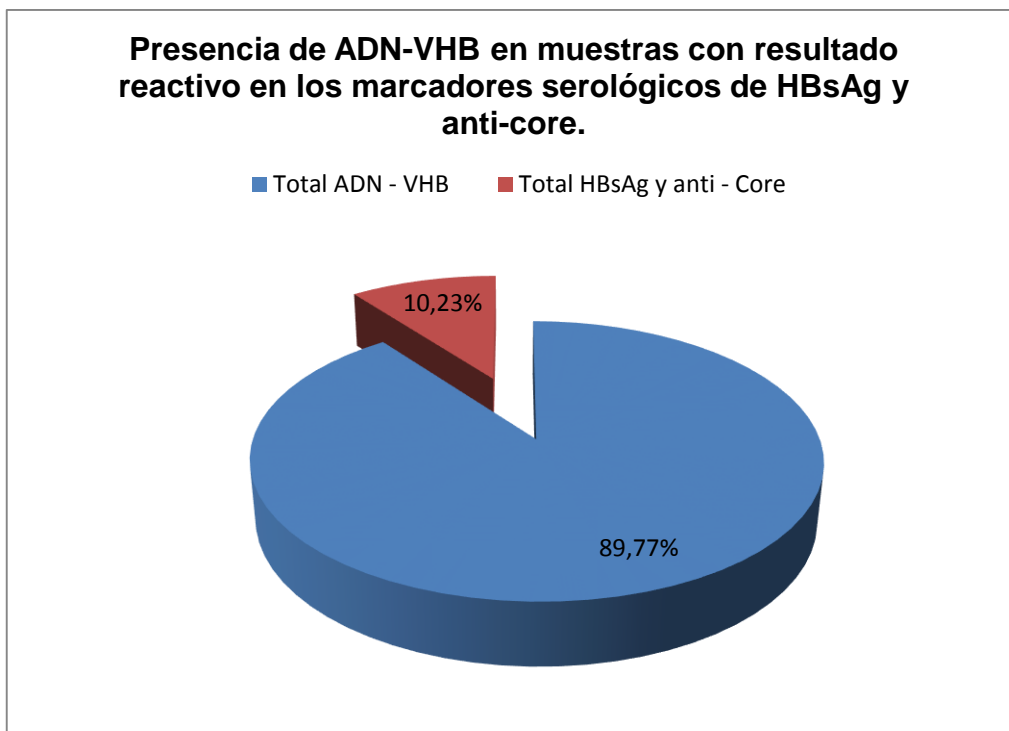


**Gráfica N°5** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo únicamente para el marcador serológico de anti-core.

Del total de muestras reactivas para los marcadores serológicos HBsAg y anti-core, el % fueron positivas para ADN-VHB, en la tabla N°6 – Gráfica N° 6 se exponen los resultados comprobando la presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo en los marcadores serológicos de HBsAg y anti-core.

	Número de donantes	Frecuencia
Total de muestras ADN - VHB positivo	79	89,77%
Total de muestras HBsAg y anti – Core reactivos	9	10,23%

**Tabla N°6** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo en los marcadores serológicos de HBsAg y anti-core

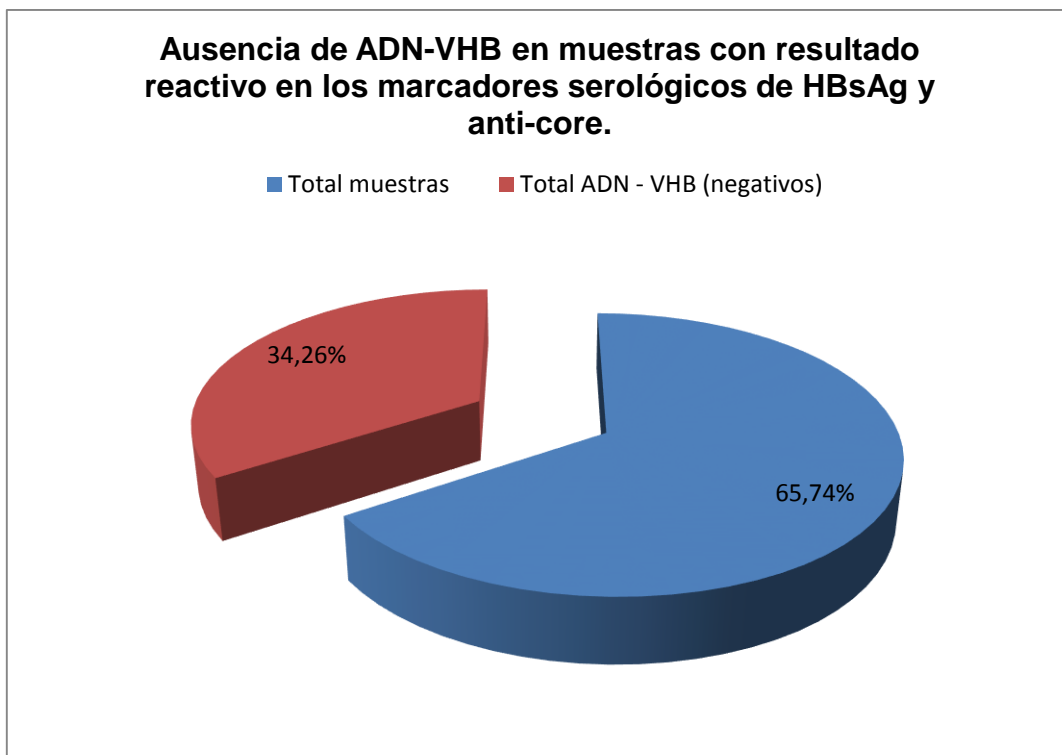


**Gráfica N°6** Presencia del ADN-VHB en muestras con resultado reactivo en los marcadores serológicos de HBsAg y anti-core.

El número total de donantes que mediante la técnica de PCR para la detección del ADN viral VHB resultaron negativos fueron 86, en la Tabla N°7 se presentan los resultados mostrando la frecuencia de donantes con serología positiva, pero sin ADN viral VHB (Gráfico N°7).

	Número de donantes	Frecuencia
Total de muestras con serología reactiva	165	100%
Total de muestras ADN-HBV negativo	86	34,26%

**Tabla N°7** Donantes que mediante la técnica de PCR para la detección del ADN viral VHB resultaron negativos



**Gráfica N°7** Donantes que mediante la técnica de PCR para la detección del AND viral VHB resultaron negativos.

La información específica del estadístico chi-cuadrado (asociación entre variables) entre HBsAg y anti – HBc; en donde se puede evidenciar que el valor del estadístico chi-cuadrado de Pearson es: 948,593 con una significancia de 1,000 la cual es mayor que la significancia establecida para la prueba de  $\alpha=0,05$  se presenta en la Tabla N°8.

<b>Pruebas de chi-cuadrado</b>		
	Valor	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	948,593	1,000
N de casos válidos	165	

**Tabla N°8** Prueba de chi-cuadrado HBsAg por anti – HBc.

Determinándose que la variable HBsAg y la variable anti – HBc no están relacionadas, es decir, no existe asociación entre ellas. Por lo tanto, no hay relación de dependencia entre las dos variables.

La información determinada del estadístico chi-cuadrado (asociación entre variables) entre HBsAg y ADN – VHB; el valor del estadístico chi-cuadrado de Pearson es: 61,334

con una significancia de 0,013 la cual es menor que la significancia establecida para la prueba de  $\alpha=0,05$ , se muestra en la Tabla N°9.

<b>Pruebas de chi-cuadrado</b>		
	Valor	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	61,334	,013
N de casos válidos	165	

**Tabla N°9** Prueba de chi-cuadrado HBsAg por ADN – VHB.

Estableciendo que la variable HBsAg y la variable ADN - VHB están relacionadas, es decir, existe asociación entre ellas. Por lo tanto, se presenta dependencia entre las dos variables.

La información señalada del estadístico chi-cuadrado (asociación entre variables) entre anti – HBc y ADN – VHB; la información del chi-cuadrado de Pearson es: 148,103 con una significancia de 0,000 la cual es menor que la significancia establecida para la prueba de  $\alpha=0,05$ , se exhibe en la Tabla N°10.

<b>Pruebas de chi-cuadrado</b>		
	Valor	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	148,103	,000
N de casos válidos	165	

**Tabla N°10** Prueba de chi-cuadrado anti – HBc por ADN – VHB.

La variable anti – HBc y la variable ADN - VHB están relacionadas, es decir, existe asociación entre ellas.

El coeficiente de correlación de Spearman indica la fuerza de la relación entre las variables; en la Tabla N° 11 se demuestra la correlación entre HBsAg y anti – Core indicando una correlación débil bidireccional entre estas dos variables debido a su valor de -0,611; anti – Core y ADN-VHB revelando una correlación débil bidireccional entre las mismas ya que su valor es 0,045; y HBsAg y ADN-VHB probando la correlación bilateral fuerte ya que el coeficiente es de 1,000.

			HBsAg	ANTI-CORE	ADN-VHB
Rho de Spearman	HBsAg	Coeficiente de correlación	1,000	-0,611	0,601
		Sig. (bilateral)	.	0,000	0,000
		N	165	165	165
	ANTI-CORE	Coeficiente de correlación	-0,611	1,000	0,045
		Sig. (bilateral)	0,000	.	0,567
		N	165	165	165
	ADN-VHB	Coeficiente de correlación	0,601	0,045	1,000
		Sig. (bilateral)	0,000	0,567	.
		N	165	165	165

**Tabla N°11** Correlación de Spearman.

## 4.2 DISCUSIÓN

Según la clasificación de la OMS, en Suramérica las prevalencias para infección por el virus de la hepatitis B son diversas. Entre las zonas geográficas de alta prevalencia, está la región amazónica, cuya población presenta prevalencias para el HBsAg que varían entre 3,4 y 54 %, en países como Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Mauricio Beltrán, 2011).

El fenómeno de la infección oculta por el VHB se caracteriza por una marcada inhibición de la replicación viral y de la expresión de genes del VHB. Para su diagnóstico se requiere de técnicas de biología molecular sensibles y específicas (Ríos-Ocampo, Restrepo, Cortés, Correa, & Navas, 2013).

En el presente trabajo se analizaron 165 muestras de donantes de sangre con serología reactiva para HBsAg y/o anti – core, para la detección de hepatitis B oculta mediante la técnica de PCR; el 32,38% del total de donantes con serología reactiva dieron positivo para la detección de ADN – VHB mediante la técnica molecular PCR anidada. La PCR anidada conocida como Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección (Analytical-Biotech, 2015). En el estudio de Tahaa, *et al.* (2013), afirma que la técnica de biología molecular PCR anidada es altamente sensible y específico y de gran ayuda diagnóstica para identificar población con OBI (Shereen E. Tahaa, 2013).

La determinación del ADN del VHB en el suero mediante técnicas de hibridación molecular o PCR constituye el marcador de elección para detectar la viremia. Refleja la replicación del virus en los hepatocitos y se suele correlacionar con el HBcAg intrahepático, con la ventaja de que su determinación no precisa biopsia (Aguado, 2009). Por estos motivos, esta técnica ayuda a valorar la idoneidad del inicio del tratamiento antiviral en los pacientes con hepatitis B crónica (Shereen E. Tahaa, 2013). La recuperación de un cuadro de hepatitis B aguda se suele acompañar de la desaparición en el suero del ADN del VHB. Lo mismo sucede en pacientes con hepatitis B crónica, en los que la desaparición del HBeAg de forma espontánea, o inducida por el tratamiento antiviral, se sigue generalmente de la desaparición del ADN viral en el suero (Aguado, 2009). En el estudio realizado por Ruiz-Aragón, *et al.*(España), especifican que los datos obtenidos para los tamizajes de hepatitis B mediante la técnica de biología molecular

PCR, ofrecen resultados alentadores, ya que se identifican como positivas muchas muestras, que de otro modo se hubieran pasado por alto. (Jesús Ruiz-Aragón, 2010).

El HBsAg es el primer marcador serológico que aparece en la infección activa por el VHB; la frecuencia de donantes de sangre con serología reactiva para el HBsAg en el estudio fue del 20,29% del total de muestras; el estudio realizado sobre “Hepatitis B en donantes de sangre de un hospital en Apurímac, Perú”, se hallaron 66 casos positivos al HBsAg lo que determinó una frecuencia de 1,92% del total de donantes (Max Carlos Ramírez-Soto, 2012). En Sudamérica se reportan bajas prevalencias por infección de VHB comparadas con el Caribe y Norteamérica, Ecuador es considerado como un país de baja endemicidad del VHB, esto puede deberse a la falta de estudios epidemiológicos que confirmen lo contrario (Delfino, 2013).

Los estudios serológicos demostraron además que el 44,44% de muestras eran anti – core positivo, los anticuerpos dirigidos frente a este antígeno core son los primeros en aparecer tras la infección por el VHB y pueden persistir durante todo su curso evolutivo, la frecuencia de este marcador serológico en el estudio realizado por Ramírez-Soto, *et al.* (Perú) fue del 35%. Un estudio realizado en Colombia menciona que al analizar las 129 muestras se halló que el 50,3 % donantes solamente presentaron reactividad para el anti-HBc; en algunos pacientes existe un período de ventana de varias semanas o, inclusive, meses de duración, en el cual no puede detectarse ni HBsAg ni anti-HBs. Los anti-HBc totales pueden estar presentes en bajas concentraciones cuando la persona se encuentra en fase de recuperación (Mauricio Beltrán, 2011). La ausencia de anticuerpos frente al antígeno core puede estar dada por la etapa que esté cursando el individuo infectado con VHB.

En el presente estudio se encontró que el 100% de donantes con serología reactiva para el marcador HBsAg y el 25,84% de las muestras anti – core positivo fueron ADN – VHB positivo. Según el estudio analizado en Colombia la explicación de la infección oculta por VHB sin expresar serológicamente el HBsAg puede deberse a dos mecanismos: uno es que ciertos reordenamientos del genoma del virus dan lugar a cambios en las proteínas “S” que las hace indetectables con las técnicas comerciales, y la segunda posibilidad, mucho más frecuente, es que sin existir cambios en el genoma hay una supresión de la replicación y de la expresión de éste que determina la ausencia de marcadores serológicos. El estudio realizado corrobora afirmando la explicación de la infección oculta por VHB, analizando 162 donantes, identificándose un 80% (132) de muestras con ADN-VHB únicamente con serología reactiva del marcado anti-core, sin ser detectado HBsAg

por presencia de una mutación en los ORF "S", llevando a una modificación antigénica con una alteración en el nivel de síntesis de las proteínas del VHB (Serra, Servicio de Hepatología, 2013).

La diferencia en los hallazgos de unidades de sangre HBsAg no reactivas y anti-HBc reactivas, que son reactivas para ADN viral, puede basarse en varios factores como el grado de endemia de la zona geográfica para la infección con el VHB. En India, considerado un país endémico para la infección por el virus de la hepatitis B, en un estudio llevado a cabo en 2007, durante un periodo de dos años, con un tamaño de 1027 muestras y reacción de 18,3 % a anti-HBc, se hallaron 21,3% muestras positivas para ADN (en muestras HBsAg no reactivas y anti-HBc reactivas) (Bhattacharya P, 2007).

Por otro lado, en Canadá, considerado como un país poco endémico para el virus de la hepatitis B, en 2007 se hizo un estudio durante 18 meses en donantes de sangre con doble reacción para anti-HBc (1,13 %), y se hallaron 0,52 % positivos para ADN del virus de la hepatitis B y el resto resultaron negativos, en muestras que eran no reactivas para HBsAg (O'Brien SF, 2007).

Aquellas muestras que presentaron serología positiva para los dos marcadores y ADN – VHB positivo en la prueba de PCR representan el 10,23% del total de muestras estudiadas, lo que indica en el donante la presencia y replicación activa del virus y al mismo tiempo la respuesta inmunitaria frente a este por parte del organismo del sujeto.

El 34,26% de donantes resultaron ser negativos en la prueba molecular de detección de ADN – VHB. Estos pacientes pueden aparecer como anti – HBc positivo y sin actividad DNA polimerasa, no se detecta ADN viral libre y sin HBsAg reactivo (Serra, Virus de la hepatitis B, 2012).

La asociación y correlación entre variables confirman lo descrito por Chevaliez S, 2009, el coeficiente de correlación entre HBsAg y anti – Core es débil bidireccionalmente con un valor de -0,611, esto se puede explicar ya que existe un período de ventana en el cual empieza a negativizarse el HBsAg e inicia la seroconversión por lo que solo uno de los dos marcadores serológicos es detectado mediante pruebas serológicas; además, puede ser el caso de un portador HBsAg sano, hepatitis crónica mínimamente replicativa, hepatitis aguda HBsAg negativa o hepatitis con período de incubación tardío (Chevaliez, 2009). El estudio realizado por Wang Yu, *et al.* (2013) indica que la correlación entre HBsAg y anti – core es débil con un valor <0,01 (Wang Yu, 2013), confirmando así que no existe una codependencia entre los marcadores serológicos antes mencionados.

La correlación entre anti – Core y ADN-VHB reveló una correlación débil bidireccional con un valor de 0,045, lo que manifestó que no necesariamente las personas que presentan anti – Core positivo van a tener el ADN –VHB; esta situación puede presentarse por la eliminación o resolución de la infección (Chevaliez, 2009).

El coeficiente de correlación de Spearman entre las variables HBsAg y ADN – VHB probó que la correlación bilateral es fuerte con un resultado de 1,000, el estudio realizado por Cai Jin, *et al.* (2012) evidencia una correlación y dependencia fuerte entre el HBsAg y el ADN VHB (Cai Jin, 2012), lo que indica que todos aquellos donantes con HBsAg reactivo, resultaron ADN – VHB positivo.

La estrategia de seguridad transfusional, basada en la adecuada selección de donantes de sangre voluntarios, influye en la reducción de positividad para diferentes marcadores infecciosos como se ha demostrado en estudios: en Albania, sitio de alta prevalencia para VHB, una investigación muestra la diferencia en la prevalencia de HBsAg (Durro V, 2011).

### 4.3 CONCLUSIONES

Existe un interés creciente en OBI debido a la creciente evidencia de su importancia clínica. La detección del ADN del VHB mediante PCR indica infección activa; con ella se pudo evidenciar que el 32,38% de los donantes con serología reactiva fueron positivos para la detección del ADN – VHB. La técnica de PCR es el método de análisis más sensible y específico para el diagnóstico temprano de la infección por el VHB, y puede detectarse cuando todos los demás marcadores son negativos o confirmar un resultado serológico reactivo. La importancia a largo plazo de esta disertación, es demostrar que las pruebas moleculares son necesarias para reducir los incidentes transfusionales en las unidades de banco de sangre del país.

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) es el indicador más temprano de infección activa por el VHB; en el estudio 42 donantes resultaron positivos para este marcador serológico.

Los anticuerpos frente a antígenos del core son los primeros que aparecen después de la infección por el VHB. Por lo general, los anticuerpos totales e IgM aparecen 4 – 10 semanas después de la aparición de HBsAg. Los anticuerpos anti – HBc total pueden detectarse durante años o durante toda la vida. Se demostró que 132 donantes resultaron ser anti – HBc positivo; los IgM son los primeros anticuerpos específicos que aparecen en respuesta a la infección por el VHB. Se encuentran en títulos elevados durante un período breve en la fase aguda de la enfermedad, y son el único marcador de infección por VHB durante la ventana entre la detección del HBsAg y la del anti – HBs. Los IgM anti – HBc disminuye hasta concentraciones bajas durante la recuperación; la detección de estos anticuerpos es la única prueba específica de infección reciente, puede utilizarse para diferenciar la infección aguda de la crónica. Sin embargo, como algunos pacientes con infección crónica por VHB se vuelven positivos para IgM anti – HBc durante los brotes, no es un marcador absolutamente fiable para la enfermedad aguda. Antes de la desaparición de la IgM anti – HBc, aparecen la IgG anti –HBc, que dura indefinidamente.

El fenómeno de la infección oculta por el VHB se caracteriza por una marcada inhibición de la replicación viral y de la expresión de genes del VHB. Para su diagnóstico se requiere de técnicas de biología molecular sensible y específica.

La hepatitis B oculta la carga viral es muy baja, razón por la cual la sensibilidad de las pruebas de detección es crítica. Estas situaciones podrían explicar porque, las muestras que sugieren perfil serológico de infección aguda y una probable hepatitis B crónica (portador persistente), no fueron positivas en las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos.

En algunos casos no es posible detectar los anticuerpos mediante las pruebas serológicas del marcador anti-core, ya que el donante se encuentra en la etapa de infección del virus, en el presente estudio se encontró 42 (20.29%) muestras positivas para ADN-VHB, confirmando la presencia del virus.

Para el marcador anti-core se detectó 132 (23.84%) muestras positivas para ADN.VHB. En este total de muestras no se detecta el antígeno de superficie (HbsAg) mediante pruebas serológicas, situación que pudo haberse dado por la presencia de una mutación en los ORF y /o llevando a una modificación antigénica con una alteración en el nivel de síntesis de las proteínas del VHB.

Se obtuvo 9 muestras (10.23%) con los dos marcadores serológicos reactivos, anti-core y antígeno de superficie positivas para ADN-VHB. Indicando la confirmación, que el donante tiene el virus de Hepatitis B (HbsAg) y se encuentra en la fase replicativa del virus.

En el estudio se determinó que no existe relación entre el HBsAg y anti- HBc, lo que indica que no hay dependencia entre ellas, no todos los donantes con HBsAg reactivo van a presentar anti - HBc positivo, por el contrario, se identificó que el HBsAg y el ADN - VHB están asociadas esto quiere decir que la una depende de la otra y que su correlación es muy fuerte, todos aquellos donantes con HBsAg reactivo serán ADN - VHB presente; a pesar de que la relación entre anti - HBc y ADN -VHB demostró dependencia, su correlación no es tan fuerte como en el caso anterior, es decir, no todos los donantes anti - HBc positivos presentaron ADN - VHB.

La importancia clínica de esta infección oculta, desde el punto de vista práctico, es la contraindicación de transfusión de sangre o donación de órganos de un enfermo con hepatitis B a un receptor que no posee marcadores de VHB, ya que el riesgo de infección en el receptor es de casi el 100% (Raimondo G, 2008).

## 4.4 RECOMENDACIONES

El fenómeno de la infección oculta por el VHB se caracteriza por una marcada inhibición de la replicación viral y de la expresión de genes del VHB. El análisis de muestras de suero se debe realizar con un enfoque altamente sensible y específico basado en PCR anidada, ya que, realizar la identificación del virus oculto de hepatitis B ayudaría a prevenir enfermedades hepáticas agudas y crónicas, disminuyendo así la incidencia de contagios por VHB.

La técnica ELISA para detección de HBsAg tiene una sensibilidad y especificidad cuestionable, es por ello que se recomienda confirmarlas con técnicas suplementarias. Estas últimas se basan en la neutralización del HBsAg, presente en la muestra del paciente, a través de su anticuerpo específico, las que son corridas en una prueba ELISA en paralelo, semejante al tamizaje, y en donde se mide posteriormente la absorbancia de la muestra no neutralizada y la neutralizada.

Al igual que las pruebas de ELISA, las técnicas de CLIA para detección de anti – HBc los resultados pueden ser un tanto dudosos, por tal razón se recomienda realizar pruebas más avanzadas que confirmen los resultados obtenidos por los dos métodos serológicos antes mencionados.

La infección por el VHB, representa un problema sanitario importante, por lo que las unidades de banco de sangre deben implementar nuevas metodologías diagnósticas como la detección del HBeAg o pruebas moleculares (PCR) para la detección de VHB.

El antígeno e del VHB (HBeAg) es importante ya que indica una replicación viral activa, por lo que se deben implementar pruebas de identificación en los laboratorios de inmunohematología.

La identificación de marcadores serológicos junto con la confirmación con pruebas moleculares del ADN – VHB abren nuevas perspectivas para la identificación del VHB en donantes de sangre.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Arora, S., Doda, V., & Kirtania, T. (2014). Sensitivity of individual donor nucleic acid testing (NAT) for the detection. *SIMTI Servizi Srl*, 1-5.
- García, Z., & Torres, L. (2013). Serological Diagnosis of the Hepatitis B Virus. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 4-10 Print version ISSN 0253-2948.
- Ramírez, M., & Huichi, M. (2012). Hepatitis B en donantes de sangre de un hospít. *Scielo*.
- Rodríguez, F., Jardí, R., & Frias. (2012). Virología molecular del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clínica*, 2-9.
- Sagnell, E., Pisaturo, M., Martini, S., Filippini, P., & Sagnelli, C. (2014). Clinical impact of occult hepatitis B virus infection in immunosuppressed patients. *World J Hepatol*, 384-393.
- Inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección cualitativa del Antígeno de Superficie del Virus de la HB. (2014). *ACON Laboratories, Inc.*, 1-3 I231-1021.
- Overview of ELISA. (2015). Obtenido de <https://www.lifetechnologies.com/ec/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#/legacy=www.piercenet.com>
- Aguado, D. S. (2009). Interpretación de la serología en las hepatitis virales. España: JANO.
- Alcaraz , M. (2013). *VIRUS DE LA HEPATITIS B: ESTRUCTURA GENÓMICA Y MARCADORES CLÍNICOS*. Obtenido de <http://www.seimc.org/control/revisiones/serologia/Rvirhbs.pdf>
- Alencar, R. S. (2008). Ocorrência da infecção oculta pelo vírus da hepatite B (VHB) em pacientes com cirrose hepática pelo vírus da hepatite C (VHC) com ou sem carcinoma hepatocelular (CHC). Sao Paulo, Brazil.
- Alizadeh, Z., Milani, S., & Sharifi, Z. (2014). Occult Hepatitis B Virus Infection among Iranian Blood Donors: A preliminary study. *Archives of Iranian Medicina*, Vol 17: 2 (106-107).
- Analytical-Biotech. (2015). PCR anidada. Biología Molecular al Servicio de la Sociedad.
- Arroyo, J., Estrada, J., & Medina, J. (2012). Virus de la hepatitis B en donadores de sangre mexicanos. *Rev. Mexicana del Hospital General de Mexico*, 83-87.
- Axygen-Biosciences. (Agosto de 2009). *AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit*. Obtenido de [http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/protocol\\_AxyPrep\\_BodyFluid\\_Viral\\_DNA\\_RNA.pdf](http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/protocol_AxyPrep_BodyFluid_Viral_DNA_RNA.pdf)
- Aznar, J. (2009). Directrices para el envío de especímenes a los laboratorios clínicos para el diagnóstico biológico. Sevilla, España: Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud. Junta de Andalucía .

- Benaderette , D. (2010). Obtenido de HEPATITIS B:  
<http://www.codeinep.org/control/HEPATITIS%20B.htm>
- Berger, S. (2014). Infectious Diseases of Ecuador. *Gideon*, ISBN 978-1-4988-0067-9.  
 Disponible: <http://www.glideonline.com/ebooks/>.
- Bhattacharya P, C. P. (2007). Significant increase in HBV, HCV, HIV and syphilis infections among blood donors in West Bengal, Eastern India 2004-2005: Exploratory screening reveals high frequency of occult HBV infection. . India: World J Gastroenterol.
- Brechot C, T. V. (2001). Persistent Hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"?. *Hepatology*.
- Cai Jin, L. A. (2012). Papel Medicina - la correlación entre el suero HBV-DNA y VHB marcadores inmunológicos . Hong kong.
- Chevaliez, S. (2009). Clinical Practice Guidelines Program. España: Fistera.
- COBAS, C. C. (2011). Elecsys® Hepatitis testing Powerful tools for patient oriented decision making.
- Collin, P. (2014). Dictionary of Medicine. New York: Routhledge.
- Delfino, C. M. (2013). Virus de hepatitis B (HBV) y virus de hepatitis D (HDV) en Argentina: epidemiología molecular y variabilidad viral. Buenos Aires, Argentina: Biblioteca digital FCEN-UBA.
- DiaSorin. (Abril de 2009). Murex HBsAg Version 3. The Diagnostic Specialist.
- DiaSorin-S.p.A. (2014). LIAISON Anti-HBc. REF 310130.
- DiaSorin-S.p.A. (2014). LIAISON XL MUREX HBsAg Quant. REF 310250.
- Dinamarca, A. (3 de Abril de 2007). Microbiologia - Virologia. Chile: Universidad de Valparaíso, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica.
- Durro V, Q. S. (2011). Trends in prevalence of hepatitis B virus infection among Albanian blood donors. Albania: *Virology J*.
- Dwyre DM, F. L. (2011). Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st Century.
- García, C. G. (2000). Infección oculta por el virus de la hepatitis B (VHB). Brasil: Acta cient. Soc. Venez. Bioanalistas Esp.
- Haimanti Bhattacharya, \*. D. (Mayo de 2015). Status of hepatitis B infection - a decade after hepatitis B vaccination of susceptible Nicobarese, an indigenous tribe of Andaman & Nicobar (A&N) islands with high hepatitis B endemicity. *Indian Journal of Medicine Research* doi: 10.4103/0971-5916.159573.
- Hong Kim, S.-A. L.-S.-J. (14 de Febrero de 2015). Occult infection related hepatitis B surface antigen variants showing lowered secretion capacity. *World Journal Gastroenterology* doi: 10.3748/wjg.v21.i6.1794.
- INEC. (2013). *INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS*. Obtenido de <http://www.inec.gob.ec/home/>

- Instituto de Salud Pública, M. d.-G. (2015). Virus Hepatitis B (Antígeno de superficie HBsAg). Chile.
- Instituto-Gerontológico. (2015). *Infección oculta por el virus B de la hepatitis*. Obtenido de <http://www.igerontologico.com/salud/hepatologia-salud/infeccion-oculta-virus-b-hepatitis-6550.htm>
- J. Heathcote, Z. A.-N.-T. (Septiembre de 2008). Hepatitis B. *Guías Prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología*. WGO-World Gastroenterology Organisation.
- Jaramillo, E. A. (2008). Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para detección del virus de Hepatitis B. Sangolqui, Ecuador: ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.
- Jawetz, M. Y. (2010). MICROBIOLOGÍA MÉDICA. México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V. ISBN: 978-607-15-0503-3.
- Jerzy Jaroszewicz, B. C.-T. (Abril de 2010). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: A European perspective. *Journal of Hepatology* doi:10.1016/j.jhep.2010.01.014.
- Jesús Ruiz-Aragón, S. M.-P. (2010). Evaluación de las técnicas de amplificación genómica (NAT) para el tamizaje de hepatitis B en donantes de sangre. Revisión sistemática. Sevilla, España: SCIELO ISSN 0535-5133.
- Joaquín Balanzó Tintoré, J. E. (2007). *Hepatitis B*. Barcelona: Marge Medica Books.
- Kenneth Ryan, G. R. (2010). *Sherris Microbiología Médica*. México: Mc Graw Hill ISBN 978-0-07-160402-4.
- Kim, M.-S. K. (27 de Diciembre de 2014). Occult hepatitis B virus infection. *World Journal Hepatology* doi: 10.4254/wjh.v6.i12.860.
- Krajden, M., McNabb, G., & Petric, M. (2012). The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, p 65-72.
- Mason, S. C. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*.
- Mauricio Beltrán, M. B.-P.-B. (2011). Detección de hepatitis B oculta en donantes de bancos sangre, Colombia 2008 - 2009. Bogotá, Colombia: Biomédica.
- Max Carlos Ramírez-Soto, M. H.-A. (2012). HEPATITIS B EN DONANTES DE SANGRE DE UN HOSPITAL EN APURÍMAC, PERÚ. Peru: Rev Peru Med Exp Salud Publica.
- Mayo-Clinic. (19 de Febrero de 2015). Test ID: HBVQU. *Hepatitis B Virus (HBV) DNA Detection and Quantification by Real-Time PCR, Serum*.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2008). Manual técnico-administrativo para la implementación de servicios de medicina transfusional. *Manual*.
- Mohiadeen Kurdi, M. A. (Junio de 2014). Molecular detection of hepatitis B virus (HBV) among voluntary ELISA positive blood donors in Almadinah Almunawwarah. *Journal of Taibah University Medical Sciences* doi:10.1016/j.jtumed.2014.01.002.

- Moonnoon. (2015). *Diagrama de estructura de partículas de virus de la hepatitis B*. Obtenido de <http://sp.depositphotos.com/39584263/stock-illustration-diagram-of-hepatitis-b-virus.html>
- Murray, & Rosenthalr. (2013). *Microbiología Médica*. España: S.A. ELSEVIER ESPAÑA ISBN: 9788490224113.
- Muselman, W., Wafa, H., & Fawza, M. (2014). Prevalence of "anti-HBc alone" among Syrian blood donors. *J Infect Dev Ctries* , 8(8):1013-1015.
- Negróni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica - Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- O'Brien SF, F. M. (2007). Hepatitis B virus DNA-positive, hepatitis B surface antigen-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: The Canadian Blood Services experience. *Canada: Transfusion* .
- Raimond G. Pollicino T, S. G. (2005). What is the clinical impact of occult hepatitis B virus infection? *The lancet* .
- Raimondo G, A. J. (2008). Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *Hepatol Journal* .
- Rasino, S. (2015). Virus de la hepatitis B (VHB). *Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas* .
- Ray, M. (2012). *Hepatitis B Virus Antigens in Tissues*. Springer Science & Business Media Doi 10.1007/978-94-011-6235-7.
- Resino, S. (2014). Virus de la hepatitis B (VHB). *Enfermedades Infecciosas* .
- Ríos-Ocampo, Restrepo, J., Cortés, F., Correa, G., & Navas, M. (2013). Occult hepatitis B virus infection. *Acta Med Colomb Vol.*, 143-153.
- Rios-Ocampo, W., Cortes-Mancer, F., Camilo Olarte, C., Soto, A., & Navas, M. (2014). Occult Hepatitis B virus infection Among blood donors in Colombia. *Virology Journal*, 11:206.
- Sagnelli, E., Pisaturo, M., Martini, S., Filippini, P., Sagnelli, C., & Coppola, N. (2014). Clinical impact of occult hepatitis B virus infection in immunosuppressed patients. *World J Hepatol*, 27; 6(6): 384-393 ISSN 1948-5182.
- Schaefer, S. (2005). Hepatitis B virus: G significance of genotypes. *Journal of Viral hepatitis*.
- Serra, M. (2012). Virus de la hepatitis B. Valencia - España, España: Control de calidad SEIMC.
- Serra, M. (2013). *Servicio de Hepatología*. Obtenido de [http://www.seimc.org/control/revi\\_viro/VHBrev.htm](http://www.seimc.org/control/revi_viro/VHBrev.htm).
- Shereen E. Tahaa, S. A.-H. (2013). Detection of occult HBV infection by nested PCR assay among chronic hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. Cairo, Egypt: *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* doi:10.1016/j.ejmhg.2013.06.001.

- Shipeng Sun, S. M. (14 de Mayo de 2011). Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection. *Virology Journal* 2011, 8:227 doi:10.1186/1743-422X-8-227.
- Stirling, B. &. (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. . *Methods Mol Biol*.
- Takara-ClonTech. (s.f.). *Human Beta-globin Control Primer Set*. Obtenido de [http://www.clontech.com/takara/US/Products/PCR\\_Products/Pathogen\\_Detection\\_and\\_Screening\\_Kits/Human\\_Pathogen\\_Detection/Human\\_Beta-globin\\_Control\\_Primer\\_Set](http://www.clontech.com/takara/US/Products/PCR_Products/Pathogen_Detection_and_Screening_Kits/Human_Pathogen_Detection/Human_Beta-globin_Control_Primer_Set)
- Wael, M., Wafa, H., & Fawza, M. (2014). Prevalence of "anti-HBc alone" among Syrian blood donors. *J Infect Dev Ctries*, 8(8):1013-1015.
- Wang Yu, W. Z. (2013). Papel de la medicina Relación entre HBV y DNA viral . Nueva Inglaterra: *Journal of Medicine*.
- Wilson Alfredo Ríos-Ocampo, J. R. (2013). Infección oculta por el virus de la hepatitis B: Aspectos clínicos, epidemiológicos y moleculares. *Acta médica Colombiana*.

## 6. ANEXOS

### ANEXO 1: Datos de donantes del Hospital “Carlos Andrade Marín”

#### SECRETARIA NACIONAL DE BANCOS DE SANGRE

#### Banco de Sangre

Ciudad

Provincia

Estimado donante le agradecemos por su gesto solidario al acercarse a dar su sangre de manera altruista voluntaria para ayudar a salvar hasta 4 vidas por cada donación. De la información que usted honestamente nos brinde depende la seguridad de la sangre que nosotros entreguemos a quien lo necesita. Es por esto que a su sangre se le realizaran algunas pruebas de laboratorio para investigar la presencia de posibles enfermedades o infecciones transmisibles por la sangre. Le recordamos que nuestro compromiso es mantener absoluta reserva y confidencialidad de la información que obtengamos del cuestionario, chequeo médico, interrogatorio y pruebas de laboratorio.

Si usted cree que su sangre no debe ser usada, por favor comuníquese a quien lo examine para mayor información o tome usted la decisión de no donar.

También debe saber que es posible que alguna parte de su sangre no sea usada y que podría desecharse. Si usted ha decidido ser donante, tenga la seguridad que su sangre está bien utilizada.

**BIENVENIDO AL GRUPO DE DONANTES VOLUNTARIOS ALTRUISTAS Y REPETITIVOS QUE SALVAN VIDAS**

#### DATOS PERSONALES

Apellidos:

Nombres:

Estado civil:

Lugar y fecha de nacimiento:

CI o pasaporte:

Lugar y dirección de domicilio:

Ocupación:

Lugar y dirección de su trabajo:

Edad:

Teléfono / celular:

E-mail:

Sexo:

#### CUESTIONARIO

Marque con **X** su respuesta

	SI	NO
1. Indique la fecha de su última donación		
2. Esta usted dispuesto a donar sangre?		
3. Ha sido impedido de donar sangre alguna vez?		
4. Ha sufrido algún pinchazo o corte con objetos cortopunzantes en los últimos 12 meses?		
5. Ha tenido hepatitis, se han puesto sus ojos o piel amarillos (ictericia) o ha estado usted en contacto con pacientes con hepatitis?		
6. Ha recibido sangre o componentes, o transplante de órganos en los últimos 12 meses?		
7. Se ha hecho tatuajes, orificios o acupuntura, maquillaje permanente o piercing en alguna parte del cuerpo en los últimos 12 meses?		

8. Ha tenido dengue, paludismo, chagas en los últimos 12 meses?			
9. Ha estado en tratamiento dental en los últimos 3 días?			
10. Ha recibido alguna medicación en el último mes?			
11. Ha tomado aspirina, analgésicos y/o antiinflamatorios en los últimos 3 días?			
12. Sufre de ataques epilépticos, mareos o pérdida de conocimiento?			
13. Presenta al momento alguna alergia?			
14. Sufre de los pulmones, riñones, hígado, sangre, corazón u otros?			
15. Sufre de diabetes, tuberculosis u otras enfermedades crónicas?			
16. Le han operado o realizado algún tipo de intervención o procedimiento médico en los últimos 12 meses?			
17. Habitualmente ingiere alcohol, tabaco, medicamentos o drogas?			
18. Ha observado la presencia de nódulos, tumores o pecas en alguna parte de su cuerpo?			
19. Ha sido vacunado en los últimos 12 meses?			
20. Tiene usted vida sexual activa?			
21. Ha estado detenido en alguna cárcel?			
22. Ha estado fuera del país en los últimos 12 meses?			
23. Tuvo o fue tratado de sífilis o gonorrea en los últimos 12 meses?			
24. En los últimos 12 meses le pagó a alguien para tener relaciones sexuales?			
25. En los últimos 12 meses tuvo relaciones sexuales con alguien que usaba drogas?			
26. Alguna vez recibió dinero o drogas para tener relaciones sexuales?			
27. En los últimos 12 meses tuvo usted o su pareja relaciones sexuales con otras personas?			
28. Recibió usted dinero o alguna compensación para donar sangre?			
29. Ha recibido hormona del crecimiento o tuvo usted o algún pariente enfermedad de creutzfeldt-jakob (enfermedad de las vacas locas)?			
30. Dona usted sangre solamente para que le haga el análisis de VIH o SIDA?			
31. Leyó y comprendió este cuestionario y fueron contestadas todas las dudas al respecto?			
<b>EXCLUSIVAMENTE PARA MUJERES</b>			
32. Está usted embarazada o da de lactar?			
33. Fecha de su última menstruación	Día	Mes	Año
34. Tuvo un parto, aborto o cesárea en los últimos 12 meses?			

Yo, \_\_\_\_\_ declaro que la información confidencial que he proporcionado es verdadera y en caso contrario asumo toda responsabilidad. Además, autorizo a que se realicen los exámenes necesarios, incluyendo VIH para el uso de mi sangre y estoy informado acerca de las reacciones indeseables que puedan presentarse con la donación de sangre. Para constancia de lo antes dicho, firmo.

\_\_\_\_\_ Número de CI \_\_\_\_\_  
 Firma del donante o huella digital

MUCHAS GRACIAS, SU SANGRE NOS AYUDARÁ A SALVAR VIDAS.

POSDONACION o AUTOEXCLUSIÓN

LUEGO DE A INFORMACIÓN RECIBIDA, CONSIDERA USTED QUE SU SANGRE ES BUENA PARA ADMINISTRARSE A OTRA PERSONA? SI o NO.

**ANEXO 2: Solicitud de autorización del Hospital "Carlos Andrade Marín"**

Lic. Martha Gabela

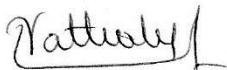
Unidad de Banco de Sangre

De mis consideraciones:

Yo, Nathaly Anabel Rivera Rueda, con C.I. 172080243-6, estudiante de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Bioanálisis, solicito a usted muy comedidamente se autorice el desarrollo investigativo cuyo tema es: "Identificación de hepatitis B oculta (OBI) en donantes voluntarios de sangre con serología reactiva, mediante la técnica molecular de PCR, en la unidad de Banco de Sangre del Hospital "Carlos Andrade Marín" en el período 2015"

Por la atención que se digne a dar a la presente, anticipo mis más sinceros agradecimientos.

Atentamente:



Nathaly Rivera Rueda  
[rivera.nriverar.nathy@gmail.com](mailto:rivera.nriverar.nathy@gmail.com)  
0996720000

Recibido 18/08/2015  
Martha Gabela

**ANEXO 3:** Solicitud de autorización de recolección de muestras Banco de Sangre HCAM.

Quito, 04 de Marzo de 2 015

Lic. Martha Gabela

Unidad de Banco de Sangre

Presente.-

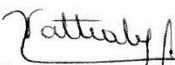
Nathaly Rivera Rueda y Yadira Mosquera Rivera estudiantes de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, solicitamos a usted muy comedidamente nos autorice la utilización de muestras reactivas para HBV (HBsAg y/o anti-core) para la investigación de *"Identificación de hepatitis B oculta (OBI) en donantes voluntarios de sangre con serología reactiva, mediante la técnica molecular de PCR"*.

Por la atención que se digne dar a la presente le reiteramos nuestro agradecimiento y consideración.

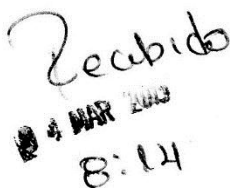
Atentamente.

Yadira Mosquera  
Yadira Mosquera Rivera

CI.: 1721498044

  
Nathaly Rivera Rueda

CI.: 1720802436

  
Recibido  
04 MAR 2015  
8:14



INSTITUTO ECUATORIANO DE SEGURIDAD SOCIAL  
HOSPITAL "CARLOS ANDRADE MARIN"

Quito D. M., 19 de agosto de 2015

Señores:  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**  
**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
Presente.-

De mi consideración:

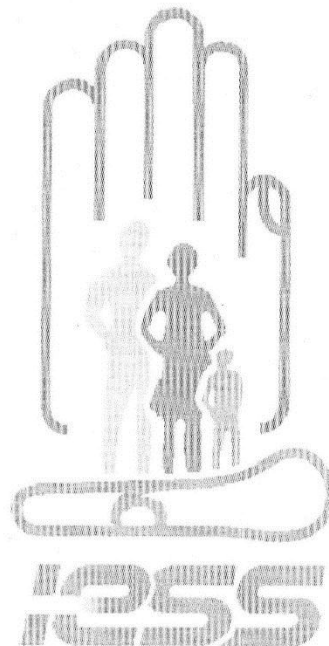
Mediante la presente me permito hacer llegar la aceptación por parte de la Unidad de Banco de sangre, quien colaborará con el desarrollo investigativo de la Srta. Nathaly Rivera Rueda cuyo tema es: "Identificación de hepatitis B oculta (OBI) en donantes voluntarios de sangre con serología reactiva, mediante la técnica molecular de PCR", previa la autorización de la Institución, trámite que está en proceso.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

  
 **Lcda. Martha Gabela B.**  
JEFE UNIDAD DE BANCO  
DE SANGRE (E)  
HCAM

Lcda. Martha Gabela B.  
**JEFE DE LA UNIDAD DE BANCO DE SANGRE**  
**HOSPITAL CARLOS ANDRADE MARÍN**



Av. 18 de Septiembre S/N y Ayacucho Teléf. 2944200/300  
Quito – Ecuador

**Renovar para actuar,  
actuar para servir**

#### **ANEXO 4:** Recolección de muestras de donantes.

Protocolo: Recolección de muestras (manejo, transporte y almacenaje)

##### **MANEJO**

Revisar registros, se incluyen todas las muestras reactivas para los marcadores serológicos HbsAg y/o anti-core

Recolectar 3ml de cada muestra reactiva en los crio-viales y rotular con la codificación asignada.

Para la recolección de las muestras tomar en cuentas las siguientes medidas de bioseguridad:

- Vacunación contra la Hepatitis B.
- Uso de barreras: comprende todos aquellos implementos que evitan la exposición directa con las muestras potencialmente contaminantes, mediante la utilización de materiales adecuados como uniforme, mandil, guantes, gorro, mascarilla y gafas (Aznar, 2009).

##### **TRANSPORTE**

Transportar las muestras al laboratorio siguiendo la cadena de frío. La cadena de frío de la sangre es un proceso sistemático utilizado para la conservación y el transporte seguro de la muestra biológica, con el fin de reducir la contaminación bacteriana y prolongar su vida útil (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2008). El suero se debe transportar a temperatura de congelación, es decir, por debajo de los  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para obtener estas temperaturas son necesarios aparatos congeladores como recipientes de poliestireno y utilizar hielo seco; evitar siempre la descongelación del hielo ya que puede contaminar y diluir las muestras si estas no están bien selladas (Aznar, 2009)

##### **ALMACENAJE**

Conservar las muestras a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su uso descongelar a temperatura ambiente (Aznar, 2009).



**Fuente:** Base de datos fotográficos de las autoras.

**ANEXO 5:** Realización de la prueba de EIA.

Protocolo: Enzyme immunoassay for the detection of hepatitis B surface antigen in human serum or plasma.

**SEMI AUTOMATED PROCESSING**

<b>Step 1</b>	Prepare <b>Substrate Solution</b> and <b>Wash Fluid</b> .	
<b>Step 2</b>	Use only the number of wells required for the test.	
<b>Step 3</b>	Add 25 µl of <b>Sample Diluent</b> to each well.	<b>25 µl</b>
<b>Step 4</b>	Add 75 µl of <b>Samples</b> or <b>Controls</b> to the wells. To each plate add 75 µl of the <b>Negative Control</b> to wells A1 and B1 and 75 µl of <b>Positive Control</b> to well C1.  Add the <b>Controls</b> to the designated wells after dispensing the samples.	<b>75 µl</b>
<b>Step 5</b>	Cover the plate with a lid and incubate for 60 minutes at 37°C ± 1°C.	<b>60 mins</b>
<b>Step 6</b>	Add 50 µl of <b>Conjugate</b> to each well.	<b>50 µl</b>
<b>Step 7</b>	Shake the plate using a plate shaker for 10 seconds or manually agitate by gently tapping the sides for 10 seconds.	<b>10 secs</b>
<b>Step 8</b>	Cover the plate with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ± 1°C.	<b>30 mins</b>
<b>Step 9</b>	At the end of the incubation time wash the plate 5 times as described under <b>Wash Procedures</b> .  After washing is completed invert the plate and tap out any residual <b>Wash Fluid</b> onto absorbent paper.	<b>5 washes</b>
<b>Step 10</b>	Immediately after washing the plate, add 100µl <b>Substrate Solution</b> to each well.	<b>100 µl</b>
<b>Step 11</b>	Cover the plate with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ± 1°C while colour develops. A purple colour should develop in wells containing reactive samples.	<b>30 mins</b>
<b>Step 12</b>	Add 50 µl <b>Stop Solution</b> to each well.	<b>50 µl</b>
<b>Step 13</b>	Within 15 minutes read the absorbance of each well at 450 nm using 620 to 690 nm as the reference wavelength if available.  Blank the instrument on air (no plate in carriage).	<b>A<sub>450nm</sub></b>

(DiaSorin, 2009)



**Fuente:** Base de datos fotográficas de las autoras.

## **ANEXO 6:** Realización la prueba de CLIA.

Protocolo: Enzyme immunoassay for the detection of antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) in human serum or plasma.

### **PROCEDURE**

#### **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

1. **Stop Solution (0.5M to 2M Sulphuric Acid).** Add 3 to 11 ml of analytical grade concentrated sulphuric acid (18.0M) to about 80 ml of distilled or deionized water and then make up to 100 ml with more water. Alternatively, the following reagent can be used: 1N Sulphuric Acid (Code N0164).
2. **Freshly distilled or high quality deionized water** is required for dilution of Wash Fluid, for preparation of the Stop Solution and for use in conjunction with automated washers.
3. **Micropipettes and Multichannel micropipettes** of appropriate volume.
4. **Incubator** capable of maintaining the temperature limits defined in the assay protocol.
5. **Moulded Heating Block.** (Code 5F09-02) For use in laboratory incubators. The moulded heating block should ideally be kept in the incubator used. If this is not possible it must be placed in the incubator at least four hours before beginning the assay.
6. **Instrumentation**
  - a) Automated microplate strip washer.
  - b) Microplate reader.or
  - c) Fully automated microplate processor.All instruments must be validated before use.  
Please contact your representative for details of recommended systems, software protocols for instrumentation and validation procedures.
7. **Disposable Reagent Troughs.** (Code 5F24-01).
8. **Sodium hypochlorite** for decontamination (Refer to **Health and Safety Information**).
9. **Sodium hydroxide solution (0.1M)** (For instrument decontamination)

(DiaSorin-S.p.A., LIAISON Anti-HBc, 2014)



**Fuente:** Base de datos fotográficos de las autoras.

## ANEXO 7: Extracción de ADN viral.

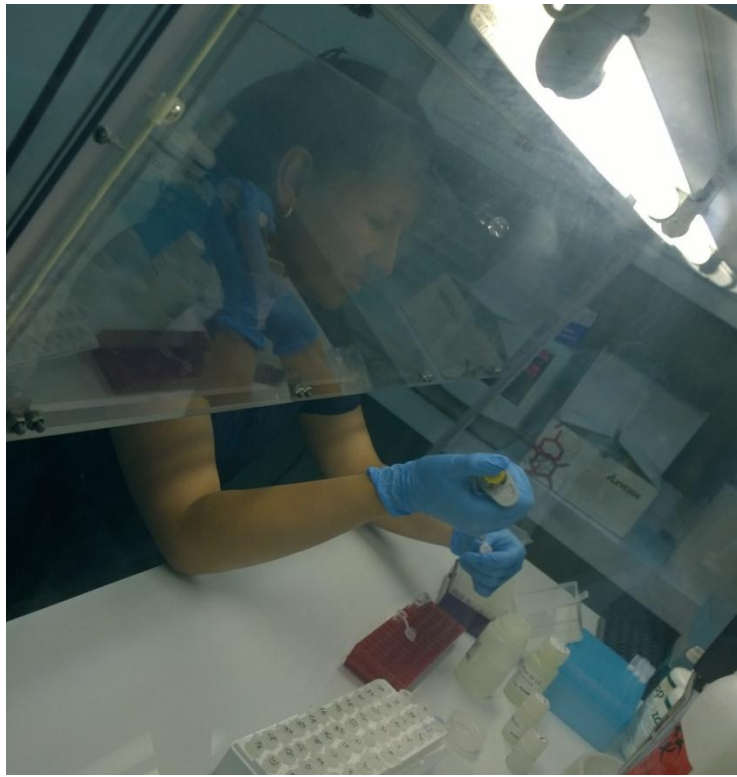
### Protocolo de extracción



08/09 Ver.1

1. Collect 200  $\mu$ l of a body fluid sample in a 1.5 ml microfuge tube.  
**Note:** Nucleic acid present in any contaminating bacteria or cells present in the body fluid sample will be copurified with the viral DNA/RNA. While this generally does not interfere with the PCR or RT-PCR amplification and results, it may be desirable to remove bacteria or cells by subjecting the sample to a 5 minute high-speed centrifugation at 12,000xg, before proceeding with the purification. Following centrifugation, carefully transfer the supernatant to a clean tube without disturbing the bottom of the first tube or any discernable pellet.
2. Add 200  $\mu$ l of Buffer V-L. Mix vigorously and thoroughly. Incubate at room temperature for 5 minutes.
3. Add 75  $\mu$ l of Buffer V-N, vortex to mix well. Centrifuge at 12,000xg for 5 minutes.
4. Transfer the clarified supernatant from Step 3 into a 2 ml microfuge tube (provided), and add 250 $\mu$ l [Isopropanol+1% acetic acid] and mix well.
5. Place a Miniprep column into a 2 ml microfuge tube (provided). Transfer the clarified liquid from Step 4 into the Miniprep column. Centrifuge at 6,000xg for 1 minute.  
**Note:** Increase the centrifuge time or g-force if lysate remains in the Miniprep column after 1 minute.
6. Discard the filtrate in the 2 ml microfuge tube. Place the Miniprep column back into the 2 ml microfuge tube. Add 500  $\mu$ l of Buffer W1A to the Miniprep column and let it stand at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 12,000xg for 1 minute.  
**Note:** Increase the centrifuge time or g-force if lysate remains in the Miniprep column after 1 minute.  
**Note:** Make sure that 95-100% ethanol has been added into Buffer W2 concentrate. Make a notation on the bottle label for future reference.
7. Discard the filtrate and place the Miniprep column back into the 2 ml microfuge tube. Add 800  $\mu$ l of Buffer W2 and centrifuge at 12,000xg for 1 minute.  
**Note:** Make sure that 95-100% ethanol has been added into Buffer W2 concentrate. Make a notation on the bottle label for future reference.
8. Discard the filtrate from the 2 ml microfuge tube. Place the Miniprep column back into the 2 ml microfuge tube. Centrifuge at 12,000xg for 1 minute to remove residual Wash Buffer.
9. Transfer the Miniprep column to a clean 1.5 ml microfuge tube (provided). To elute the viral DNA/RNA, add 40-60  $\mu$ l of Buffer TE (nuclease-free) to the center of the membrane and let it remain for 1 minute at room temperature. Centrifuge at 12,000xg for 1 minute.

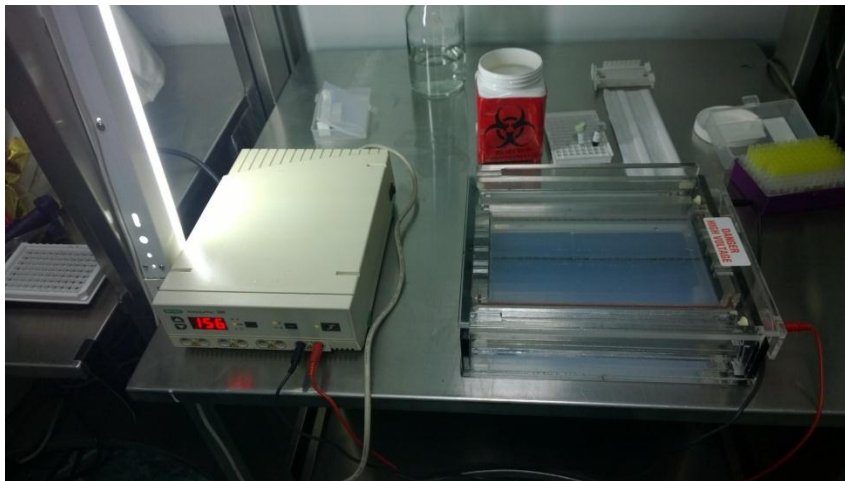
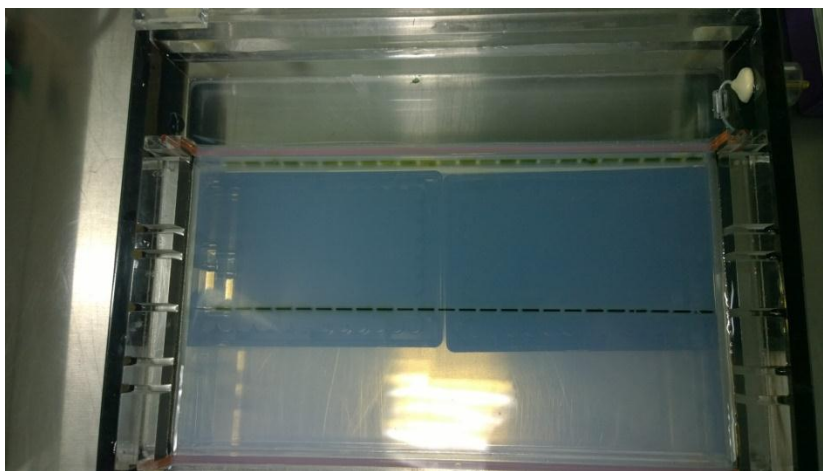
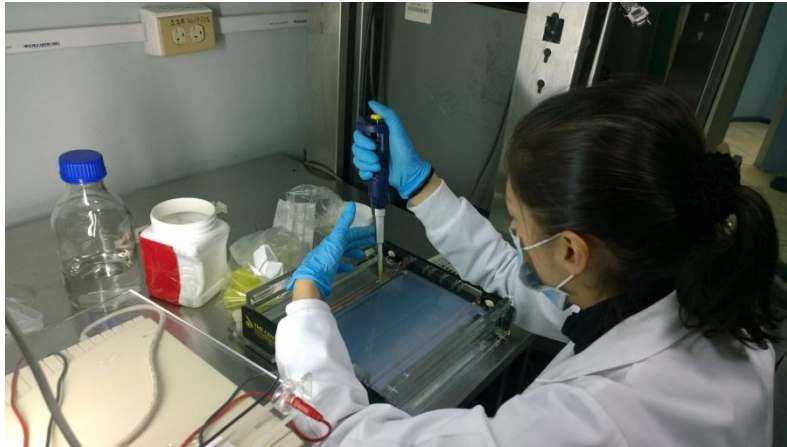
(Axygen-Biosciences, 2009)

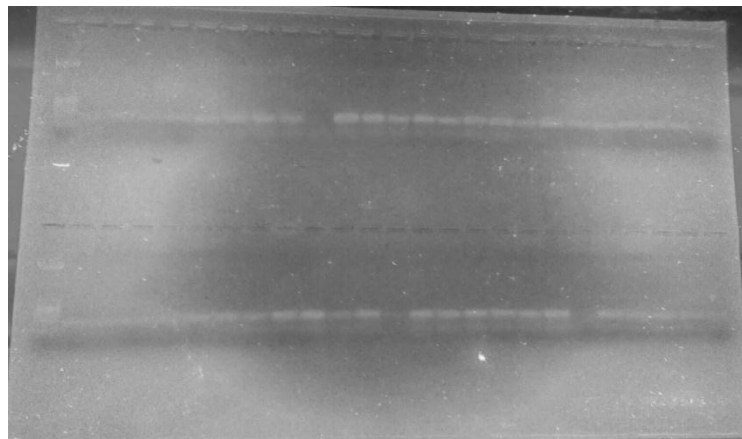


**Fuente:** Base de datos fotográficos de las autoras.

## ANEXO 8: Análisis en PCR







**Fuente:** Base de datos fotográficos de las autoras.