



## **RESUMEN**

Siendo la Hepatitis B una enfermedad sistémica el presente trabajo está destinado a la detección temprana del virus (HBV) mediante marcadores inmunológicos Antígeno de Superficie (HBsAg) y Anticuerpos IgM frente al Antígeno Core (HBc IgM) importantes en el diagnóstico exacto de la infección.

Los mismos que ayudan en la decisión terapéutica adecuada y así disminuir los daños hepáticos, así como también establecer criterios en el análisis serológico.

Siendo así, esta propuesta contiene lo fundamental en cuanto a Marcadores Serológicos, Criterios Serológicos en el Diagnóstico y a la Técnica Serológica empleada; dando así a conocer la importancia del estudio serológico en este tipo de patología.

Se estudiaron los marcadores serológicos del virus de la Hepatitis B en 40 personas que acudieron a los Laboratorios: del Colegio de Bioquímicos, SINAILAB y Clínica Latinoamericana quienes presentaban síntomas hepáticos. La determinación se realizó con el método serológico ELISA el mismo que nos ayudó a evaluar la situación actual de los pacientes obteniendo los siguientes resultados: Todas las muestras analizadas dieron resultados negativos para los dos marcadores HBsAg y HBc IgM con lo que se concluye que en el grupo estudiado no se observó infección aguda ni crónica por el Virus de la Hepatitis B (VHB), lo cual nos indica que existe mayor conocimiento de las consecuencias que produce esta patología o por el uso de vacunas eficaces e inocuas para la hepatitis.

## **PALABRAS CLAVES**

Hepatitis – Antígenos – Anticuerpos – Infección – Serología- Virus – Inmunológico  
Microelisa - Absorbancia



## **INDICE**

Dedicatoria  
Agradecimiento  
Resumen  
Índice  
Introducción

### **Capítulo I**

1. Hígado  
1.1 Fisiología  
1.2 Actividades  
1.2.1 Funciones Vasculares  
1.2.2 Funciones Metabólicas  
1.2.3 Funciones Excretoras y Secretoras  
1.2.3.1 Funciones de la Bilis

### **Capítulo II**

2. Hepatitis B  
2.1 Definición  
2.2 Etiología  
2.3 Estructura del Virus  
2.4 Ciclo Vital del Virus de la Hepatitis  
2.5 Cuadro Clínico  
2.5.1 Infección Aguda  
2.5.1.2 Perfil Serológico



## 2.5.2 Infección Crónica

### 2.5.2.1 Perfil Serológico

## 2.6 Exámenes Complementarios de Laboratorio

## 2.7 Epidemiología

## **Capítulo III**

### 3. Marcadores Inmunológicos

#### 3.1 DNA del VHB (DNA-VHB)

#### 3.2 HBsAg

#### 3.3 HBcAg

#### 3.4 HBeAg

#### 3.5 anti – HBs

#### 3.6 anti – HBc

#### 3.7 anti – HBe

#### 3.8 IgM anti – HBc

#### 3.9 IgG anti – HBc

## **Capítulo IV**

### 4. Examen Serológico

#### 4.1 Técnica Microelisa

##### 4.1.1 Fundamento

#### 4.2 Método de Ensayo para la Determinación de HBsAg

##### 4.2.1 Fundamento HBsAg (Human)



### 4.3 Método de Ensayo para la Determinación de HBc IgM

#### 4.3.1 Fundamento HBc IgM (General Biologicals)

## **Capítulo V**

### 5. Práctica

#### 5.1 Muestreo

#### 5.2 Tamaño de la Muestra

#### 5.3 Toma de la Muestra

#### 5.4 Determinación del HBs Ag

##### 5.4.1 Calibración del Equipo

##### 5.4.2 Reactivos y Contenidos

##### 5.4.3 Interpretación de Resultados

#### 5.5 Determinación del HBc IgM

##### 5.5.1 Calibración del Equipo

##### 5.5.2 Reactivos y Contenidos

##### 5.5.3 Interpretación de Resultados

## **Capítulo VI**

### 6. Análisis de Resultados

#### 6.1 Determinación HBsAg

##### 6.1.1 Obtención de Resultados

##### 6.1.2 Análisis de Resultados



### 6.1.3 Interpretación de HBsAg en Pacientes Hepáticos

## 6.2 Determinación HBc IgM

### 6.2.1 Obtención de Resultados

### 6.2.2 Análisis de Resultados

### 6.2.3 Interpretación de HBc IgM en Pacientes Hepáticos

## 6.3 Análisis del HBsAg y HBc IgM de la Hepatitis B

## **Capítulo VII**

### 7. Conclusiones

## **Capítulo VIII**

### 8. Recomendaciones

## **Bibliografía**

## **Anexos**



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**“DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE HBsAg Y ANTICUERPOS  
IgM FRENTE AL ANTÍGENO CORE HBc IgM EN PACIENTES HEPÁTICOS”**

**TESIS PREVIA A LA  
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:  
CINTHYA BRAVO SISALIMA**

**DIRECTORA:  
DRA. GRACIELA CHERREZ**

**ASESORA:  
DRA. NORMA CEDILLO**

**CUENCA – ECUADOR**

**2010**

**AUTOR:  
CINTHYA BRAVO SISALIMA**



## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto de investigación con gratitud y afecto a mis Padres y Hermanos quienes me apoyaron durante toda mi carrera para culminar con éxito.



## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y la Virgen María, que con sus Bendiciones me permitieron culminar con esta etapa de mi vida; a la Dra. Graciela Chérrez, Dra. Normita Cedillo, Dra. Diana Astudillo por dedicar parte de su tiempo a dirigirme el desarrollo del proyecto y así cumplir con mi objetivo.

Un reconocimiento especial a Silvana y Eugenia por la apertura que me brindaron en la obtención de muestras, parte importante de mi tesis.





## **INTRODUCCIÓN**

La Hepatitis B es una enfermedad sistémica conocida como hepatitis del suero o hepatitis de incubación prolongada, caracterizada por la asociación de fenómenos inflamatorios, necrosis hepatocelular y en muchos casos fibrosis.

El agente causal es el virus de la Hepatitis B (VHB), pertenece a la familia Hepadnaviridae y tiene un tamaño aproximado de 42nm, posee una envoltura lipoproteínica (antígeno de superficie HBsAg) y una estructura central conocida como “core” (antígeno del core HBcAg); produce infección aguda y crónica en el 90 y 10% de los casos respectivamente, pudiendo llegar a causar carcinoma hepatocelular o un estado de portador permanente.

El VHB produce infección aguda y crónica las mismas que se presentan en el recién nacido a través de la madre, niños y adultos su transmisión se produce fundamentalmente por Vía Parenteral y por Vía Sexual, sin embargo muchas personas se han infectado con jeringas, agujas o bisturíes esterilizados de manera inapropiada e incluso por tatuajes o perforación del lóbulo de la oreja, constituyendo un peligro para el personal de Laboratorios Clínicos y Hospitales.

Después de la infección por el VHB aparecen anticuerpos contra el HBcAg de las clases IgM e IgG, la primera persiste de 3 a 12 meses dando a conocer Hepatitis Aguda y acaban por hacerse indetectables mientras que la segunda persiste durante toda la vida (inmunidad adquirida) indicando infección tratada o Hepatitis Crónica si se presenta con el HBsAg.

Las pruebas serológicas en la actualidad son muy utilizadas en el diagnóstico de infecciones virales, son muy sensibles, detectan mínimas cantidades de anticuerpos del virus; razón por la cual el presente trabajo investigativo está destinado a la detección temprana del virus (HBV) mediante marcadores inmunológicos, para disminuir los daños hepáticos y riesgos de muerte que este produce, así como también establecer criterios en el análisis serológico.



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

Se determinará cualitativamente el título de HBsAg indicativo de que el paciente es portador del virus y el título de HBc IgM cualitativamente y cuantitativamente y de esta manera aportar con información a la comunidad médica respecto a los marcadores serológicos y a la técnica serológica (Microelisa).

Se calcula que aproximadamente hay 2.000 millones de personas infectadas<sup>6</sup>, un millón fallecen por cirrosis o cáncer hepático al año constituyendo un grave problema mundial de salud pública.



## CAPITULO I HÍGADO

### 1.1 Fisiología

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo, la unidad funcional básica es el lobulillo hepático cada uno tiene un aspecto piriforme y existen alrededor de 50.000 y 100.000 lobulillos.

El hígado tiene una posición estratégica en la circulación; él es el primer órgano que contacta la sangre proveniente del intestino. Esto no sólo implica que la superficie hepática absorba nutrientes, toxinas y microorganismos derivados del intestino, sino que también sugiere el papel hepático en la secreción de compuestos en la luz intestinal.

La vascularización se realiza a través de la vena porta y la arteria hepática, la vena porta proporciona entre el 65 y 85% de la sangre que llega al hígado, con una concentración de oxígeno algo inferior a la sangre arterial, pero muy superior a la sangre venosa. Por ello, la oxigenación de las células hepáticas depende en un 50% del sistema portal, el 50% restante depende de la arteria hepática, que proporciona al hígado entre el 20 y el 35% de la sangre que llega al hígado. La sangre portal procede del bazo y del intestino; y la sangre arterial del tronco celíaco.

### 1.2 Actividades

El hígado es un gran depósito de células, con capacidad de reacción química, que dispone de un metabolismo intenso, puesto que los sistemas metabólicos comparten sustratos y energía y, además, en este órgano se procesan y se sintetizan numerosas sustancias transportadas a otras regiones del organismo que cumplen miles de funciones diferentes. <sup>5</sup>

5. FATTORUSSO V, "Vademécum Clínico". Pag: 132

Al hígado le atañen tres tipos de funciones básicas que son:



1. Funciones vasculares (almacenamiento y filtración)
2. Funciones metabólicas
3. Funciones secretoras y excretoras encargadas de formar bilis.

### **1.2.1 Funciones Vasculares**

Las características vasculares del hígado, hacen posible que el mismo se comporte como un reservorio importante de sangre y además, que actúe como un filtro para la sangre procedente del intestino.

#### Función de almacenamiento.

Al ser el hígado un órgano grande, venoso, le permite formar parte de los grandes reservorios de sangre del organismo; ya que es capaz de almacenar el 10% del volumen total de sangre; de modo que puede albergar hasta un litro de sangre en casos en los que la volemia se vuelve excesiva y también le permite suplir sangre extra cuando la volemia disminuye.

#### Función de filtración

Las superficies internas de todos los sinusoides hepáticos están cubiertas por un elevado número de células de Kupffer o macrófagos residentes en el hígado, cuya función consiste en fagocitar parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores.

### **1.2.2 Funciones Metabólicas**

Las funciones metabólicas hepáticas son llevadas a cabo por los hepatocitos.

#### Metabolismo de los Hidratos de Carbono

Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los carbohidratos son:

1. Almacenamiento de glucógeno.
2. Conversión de galactosa y fructosa a glucosa.
3. Gluconeogénesis.



4. Formación de compuestos químicos importantes a partir de productos intermedios del metabolismo de los carbohidratos.

### Metabolismo de los lípidos

Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células, algunos aspectos del mismo se producen con mayor rapidez en el hígado que en las demás células.

Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los lípidos son las siguientes:

1. Oxidación de ácidos grasos y formación de ácido acetoacético, para proveer energía destinada a otras funciones corporales.
2. Síntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y casi todas las lipoproteínas.
3. Conversión de grandes cantidades de carbohidratos y proteínas en grasas.

### Metabolismo proteínico

Las funciones más importantes del hígado en dicho metabolismo son:

1. Desaminación de aminoácidos.
2. Formación de urea para eliminar el amoníaco de los líquidos corporales.
3. Formación de aproximadamente el 90% de proteínas plasmáticas.
4. Interconversiones entre los diferentes aminoácidos y otros compuestos importantes para los procesos metabólicos.

### Otras funciones metabólicas.

1. Almacenamiento de vitaminas.
2. Formación de sustancias que intervienen en el proceso de coagulación. Incluye fibrinógeno, protrombina, factores VII, IX y X.
3. Almacenamiento de hierro.
4. Eliminación o excreción de fármacos, hormonas y otras sustancias.



### 1.2.3 Funciones Excretoras y Secretoras encargadas de formar Bilis

Una de las tantas funciones hepáticas es la formación y secreción de bilis. La bilis es una secreción acuosa que posee componentes orgánicos e inorgánicos cuya osmolaridad es semejante a la del plasma y normalmente un humano adulto secreta entre 600 y 1200 ml diarios.

CONSTITUYENTES	BILIS HEPÁTICA
Agua	97,5 g/%
Sales biliares	1,1 g/%
Bilirrubina	0,04 g/%
Colesterol	0,1 g/%
Ácidos grasos	0,12 g/%
Lecitina	0,04 g/%
Sodio	145 meq/l
Potasio	5 meq/l
Calcio	5 meq/l
Cloruros	100 meq/l
Bicarbonato	28 meq/l

#### 1.2.3.1 Funciones de la Bilis

- Las sales biliares por su acción emulsificante facilitan la digestión de las grasas en el intestino e incrementan el transporte de lípidos a través de la mucosa intestinal. Por tanto, la ausencia de sales biliares perturba la digestión y absorción de líquidos y por consiguiente también se perturba la absorción de vitaminas liposolubles como son la A, D, E y K. Un déficit de vitamina K conlleva una deficiencia en la formación a nivel hepático de diversos factores de la coagulación (protrombina, factores VII, IX y X) que generan grave alteración de dichas funciones.
- Constituye una vía de excreción para el colesterol y la bilirrubina, siendo esta última un pigmento tóxico para el organismo.
- Tiene una función inmunológica, ya que permite el transporte de inmunoglobulina A a la mucosa intestinal.



## CAPITULO II

### HEPATITIS B

#### 2.1 Definición

La hepatitis B es una enfermedad sistémica que afecta primariamente al hígado, produce inflamación aguda y da lugar a una enfermedad clínica caracterizada por fiebre, síntomas gastrointestinales e ictericia.

Las manifestaciones clínicas de la infección por el virus de la hepatitis B son muy variadas, y es importante recalcar que frecuentemente esta infección puede no dar ningún síntoma por muchos años lo cual no significa necesariamente que la infección esté controlada. El daño que produce el virus de la hepatitis B en el hígado es también variable y depende de la capacidad de reparación del hígado y de la capacidad del organismo de controlar la infección. Las consecuencias más importantes de esta infección a largo plazo son el desarrollo de cirrosis hepática y de carcinoma hepatocelular.

#### 2.2 Etiología

El virus de la hepatitis B se adquiere o transmite a través del contacto con sangre o fluidos corporales contaminados. Las vías de transmisión incluyen:

- **Relaciones sexuales:** Probablemente la forma más frecuente de contagio. La transmisión puede ser a través de relaciones hetero como homosexuales.
- **Transfusiones de sangre:** Actualmente es una forma de transmisión prácticamente inexistente debido a los exámenes practicados rutinariamente para transfusiones.
- **Transmisión perinatal:** Consiste en la transmisión del virus de la madre al hijo, en el momento del parto, constituyendo una importante vía de contagio.
- **Drogas inyectables:** El uso de jeringas y/o agujas contaminadas es una importante vía de contagio.



- **Tatuajes, perforaciones o “piercing”** realizadas con material no desechable.
- **Contacto cercano:** La infección puede producirse si sangre de una persona infectada entra en contacto con las membranas mucosas (ojos, boca, genitales) o con pequeñas heridas de otra persona. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se comparte una hoja de afeitarse, o un cepillo de dientes.
- **Procedimientos médicos:** El virus de la hepatitis B puede transmitirse por instrumentos contaminados durante procedimientos médicos invasivos como cirugías si no se aplican las precauciones necesarias.

### 2.3 Estructura del Virus

El VHB es un virus DNA, el único de los hepatotropos conocidos actualmente. Pertenece a la familia Hepadnaviridae y tiene un tamaño aproximado de 42nm. Posee una envoltura y una estructura central conocida como “core” de simetría icosaédrica de 27 nm de diámetro.

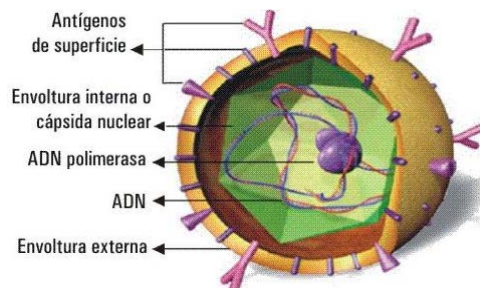


Figura 1. Estructura del Virus<sub>3</sub>

La estructura genómica del VHB está formada por dos cadenas de DNA de 3200 nucleótidos, una negativa completa y otra incompleta positiva.

La microscopía electrónica revela tres morfologías:

3. Estructuras Virus. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo>.

**Las Partículas** en mayor número esféricas y miden 22nm de diámetro, las mismas que están formadas de manera exclusiva por HBsAg; unas más grandes llamadas viriones esféricos de 42nm se observan con menor frecuencia.





**La Superficie Externa o envoltura** contiene el HBsAg y rodea a un **Centro interno** de la nucleocápside que contiene el HBcAg. La longitud variable de una región de la cadena única del genoma circular de ADN produce partículas genéticamente heterogéneas con una amplia diversidad de densidades de flotación.

#### **2.4 Ciclo Vital del Virus de la Hepatitis B**

Los viriones infectantes se adhieren a un receptor en la superficie de los hepatocitos por medio de una porción del HBsAg, y pierden su cubierta. En el núcleo del genoma enzimas celulares no identificadas convierten la cadena del ADN parcialmente doble en ADN circular covalente cerrado, este sirve como plantilla para la producción del mRNA y del pregenoma de RNA de 3.5 kb.

El pregenoma de RNA adquiere su cápside con el HBcAg recién sintetizado. Dentro de los centros virales, la polimerasa sintetiza por transcripción inversa una copia de la cadena negativa y positiva del ADN. Los centros virales salen por gemación de las premembranas de Golgi y adquieren envolturas que contienen HBsAg y pueden salir de la célula. Opcionalmente los centros virales pueden reintroducirse otra vez al núcleo e iniciar otro ciclo de replicación en la misma célula.<sup>8</sup>



8. JAWETZ, MELNINCK, ADELBERG, "Microbiología Médica". Pág.345

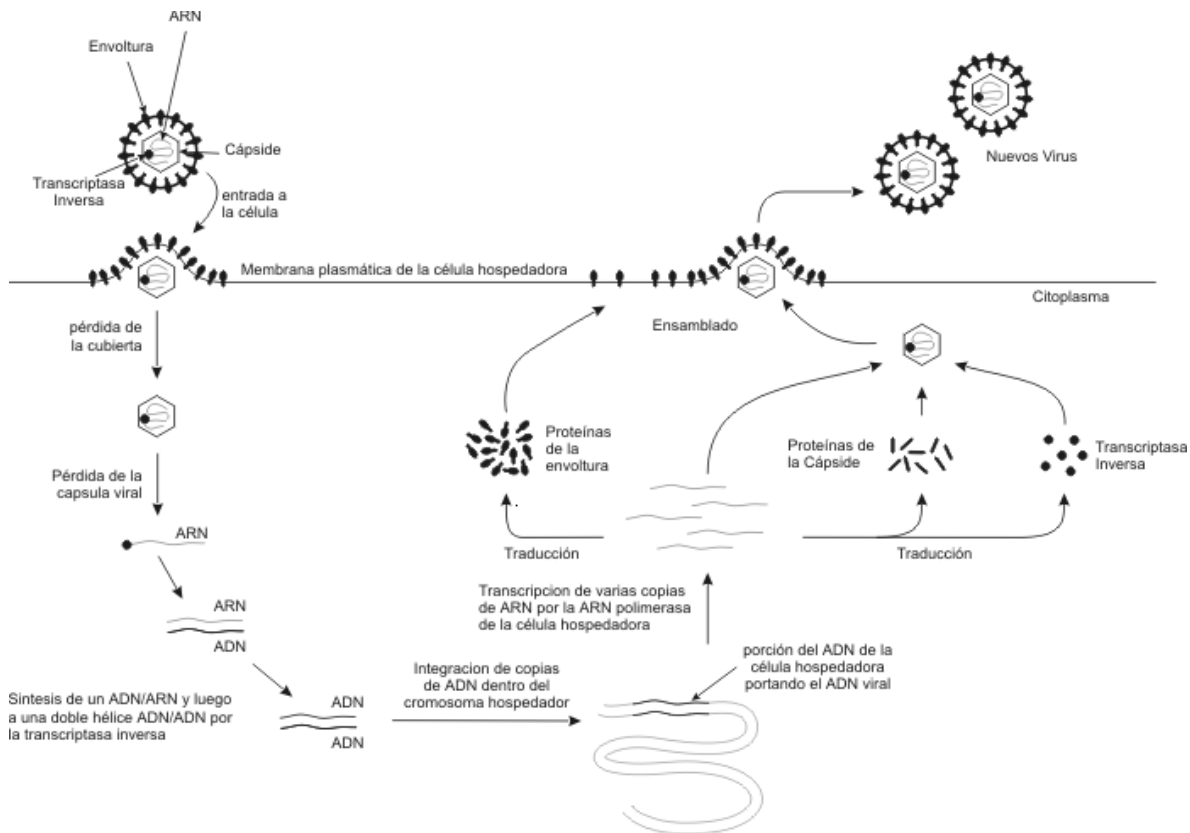


Figura 2. Ciclo de Replicación del VHB 9

El virus de la hepatitis B puede tomar la energía y recursos de una célula hepática y los utiliza para generar más virus impidiendo que la célula produzca las sustancias que necesita para sobrevivir. En consecuencia, la vida de la célula hepática es mucho más breve que el promedio. Antes de morir, la célula hepática infectada puede haber producido miles de virus.

El proceso, desde el momento en que el virus se fija en la célula y empieza a replicarse hasta que la célula huésped muere, puede durar unas cuantas horas. Gracias al gran número de células hepáticas, este proceso de infección ocurre varias veces en un período promedio de varios meses o años antes de que la persona tenga algún síntoma.

9. Replicación Virus Hepatitis B. Disponible en: <http://www.google.imagenes.com>



Cuando el sistema inmunológico del organismo reconoce la presencia del virus de la hepatitis B, no ataca al propio virus, ataca a las células hepáticas infectadas y que ahora “hospedan” la replicación del virus.

A medida que el virus se apodera de más y más células hepáticas en el proceso de replicación, estas células hepáticas se dañan y las células circundantes (fibroblastos) que forman la estructura de las células hepáticas se activan para formar tejido cicatricial en un proceso denominado fibrosis.

Esta constante cicatrización y regeneración provocan la deformación del hígado de tal manera que entorpece el flujo sanguíneo.

A pesar de que el hígado puede perder más del 80 por ciento de su masa y aún así regenerarse, si las cicatrices se extienden mucho, se produce una cirrosis; y como los virus de la hepatitis B se integran a los núcleos de las células y alteran el código genético, aumenta la probabilidad de cáncer de hígado.

El progreso y la gravedad de la enfermedad hepática en las personas con hepatitis B varían según el género, consumo de alcohol, otra infección simultánea, y también por la cepa del virus y de cualquier mutación viral.

## 2.5 Cuadro Clínico

### 2.5.1 Infección Aguda

La expresión clínica de la hepatitis vírica aguda es muy variada. El curso clínico de la enfermedad consta de cuatro periodos: incubación, pródromos y convalecencia.

El **Periodo de Incubación** es el intervalo entre la exposición al virus y la aparición de los primeros síntomas. Varía según el agente etiológico y probablemente según la cantidad de viriones.

El **Periodo Prodrómico** comprende el tiempo en el que el paciente presenta síntomas antes de la aparición de ictericia, su duración es de 3-5 días, pero puede durar semanas o incluso no estar presente.



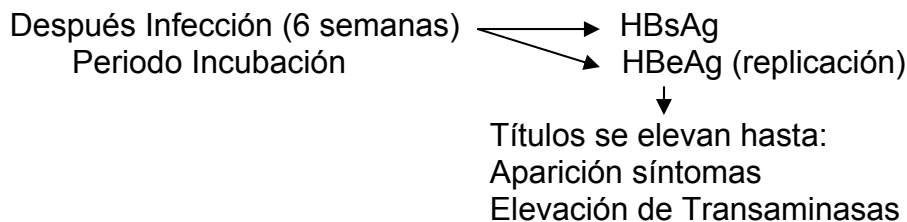
El paciente se encuentra cansado, con pérdida de su capacidad olfatoria. A veces hay náusea y vómitos, dolor del hipocondrio derecho, diarrea, cefalea, fiebre que puede alcanzar los 39°C sin escalofríos de 1 a 2 días de duración, existe cambio de coloración en la orina y decoloración de las heces.

El **Periodo de Convalecencia** desaparece la ictericia se presenta una leve hepatomegalia y esplenomegalia.

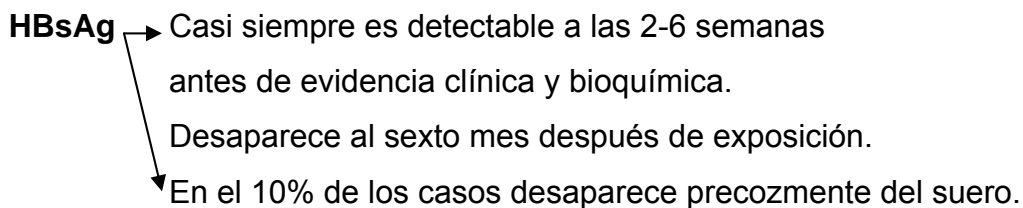
En el 90% de los casos la infección aguda mejora espontáneamente, por su fuerte componente inmunológico puede existir el compromiso de otros órganos. Solo el 1% de los pacientes puede presentar en el momento de la infección aguda un cuadro de falla hepática fulminante.

### 2.5.1.2 Perfil Serológico

El perfil de los marcadores serológicos está claramente definido y permite seguir en cada paciente la evolución de la infección.



Nunca se detecta HBcAg libre en suero puesto que está cubierto de HBsAg.



Simultáneamente aparecen anticuerpos contra el HBcAg de la clase IgM e IgG

**IgM** → Persiste en infecciones autolimitadas de 3 -12 meses



y se vuelven indetectables.

La presencia de anti-HBcIgM no siempre indica infección aguda

**IgG** → Persisten durante toda la vida

**anti-HBs** → No se suele detectar en la fase activa de la enfermedad  
aunque haya desaparecido el HBsAg  
Se identifica semanas más tarde

En muchos casos los niveles de anti-HBc IgM pueden descender rápidamente después de desaparecer HBsAg y en otros casos la desaparición es lenta, mostrando los pacientes anticuerpos IgM después de dos años de la enfermedad, razón por la cual el estudio de anti-HBc IgM se debería realizar cuando ya el paciente ha pasado la fase icterica y se encuentra en fase de convalecencia.

A los 6 meses puede ya desaparecer anti-HBc IgM predominando una respuesta anti-HBc IgG que persiste indefinidamente.

### 2.5.2 Infección Crónica

Más o menos el 10% de los pacientes que desarrolla el episodio agudo pueden quedar como portadores crónicos del VHB.

De los que desarrollan hepatitis crónica alrededor del 10% desarrollan cirrosis hepática y de estos entre el 5 al 7% pueden presentar carcinoma hepatocelular.

Se debe recordar que hay pacientes portadores asintomáticos que pueden desarrollar carcinoma hepatocelular sin pasar por el estadio de hepatitis crónica y sin presencia de cirrosis e igualmente existen portadores asintomáticos que depuran espontáneamente el virus sin desarrollar secuelas.



### 2.5.2.1 Perfil Serológico

En la mayoría de los individuos crónicamente infectados se detecta en suero HBsAg en concentraciones mayores de 1mg/ml.

Aunque la mayoría de los portadores de HBsAg tienen títulos elevados de HBV en suero, algunos portadores parecen no tener partícula infecciosa circulante. En estos casos la replicación del virus en el hígado ha cesado.

Estos pacientes pueden aparecer como portadores de HBsAg sin detección de HBeAg, la enfermedad hepática es mínima y son considerados portadores sanos.

Casi todos los pacientes crónicamente infectados presentan títulos elevados de anti-HBc en la sangre. Aunque la mayoría de los anticuerpos anti-HBc son de clase IgG los anticuerpos de clase IgM se siguen produciendo y pueden detectarse en 10 % de pacientes crónicos.

El anti-HBc IgG es marcador de infección antigua con inmunidad adquirida o representa infección crónica cuando coexiste con el HBsAg.

**Tabla 1. Marcadores Serológicos 4**

Fase de la Infección	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	
			IgG	IgM
Periodo de incubación	+	-	-	-
Hepatitis Aguda	+	-	+	+
Hepatitis Aguda HBsAg-negativa	-	-	+	+
Portador HBsAg sano	+	-	+++	-
Hepatitis B crónica replicativa	+	-	+++	+/-
Hepatitis crónica mínimamente replicativa	+	-	+++	-
Infección VHB pasada reciente	-	++	++	+/-
Infección VHB pasada distinta	-	+/-	+/-	-
Vacunación Reciente	-	++	-	-

4. FARRERAS, "Medicina Interna". Pág: 317



## 2. 6 Exámenes Complementarios de Laboratorio

En los exámenes de laboratorio, la alteración más constante es la elevación de las transaminasas, que habitualmente es moderada y pocas veces supera en 8-10 veces los valores normales. El cociente ASAT/ALAT es habitualmente inferior a 1.

La ALAT (alanino-transferasa) y la ASAT (aspartato-transferasa) pueden elevarse a valores sobre 1000 U/L en una hepatitis aguda y varían desde el rango normal (menos de 40 U/L) hasta algunos cientos en la hepatitis crónica.

Las demás pruebas hepáticas por lo común son normales, con excepción de la gammaglutamiltranspeptidasa y de la gamaglobulina, que están elevadas en algunos pacientes.

La bilirrubina es normal o está ligeramente elevada. En algunas hepatitis leves existe una elevación moderada de su fracción no conjugada. El hemograma y las pruebas de coagulación son normales.

Entre los exámenes instrumentales, solo la biopsia hepática posee valor diagnóstico. La ecografía y la TC no aporta datos significativos, pero pueden ayudar a excluir otras enfermedades o sugerir la presencia de cirrosis.

## 2.7 Epidemiología

Se calcula que aproximadamente hay 300 millones de personas infectadas en el mundo con el VHB, y se estima que es responsable de entre 250.000 y 50.000 muertes al año. La prevalencia de la infección por el virus varía en forma importante en diferentes partes del mundo.

Reportes indican que en el Ecuador en el año 2007 se presentaron 236 casos de pacientes diagnosticados con Hepatitis B.

La principal vía de transmisión actualmente es la parenteral especialmente en personas adictas a las drogas por uso intravenoso. Igualmente la transmisión sexual y vertical en países en vías de desarrollo tiene importancia.



Las transfusiones sanguíneas han dejado de ser importantes en la forma de contagio desde que se perfeccionó la selección de donantes.

En función de estas vías de transmisión se identifican una serie de grupos de riesgo expresados en la tabla 2:

**Tabla 2. Grupos de riesgo para el VHB (2001)<sub>2</sub>**

Grupos de riesgo	HBsAg+	HBsAg(+) o anti-HBs(+)
Nacidos en áreas endémicas	13%	70-85%
Homosexuales masculinos	6%	35-80%
Adictos a drogas por vía parenteral	7%	35-80%
Hemodializados	3-10%	20-80%
Infectados por el VIH	8-11%	89-90%

Los distintos mecanismos de contagio tienen un impacto epidemiológico diferente. El riesgo de transmisión por punción accidental se calcula en un 20% si el material infectante es HBeAg positivo, mientras que este riesgo se reduce a un 5% si el material es anti-HBe. La transmisión por vía sexual, actualmente la más importante por su frecuencia, está implicada en el 41% de las hepatitis de nuestro medio y explica la mayor prevalencia encontrada en las edades cercanas a la adolescencia y que los promiscuos homo o heterosexuales sean grupos de riesgo.

La transmisión vertical en nuestra zona tiene escasa importancia, y menos actualmente, debido a la detección de madres portadoras durante el parto y la aplicación de inmunoprofilaxis de forma generalizada.

2. Epidemiología en el Ecuador. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.com.ec>





La transmisión por vía nosocomial a través de un médico o personal auxiliar portador de VHB, aunque cuantitativamente es despreciable, plantea una serie de medidas ético-legales.

La fuente de infección del VHB la constituyen los portadores agudos y crónicos del virus.

En nuestro país, el número de portadores oscila entre el 1 y el 2% de la población, con tendencia a disminuir por la política de vacunación general de la población.

La capacidad infectante de un portador es tanto mayor cuanto mayor es la replicación viral. El virus se encuentra en todos los líquidos orgánicos, pero sus máximas concentraciones se alcanzan en hígado y sangre.

Para destruir la actividad viral del material contaminado se requiere como mínimo ebullición a más de 100°C durante 20 min o contacto con glutaraldehído en concentraciones superiores al 2%.



## CAPITULO III

### MARCADORES INMUNOLÓGICOS

La evolución clínica de la hepatitis B puede ser muy variable, desde una infección asintomática, anictérica, que ocurre en la mayoría de los casos, hasta una enfermedad aguda, que en algunas ocasiones se complica evolucionando hacia la cronicidad, la cirrosis o a la forma fulminante fatal.

La presencia en suero de antígenos virales y de anticuerpos a que dan lugar, se modifican a lo largo del tiempo en estrecha relación con la evolución biológica de la enfermedad; por ello su determinación cualitativa y cuantitativa puede servirnos para evaluar la situación actual y el pronóstico futuro de la infección viral.

La apropiada interpretación de los marcadores serológicos permitirá en primer lugar diagnosticar la infección en el enfermo, en segundo lugar realizar un pronóstico fiable con y sin tratamiento y en tercer lugar conocer la susceptibilidad en el individuo sano.

**3.1 DNA del VHB (DNA-VHB):** Su positividad en suero indica replicación viral y se detecta con técnicas de hibridación, *branched* DNA y PCR. El límite de detección más sensible es de  $10^2$  a  $10^3$  copias/ml sin diferencias entre los distintos genotipos. En la práctica clínica se considera como replicación viral positiva, según la Asociación Americana para Estudio del Hígado (AASL), la presencia de valores superiores a  $10^4$  copias/ml (2001).

Actualmente la determinación de DNA del VHB se requiere para:

- **Valoración inicial de una infección crónica por el VHB, ya que la replicación es un factor de progresión de la enfermedad y de su actividad.**



- Decisión de tratamiento de una hepatitis crónica por VHB, ya que sólo deben tratarse los enfermos con replicación viral positiva.
- Monitorizar el tratamiento con antivirales o interferón en las hepatitis crónicas por VHB.

### **3.2 HBsAg: Antígeno de superficie del VHB. Detectable en gran cantidad en el suero.**

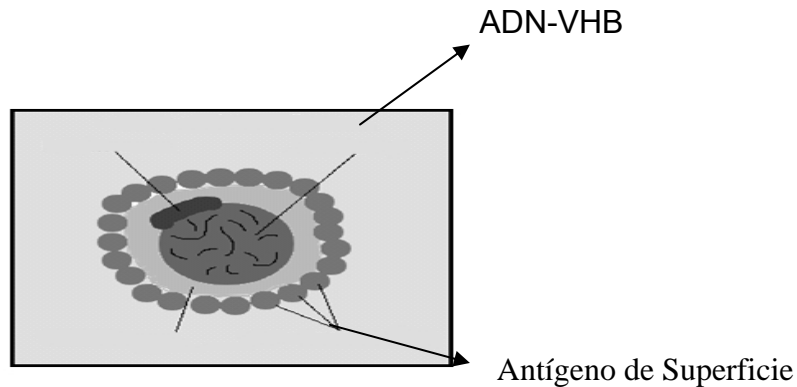
Se sintetiza en el citoplasma del hepatocito independientemente de los viriones completos y se excreta fuera de la célula en forma de agregados esféricos o filamentosos que se pueden detectar libres en el suero. Aparece a partir de la cuarta semana de infección y se detecta en todas las fases de la misma, incluyendo el periodo de incubación. Si la evolución es favorable, desaparecerá paulatinamente. Por el contrario, su persistencia al cabo de 6-8 semanas o la ausencia de una disminución significativa en su título tras el primer mes de la enfermedad son indicadores de mal pronóstico y de evolución a la cronicidad. La positividad de este marcador más allá del sexto mes de la infección define la situación de infección vírica persistente. Con frecuencia, esta persistencia del virus origina una infección crónica y, eventualmente, una enfermedad hepática crónica. Los pacientes en los que se detecta HBsAg en suero que no presentan nunca marcadores de replicación vírica ni signos de lesión hepática se conocen como "portadores sanos" del VHB.

La posibilidad de que exista infección siendo este marcador serológico negativo sólo se puede dar en tres circunstancias excepcionales.

La primera, durante el primer mes del periodo de incubación de la infección. La segunda, en la fase de resolución de la infección cuando se ha negativizado el antígeno sin llegar a desarrollarse anti-HBs. Por último, en el caso de mutación del VHB que determina una incapacidad de éste para sintetizar el HBsAg.



Sin embargo, estas circunstancias son excepcionales en la práctica habitual y la negatividad de este antígeno se considera sinónimo de ausencia de infección por el VHB. En caso de duda razonable, presencia de otros marcadores e inexistencia de otras causas de infección hepática, la determinación del ácido nucleico del VHB puede ser un elemento de ayuda diagnóstica.



**Figura 3. Antígeno de Superficie HBsAg<sub>3</sub>**

### **3.3 HBcAg:** Antígeno del centro del VHB.

Es una proteína sintetizada por el propio virus y, aunque su detección en el núcleo celular en la biopsia hepática, con técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, es signo evidente de replicación viral, el desarrollo de las técnicas de detección del DNA le ha hecho perder utilidad. La detección en suero es posible, previo tratamiento del mismo, pero carece de utilidad clínica.

### **3.4 HBeAg:** Antígeno e del VHB, soluble. Detectable en gran cantidad en suero.

Su presencia indica replicación del virus.

Es una proteína que se produce por escisión de la proteína *precore* y *core*, de tal forma que su tamaño se transforma de 25 kDa en 17 kDa. Se detecta en suero y su positividad va unida, casi invariablemente, a la replicación viral.

3. Estructuras Virus. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo>.



Sin embargo, la negatividad de este marcador no implica la ausencia de ésta, ya que en los enfermos infectados por virus mutantes que no sintetizan el HBeAg, no lo presentan en suero a pesar de la existencia de replicación viral.

**3.5 anti-HBs:** Anticuerpo frente a HBsAg. Indica infección pasada e inmunidad.

La detección de este anticuerpo supone un estado inmunitario frente al HBsAg, por lo que se detecta tras una infección pasada frente al VHB apareciendo entonces unido al anti-HBc.

Estos anticuerpos aparecen tras la desaparición del HBsAg y nunca antes de los cuatro meses de la infección por el virus. Excepcionalmente, puede detectarse en un enfermo la presencia simultánea de HBsAg, anti-HBc y anti-HBs. Esta circunstancia se explica cuando una persona con inmunidad frente al virus B se infecta por una cepa mutante del virus.

Tras aparecer en suero el anti-HBs, éste puede permanecer de por vida como señal de infección pasada, pero en algunas personas puede perderse y detectarse únicamente el anti-HBc. Esta eventualidad ha sido puesta de manifiesto en los casos de infección por el VHB en enfermos trasplantados con donante que expresaban en suero el anti-HBc acompañado o no de anti-HBs, ya que el riesgo de ser infectados es casi del 100% <sup>2</sup>; esto se produce por dos circunstancias, una es el trasplante de un hígado con restos ocultos de infección por el VHB que no se expresa serológicamente y la otra por el estado de inmunosupresión que conlleva el trasplante.

**3.6 anti-HBc:** Anticuerpo frente a HBcAg. Indica infección con HVB en algún momento.

La respuesta humoral a la presencia en suero del HBcAg es la producción de anticuerpos frente a él. Aparece casi simultáneamente a la detección del HBsAg y permanece después de la resolución de la infección como prueba de haber estado en contacto con el VHB.



Las personas vacunadas frente al VHB no presentan este anticuerpo, ya que la vacuna sólo contiene el HBsAg.

En la clínica habitual la detección de anti-HBc como único marcador de infección por el VHB no es excepcional y su significado puede ser triple.

La primera posibilidad es que se trate de un falso positivo, dada la gran sensibilidad de la técnica, y en estos casos no se detecta el DNA del virus.

La segunda posibilidad es que se trate de una infección oculta por el VHB que sólo se exprese por este marcador: esta posibilidad, dada la alta sensibilidad de las técnicas de detección de HBsAg, es muy rara, detectándose en estos casos el DNA vírico.

La última posibilidad, con mucho la más frecuente, es que se trate de una infección pasada y que no se detecten, por haberse perdido los estímulos antigénicos, la presencia de anticuerpos frente al antígeno de superficie, en este caso no se detecta tampoco el DNA.

**3.7 anti-HBe:** Anticuerpo frente a HBeAg. Su presencia indica título bajo de VHB

Su presencia en general es indicativo de baja o nula replicación y, consecuentemente, poca infectividad. Este marcador puede ser positivo, con replicación viral elevada, cuando el enfermo está infectado por una cepa del VHB mutante que no expresa el HBeAg.

**3.8 IgM anti-HBc:** Anticuerpo de clase IgM frente a HBcAg.

Indica infección reciente con VHB.

Positivo durante 4 – 6 meses después de la infección.

Realizado con técnicas serológicas, proporciona una sensibilidad de detección de hepatitis aguda por el VHB de casi el 100%, de tal forma que su negatividad descarta una infección aguda, es decir de menos de seis meses de evolución. Su



especificidad no es del 100%, ya que puede ser positivo en caso de infección crónica por el VHB (evolución superior a seis meses) con replicación viral elevada. En la práctica clínica habitual constituye un marcador específico de hepatitis aguda por VHB.

**3.9 IgG anti-HBc:** Anticuerpo de la clase IgG frente a HBcAg

Persiste durante toda la vida.

**Tabla 3. Utilidad práctica de los marcadores del VHB** <sup>4</sup>

Marcador	Utilidad
HBsAg	Infección aguda o crónica
Anti-HBc IgM	Infección aguda
Anti-HBs	Inmunidad
Anti-HBc	Marcador de prevalencia de infección
DNA-VHB	Marcador de replicación viral

4. FARRERAS, "Medicina Interna". Pág: 318



## **CAPITULO IV** **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las técnicas serológicas actuales permiten detectar, en los pacientes infectados, los antígenos del VHB y la respuesta de anticuerpos frente a dicha infección con distintos grados de sensibilidad y especificidad.

Su determinación cualitativa y cuantitativa nos permite realizar un diagnóstico, establecer un pronóstico fiable de la infección, con o sin tratamiento, y conocer la susceptibilidad de la población a la infección por VHB (prevención).

Las técnicas inmunológicas nos permiten realizar dos tipos de diagnósticos:

- 1) Identificar antígenos en una muestra (heces, sangre, tejidos) usando como reactivo un antisuero específico. En este caso se habla de **técnicas directas**.
- 2) Determinar si un individuo tiene anticuerpos frente a un agente infeccioso utilizando como reactivo un antígeno específico. En este caso se demuestra la infección mediante la respuesta que ha dado el individuo. Por eso se habla de **técnicas indirectas**.

En ambas técnicas, la reacción enzimática puede ser detectada espectrofotográficamente con un lector.

Entre las técnicas serológicas, las más empleadas son las que se basan en un ensayo inmunoenzimático o **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Es decir, se revela la reacción antígeno-anticuerpo mediante un enzima que reacciona específicamente con un sustrato y el resultado es la producción de color.<sup>10</sup>

10. Técnicas Inmunológicas. Microelisa. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos11/microeli/.shtml>

### **Técnica Microelisa**

Los ensayos ELISA son técnicas inmunoenzimáticas que se difundieron en la





década de los 60 al descubrir que los Antígenos (Ag) y los anticuerpos (Ac) podían ser unidos a una fase sólida, lo que permitió el desarrollo de métodos para la detección y cuantificación de sustancias con actividades biológicas y químicas.

Es decir, las técnicas inmunoenzimáticas o ELISA se basan en la marcación de Ac o Ag con enzimas, para la posterior detección de su interacción.

#### **4.1 Fundamento**

La técnica es un ensayo inmunoenzimático ampliamente empleado en el área médica para la cuantificación de moléculas especialmente de aquellas que experimentan cambios en diferentes estados como pueden ser infecciones por bacterias, virus, hongos o parásitos o fases activas de enfermedades autoinmunes.

Se pueden medir anticuerpos, inmunoglobulinas contra antígenos de patógenos, toxinas, etc.

#### **4.2 Método de Ensayo para la Determinación del Antígeno de Superficie del Virus de la Hepatitis B (HBsAg) en Suero Humano**

##### **4.2.1 Fundamento HBsAg (Human)**

“La prueba de HBsAg esta basada en un ensayo tipo sandwich en los micropozos cubiertos con anticuerpos monoclonales de ratón (acr) contra HBsAg.

La muestra reacciona simultáneamente con los acr inmovilizados y con los anticuerpos policlonales anti-HBs (cobayo) conjugados con peroxidasa de rábano.

Si el HBsAg esta presente en la muestra, el complejo contenido peroxidase es capturado en la superficie de los micropozos. Luego de la incubación el conjugado no unido es removido por el lavado.

La solución de sustrato es agregada y durante la posterior incubación se desarrolla un color azul. La intensidad de color, la cual cambia a amarillo luego de parar la reacción con una solución ácida, es proporcional a la cantidad de HBsAg en la muestra.



Con ciertos límites, la densidad óptica a 450nm ( $OD_{450}$ ) refleja la cantidad de antígeno de superficie del HBV en la muestra".<sup>11</sup>

### 4.3 Determinación del Antígeno de Superficie del Virus de la Hepatitis B (HBsAg) en Suero Humano

#### 4.3.1 Calibración del Equipo

Se procedió a calibrar el equipo de acuerdo a las especificaciones del set de Reactivos.

Se emplea un blanco, tres controles negativos y dos controles positivos; se lee con una absorbancia de 450nm.

#### 4.3.2 Reactivos y Contenidos

- Tiras de Micropocillos: **Tiras de 8 pocillos recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-HBs (ratón).**
- HBsAg Control Negativo: **2,0ml listo para usar, suero humano.**
- HBsAg Control Positivo: **1,5ml listo para usar, suero humano.**
- Conjugado Enzimático anti-HBsAg: **8,0ml Conjugado de anti-HBs (cobayo) y peroxidasa del rábano.**
- Solución de Lavado: **58ml Buffer salino fosfato y Tween 20**
- Reactivo Sustrato A: **Peróxido de hidrógeno y Buffer ácido cítrico**
- Reactivo Sustrato B: **3,3',5,5'- tetrametilbenzidina y DMSO**
- Solución de Parada: **Acido Sulfúrico, listo para usar.**

11. Técnica Microelisa "Human"

#### 4.3.3 Interpretación de Resultados<sup>11</sup>

**Positivo:** Muestras con valores de absorbancia mayores o iguales al Cut-off son consideradas positivas para HBsAg.

**Negativo:** Muestras con valores de absorbancia menores al Cut-off son consideradas negativas para HBsAg.

**Equivalente:** Muestras que se encuentren alrededor del +/- 10% el valor del Cut-off, se consideran como equivalentes.



## Características de la Ejecución

**Sensibilidad:** 100%

**Especificidad:** 99,6%

### 4.4 Método de Ensayo para la Determinación de Anticuerpos IgM frente al Antígeno Core del Virus de la Hepatitis B (HBc IgM) en Suero Humano

#### 4.4.1 Fundamento HBc IgM (General Biologicals)

“El análisis está basado en el principio de “Captura IgM” donde la IgM clase de anticuerpo en las muestras son primero capturadas por la fase sólida cubierta con anticuerpo anti hIgM.

Después de lavarse fuera de el resto de componentes de la muestra y en particular los anticuerpos IgG, el específico IgM capturado en la fase sólida es detectado por la adición de una preparación purificada de HBcAg recombinante etiquetada con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa.

Después de la incubación los micropocillos se lavan para retirar el conjugado desatado y entonces se agrega el substrato.

#### 11. Técnica Microelisa “Human”

En presencia de la peroxidasa el substrato descolorido se hidroliza a un producto final coloreado cuya densidad óptica se pueda detectar y la cantidad de anticuerpos IgM sea proporcional a HBcAg presentes en la muestra.”<sup>12</sup>

### 4.5 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgM FRENTE AL ANTÍGENO CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B (HBc IgM) EN SUERO HUMANO

#### 4.5.1 Calibración del Equipo

Se calibró el equipo de acuerdo a las especificaciones del set de Reactivos. Se lo realizó con dos blancos, tres controles negativos y dos controles positivos y se lee a una absorbancia de 450nm.

#### 4.5.2 Reactivos y Contenidos



- Tiras de Micropocillos: **Tiras de 8 micropocillos purificados con anticuerpo humano IgM**
- Anti-HBc. Solución de Peroxidasa: **5ml Peroxidasa conjugada en Buffer con estabilizador de proteínas.**
- IgM Anti-HBc Control Positivo: **1,5ml suero humano IgM Anti-HBc en Buffer con estabilizador de proteínas.**
- IgM Anti-HBc Control Negativo: **2ml suero humano normal con estabilizador de proteínas.**
- Diluyente de Muestra: **35ml Buffer con estabilizador de proteínas y Preservantes**
- Reactivo HBcAg: **5ml Antígeno Core de la Hepatitis B en Buffer.**
- Sustrato-Solución A: **10ml 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina en una base orgánica.**
- Sustrato-Solución B: **10ml Buffer Acido Cítrico y Peróxido de Hidrógeno.**
- Solución de Lavado: **50ml Buffer salino fosfato y Tween 20**
- Solución de Parada: **10ml Acido Sulfúrico 2N**

12. Técnica Microelisa "General Biologicals"

#### 4.5.3 Interpretación de Resultados <sup>12</sup>

**Positivo:** Muestras con valores de absorbancia mayores o iguales al Cut-off son consideradas positivas para IgM Anti-HBc.

**Negativo:** Muestras con valores de absorbancia menores al Cut-off son consideradas negativas para IgM Anti-HBc.

**Equivalente:** Muestras que se encuentren alrededor del +/- 10% el valor del Cut-off, se consideran equivalentes.

#### Características de la Ejecución

**Sensibilidad:** Alta

**Especificidad:** Alta

12. Técnica Microelisa "General Biologicals"



## **METODOLOGÍA DEL TRABAJO**

En este trabajo se realizó la investigación de dos de los nueve marcadores serológicos (Cap.III) existentes para Hepatitis B que son el Antígeno de Superficie (HBsAg) y el Anticuerpo IgM frente al Antígeno Core del Virus de la Hepatitis B los mismos que nos ayudan a determinar si se trata de una Infección reciente o pasada, Infección Crónica o Aguda y la presencia o ausencia del virus.(Tabla 1)

### **4.6 Muestreo**

El análisis se practicó con muestras de pacientes hepáticos posibles portadores del virus de la Hepatitis B, tomadas de diferentes Laboratorios Clínicos de la ciudad: Laboratorio “Colegio de Bioquímicos Farmacéuticos”, SINAILAB, Clínica Latinoamericana.

### **4.7 Tamaño de la Muestra**

40 Muestras Sanguíneas Aleatorias solicitadas por el médico; en pacientes que presentan síntomas gastrointestinales e ictericia. Se realizó una ficha de recolección de datos (ANEXO 1) para obtener los antecedentes socio-económicas como edad y sexo del paciente, zona de residencia, si asiste a lugares nocturnos, si utiliza protección, y si es que ha tenido antecedentes de hepatitis, para de esta manera analizar la intervención de estos factores en esta patología.

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de la Universidad de Cuenca mediante Microelisa para la detección de HBsAg y HBc IgM.

### **4.8 Toma de la Muestra**

La muestra fue tomada a los pacientes en ayunas, de la cual se obtiene el suero el mismo que fue almacenado a -20°C por dos meses en el laboratorio SINAILAB; para el transporte de las muestras se utilizó refrigerantes ya que las muestras podían ser descongeladas una sola vez.

## **CAPITULO V** **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se realizó un estudio serológico en 40 muestras (100%), procedentes de pacientes hepáticos mujeres y hombres con edades comprendidas entre los 20 –



50 años, que acudieron al laboratorio del Colegio de Bioquímicos, SINAILAB y Clínica Latinoamericana; a quienes se les determinó el Antígeno de Superficie (HBsAg) y el Anticuerpo IgM frente al Antígeno Core del Virus de la Hepatitis B en suero, con la finalidad de conocer si presentan una infección activa o pasada, infección aguda o crónica, mediante ELISA técnica sensible y específica.

A continuación se presentan los datos obtenidos en la práctica expresados como valores absolutos y se analizan los resultados, utilizando cuadros y gráficos para efectos de tabulación de datos estadísticos.

## 5.1 Antígeno de Superficie HBsAg

### 5.1.1 Obtención de Resultados

Los resultados se obtuvieron mediante la absorbancia de los controles y muestras para esto se utilizó un lector de micropocillos Elisa. Los resultados positivo o negativo de los pacientes se obtuvieron por comparación con el valor de punto de corte (Cut-off).

#### Cálculo del Punto de Corte Cut-off

$$\text{Cut-off} = \text{MNC} + 0.025$$

$$\begin{aligned} \text{MNC} &= \text{Media del Control Negativo} \\ \text{MNC} &= 0.004 \end{aligned}$$

$$\text{Cut-off} = 0.004 + 0.025 = 0.029$$

$$\text{Cut-off} = 0.029$$



**Tabla 4. Resultados Antígeno de Superficie (HBsAg)**

Identificación	Lectura	Resultado
Blanco	0.0	
Control Negativo	0.004	
Control Positivo	2.33	
SMP 01	0.001	NEG
SMP 02	0.006	NEG
SMP 03	0.003	NEG
SMP 04	0.003	NEG
SMP 05	0.016	NEG
SMP 06	0.002	NEG
SMP 07	0.0	NEG
SMP 08	0.002	NEG
SMP 09	0.003	NEG
SMP 10	0.0	NEG
SMP 11	0.004	NEG
SMP 12	0.001	NEG
SMP 13	0.005	NEG
SMP 14	0.006	NEG
SMP 15	0.007	NEG
SMP 16	0.006	NEG
SMP 17	0.012	NEG
SMP 18	0.006	NEG
SMP 19	0.004	NEG
SMP 20	0.004	NEG

Las lecturas de muestras de dan resultados

todos los negativos

Identificación	Lectura	Resultado
SMP 21	0.001	NEG
SMP 22	0.007	NEG
SMP 23	0.006	NEG
SMP 24	0.002	NEG
SMP 25	0.002	NEG
SMP 26	0.003	NEG
SMP 27	0.009	NEG
SMP 28	0.005	NEG
SMP 29	0.003	NEG
SMP 30	0.002	NEG
SMP 31	0.005	NEG
SMP 32	0.005	NEG
SMP 33	0.009	NEG
SMP 34	0.001	NEG
SMP 35	0.005	NEG
SMP 36	0.004	NEG
SMP 37	0.002	NEG
SMP 38	0.009	NEG
SMP 39	0.009	NEG
SMP 40	0.007	NEG

absorbancia de las laboratorios nos para HBsAg



### 5.1.2 Análisis de Resultados

La serie analítica se considera válida si cumple con los siguientes criterios:

**Tabla 5:** Medias Control Positivo y Negativo (HBsAg)

Condición Técnica	Práctica
<b>MNC &lt; 0.100</b>	<b>MNC = 0.004</b>
<b>MPC &gt;= 0.600</b>	<b>MPC = 2.33</b>

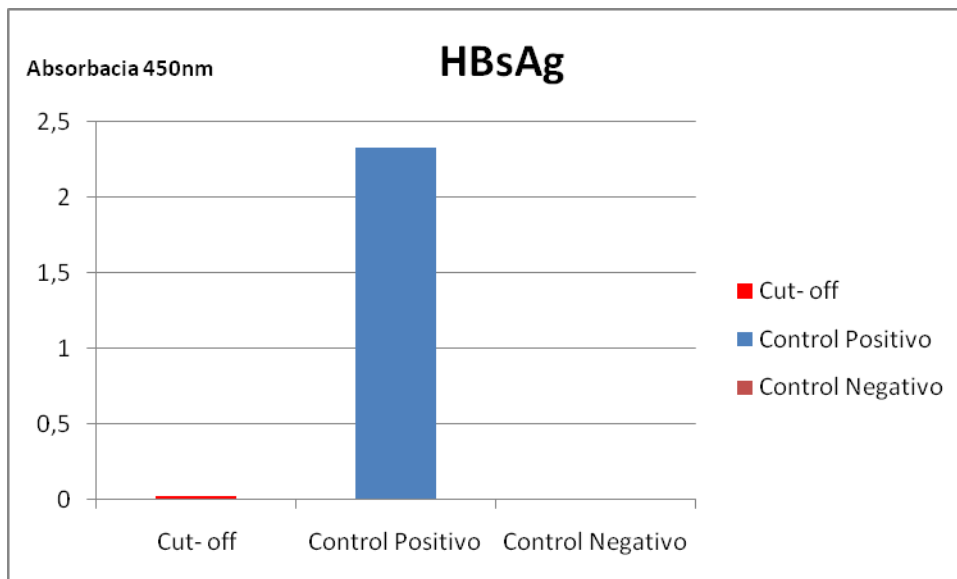
**MNC** = Media del Control

Negativo

**MPC** = Media del Control Positivo

La absorbancia a 450nm del control negativo es de 0.004 menor a 0.100 condición de la técnica y del control positivo es de 2.33 mayor a 0.600 cumpliendo con los criterios de validación de la técnica; como se puede observar en el gráfico 1.

**Gráfico 1:** Controles positivo y negativo con referencia al valor del cut-off.

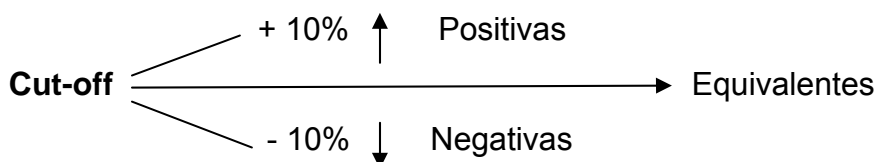






### 6.1.3 INTERPRETACIÓN DE HBsAg EN PACIENTES HEPÁTICOS

Las muestras analizadas se consideran Positivas, Negativas o Equivalentes de acuerdo al siguiente esquema:



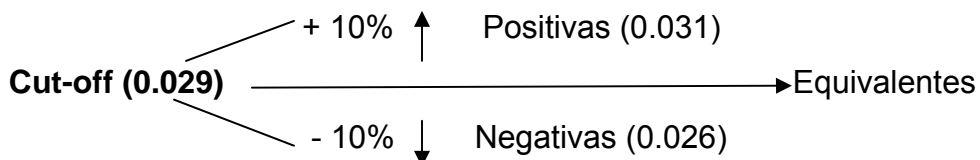
Son muestras **Positivas** aquellas cuyo valor de absorbancia se encuentran por encima del 10% con respecto al valor del cut-off.

Son muestras **Equivalentes** las que presentan un valor de absorbancia similar al cut-off.

Son muestras **Negativas** aquellas cuyo valor de absorbancia se encuentra por debajo del 10% con respecto al valor del cut-off.

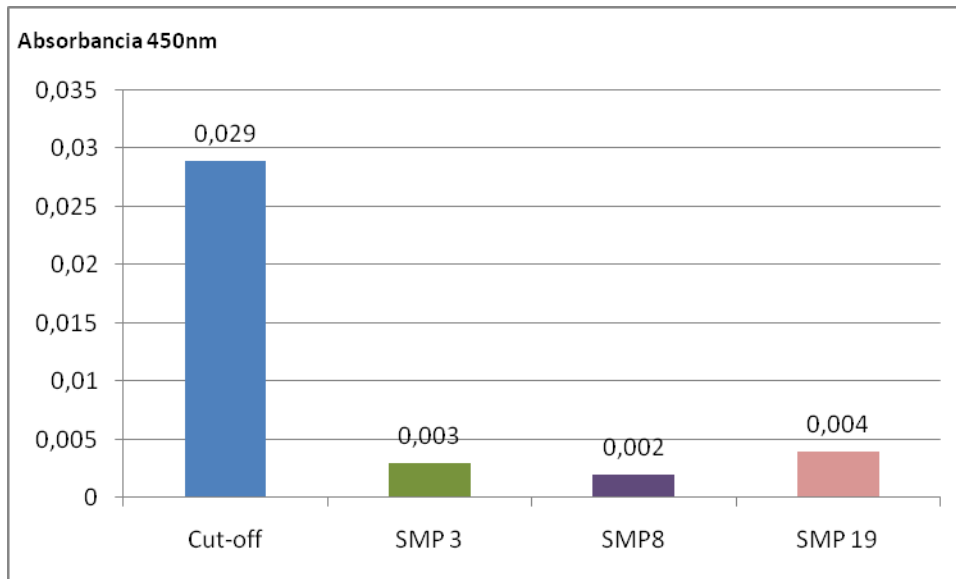
De acuerdo a la obtención de resultados las muestras se consideran **Negativas** para el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBsAg), ya que sus valores de absorbancia se encuentran por debajo del valor del Cut-off; como se puede observar en el siguiente ejemplo:

**Ejemplo:** Muestra # 33 presenta una absorbancia de **0,009**





**Gráfico 2: Muestras Negativas para HBsAg**



El gráfico 2 indica que del total de muestras analizadas (40), como se observa con las muestras 3, 8 y 19 que presentan valores de absorbancia de 0,003 – 0,002 y 0,004 respectivamente a 450nm se encuentran por debajo del valor de absorbancia del cut-off (0,029); razón por la cual las muestras analizadas son Negativas para HBsAg

El Antígeno de Superficie (HBsAg) es un marcador serológico detectable a partir de la cuarta semana de infección y es indicativo de la presencia del virus o de una Infección Aguda o Crónica (Tabla 1).

Al obtener resultados Negativos para HBsAg se presume que los pacientes quienes acudieron a los distintos laboratorios presentan: Ausencia de infección por el virus de la Hepatitis B (VHB), Resolución de la infección, Infección pasada, las mismas que se confirman con el análisis del Anticuerpo IgM frente al Antígeno Core (HBc IgM).



## 5.2. Anticuerpos IgM frente al Antígeno Core HBc IgM

### 5.2.1 Obtención de Resultados

Se determinó la absorbancia de los controles positivo y negativo como la de las muestras utilizando el lector de micropocillos Elisa. El valor de las muestras se comparó con el valor del punto de corte (Cut-off).

#### Cálculo del Punto de Corte Cut-off

$$\text{Cut-off} = \text{MNC} + (0,025 * \text{MPC})$$

MNC = Media del Control Negativo  
MPC = Media del Control Positivo

$$\text{Cut-off} = 0.228$$



**Tabla 6: Resultados Anticuerpo IgM frente al Antígeno Core (HBc IgM)**

Identificación	Lectura	Resultado
Blanco	0.0	
Control Negativo	0.028	
Control Positivo	0.79	
SMP 01	0.028	NEG
SMP 02	0.030	NEG
SMP 03	0.032	NEG
SMP 04	0.027	NEG
SMP 05	0.044	NEG
SMP 06	0.034	NEG
SMP 07	0.026	NEG
SMP 08	0.026	NEG
SMP 09	0.033	NEG
SMP 10	0.029	NEG
SMP 11	0.030	NEG
SMP 12	0.030	NEG
SMP 13	0.034	NEG
SMP 14	0.028	NEG
SMP 15	0.037	NEG
SMP 16	0.031	NEG
SMP 17	0.031	NEG
SMP 18	0.034	NEG
SMP 19	0.033	NEG
SMP 20	0.023	NEG

Las lecturas de  
muestras de  
resultados

todos los  
negativos

Identificación	Lectura	Resultado
SMP 21	0.028	NEG
SMP 22	0.026	NEG
SMP 23	0.029	NEG
SMP 24	0.022	NEG
SMP 25	0.022	NEG
SMP 26	0.028	NEG
SMP 27	0.026	NEG
SMP 28	0.033	NEG
SMP 29	0.031	NEG
SMP 30	0.027	NEG
SMP 31	0.027	NEG
SMP 32	0.028	NEG
SMP 33	0.022	NEG
SMP 34	0.031	NEG
SMP 35	0.038	NEG
SMP 36	0.035	NEG
SMP 37	0.023	NEG
SMP 38	0.025	NEG
SMP 39	0.032	NEG
SMP 40	0.031	NEG

absorbancia de las  
laboratorios indican  
para HBc IgM



### 5.2.2 Análisis de Resultados

La serie analítica se considera válida si cumplen con los siguientes criterios:

**Tabla 6:** Medias del Control Positivo y Negativo

Condición Técnica	Práctica
<b>MNC &lt; 0.1</b>	<b>MNC = 0.028</b>
<b>MPC &gt;= 0.4</b>	<b>MPC = 0.79</b>

**MNC** = Media del Control

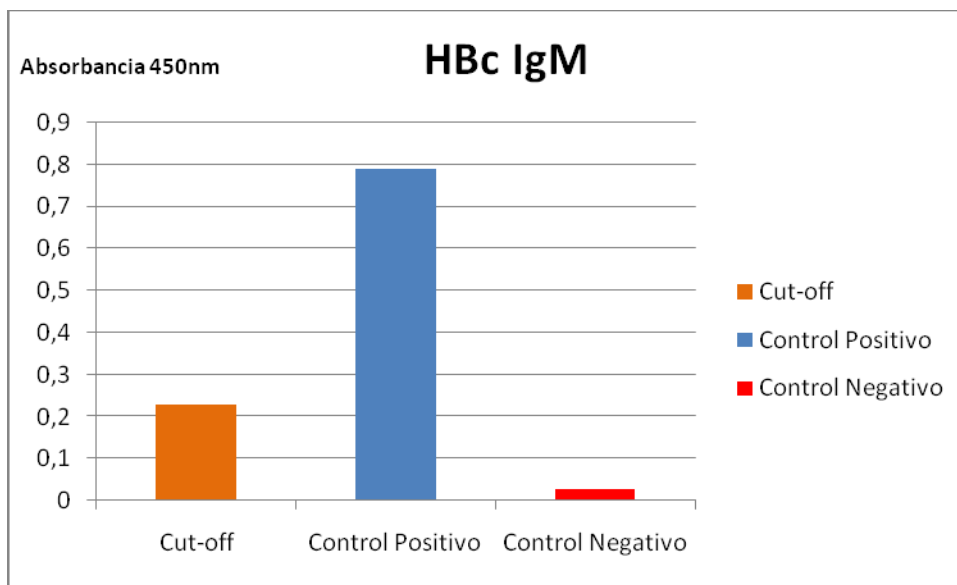
Negativo

**MPC** = Media del Control Positivo

Se observa que el valor de absorbancia a 450nm del Control Negativo es de 0.028 menor a 0.1 y la absorbancia del Control Positivo es de 0.79 mayor a 0.4 cumpliéndose con las condiciones de validación de la técnica.

**Gráfico 3:** Controles positivo y negativo

con respecto al valor del Cut-off

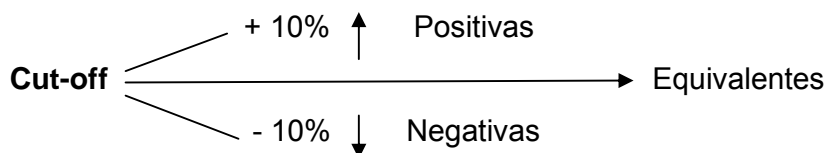


El gráfico 3 nos indica que se cumplen con las condiciones de validación de la técnica.



### 5.2.3 INTERPRETACIÓN DE HBc IgM EN PACIENTES HEPÁTICOS

Las muestras analizadas se consideran Positivas, Negativas o Equivalentes de acuerdo al siguiente esquema:



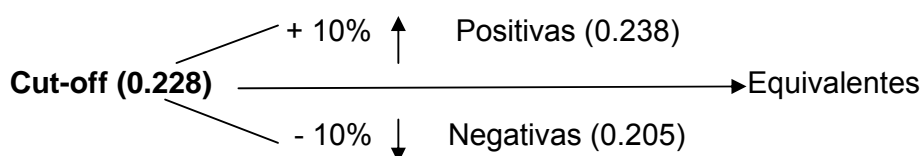
Son muestras **Positivas** aquellas cuyo valor de absorbancia se encuentran por encima del 10% con respecto al valor del cut-off.

Son muestras **Equivalentes** las que presentan un valor de absorbancia similar al cut-off.

Son muestras **Negativas** aquellas cuyo valor de absorbancia se encuentra por debajo del 10% con respecto al valor del cut-off.

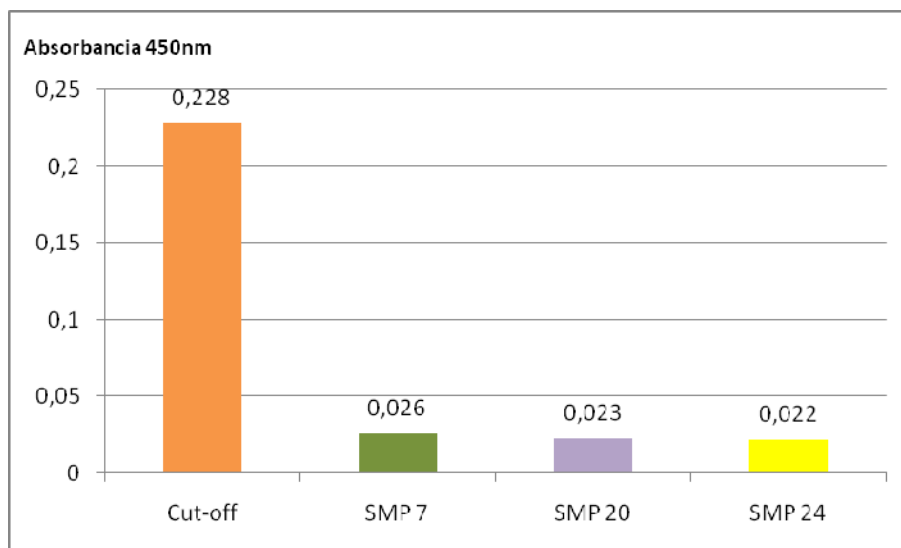
De acuerdo a la obtención de resultados las muestras se consideran **Negativas** para el Anticuerpo IgM frente al Antígeno Core (HBc IgM), ya que sus valores de absorbancia se encuentran por debajo del valor del Cut-off; como se puede observar en el siguiente ejemplo:

**Ejemplo:** Muestra # 27 presenta una absorbancia de 0,026



Las muestras se consideran Negativas para HBc IgM, ya que sus valores de absorbancia se encuentran por debajo del valor del Cut-off.

**Gráfico 4:** Muestras Negativas para HBc IgM con respecto al valor del Cut-off



El gráfico 4 indica que de un total de muestras analizadas (40) como se observa con las muestras 7, 20 y 24 con valores de absorbancia de 0,026 – 0,023 y 0,022 a 450nm se encuentran por debajo del valor de absorbancia del cut-off (0,228) por lo que las muestras analizadas son negativas para los anticuerpos IgM frente al antígeno core (HBc IgM).

El Anticuerpo IgM frente al Antígeno Core de la Hepatitis B (HBc IgM) es el primer anticuerpo que aparece tras la infección, siendo detectable con los primeros síntomas de la enfermedad aguda; acompaña siempre al HBsAg durante su persistencia, en una infección crónica sus títulos pueden estar cercanos al cut-off.

Como los resultados son Negativos para este marcador se tiene la posibilidad de que los pacientes estudiados presentaban una infección pasada y que no se detecta por perderse los estímulos antigénicos (Cap. III) y se descarta de que se trate de una infección aguda.

### **5.3 ANALISIS DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE (HBsAg) Y DEL ANTICUERPO IgM FRENTE AL ANTÍGENO Core (HBc IgM) DE LA HEPATITIS B**

Se realizó el análisis de los dos marcadores serológicos HBsAg y HBc IgM por la utilidad de estos en el diagnóstico de los pacientes ya que estos nos indican la presencia de Hepatitis B la misma que puede ser aguda o crónica.

En la siguiente tabla se puede observar distintos criterios serológicos que ayudan en el diagnóstico.



**Tabla 7:** ESQUEMA DE DIAGNÓSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS MARCADORES

	Marcador Serológico		Interpretación
	HBsAg	anti HBcIgM	
<b>Perfil de Diagnóstico</b>	+	+	VHB
	+	+	Hepatitis Aguda
	+	-	Portador Sano
	+	-	Hepatitis Crónica
	+	+/-	Hepatitis Crónica Replicativa
	-	+/-	Hepatitis Pasada Reciente
	-	-	Hepatitis Pasada Distinta VHA-VHC
	-	-	Vacunación Reciente

En esta investigación al obtener resultados negativos para los dos marcadores serológicos se presume que en los pacientes estudiados de los distintos laboratorios Colegio de Bioquímicos, SINAILAB, Clínica Latinoamericana nunca estuvo presente el virus, presentaron una infección pasada reciente o distinta como una infección por Hepatitis A o Hepatitis C o tuvieron una vacunación reciente.

Estos resultados nos indican también de que existe un mayor conocimiento de las causas y consecuencias que trae consigo esta patología y por el uso de vacunas.





## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La negatividad del HBsAg en las muestras analizadas indica la ausencia del virus de la Hepatitis B, en el grupo de pacientes estudiados; por ser este un marcador detectable a partir de la cuarta semana de infección.
2. La negatividad del HBc IgM indica que los pacientes estudiados no han pasado por una infección reciente ya que este es detectable hasta 12 meses y se descarta infección aguda.
3. Los pacientes estudiados quienes acudieron a los distintos laboratorios no presentan Hepatitis B al ser analizados dos marcadores serológicos importantes en el diagnóstico de esta patología.
4. Con la determinación de los marcadores serológicos HBsAg / HBc IgM se concluye que: el virus (VHB) nunca estuvo presente existiendo la posibilidad de infección por otro virus causante de daño hepático, infección con el Virus de la Hepatitis B pasada, o tuvieron una inmunización reciente.
5. La técnica de Microelisa, utilizada en la práctica de esta investigación tiene una sensibilidad y especificidad alta, obteniendo resultados confiables, para seguridad plena de los pacientes y profesionales que emplean esta técnica; por lo que los resultados obtenidos son 100% confiables, puesto que cumplen con las condiciones requeridas por cada una de las técnicas empleadas.

### RECOMENDACIONES

- Debido a la importancia que tiene el diagnóstico de la Hepatitis B en la actualidad, por los riesgos y consecuencias que produce, y al ser



una enfermedad sistémica se recomienda la vigilancia y el control médico oportuno. De esta manera la transmisión del virus disminuirá y la incidencia será nula.

- Es necesario continuar con la investigación de esta patología ya que presenta varios Marcadores Serológicos en sus diferentes fases de la infección, aportando con la comunidad médica en un diagnóstico más profundo y esto debido a que en esta investigación fueron analizados dos de los nueve marcadores serológicos.
- Instituciones del Ministerio e Instituciones Privadas de Salud tienen la tarea de instruir a la población con medidas profilácticas para reducir las posibilidades de infección, para lo cual se deben tomar medidas preventivas, las mismas que también son de responsabilidad de las familias y de las Instituciones Educativas:
- Al ser una patología que se transmite principalmente por Vía Sexual, se debe establecer programas de Educación Sexual en los distintos niveles educativos y que de esta manera la población tome consciencia sobre las causas que trae consigo.

Se recomienda emplear la técnica de Microelisa ya que garantiza resultados confiables por su alta sensibilidad y especificidad; además porque es una técnica fácil pero que necesita de mucha precisión.



### Bibliografía

1. Diccionario de Medicina Océano Uno, Editorial Océano, Cuarta Edición, Barcelona-España, 1994
2. Epidemiología en el Ecuador. Disponible en:  
<http://www.ministeriodesalud.com.ec> [20/11/2009]
3. Estructuras Virus. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo> [14/10/2009]
4. FARRERAS, “Medicina Interna”, Editorial Interamericana, Décimo quinta Edición, Barcelona-España, 2002
5. FATTORUSSO V, “Vademécum Clínico”, Editorial El Ateneo, Quinta Edición, Argentina, 2001
6. FRANCO Felipe, SIERRA Fernando, “Gastroenterología y Hepatología”, Editorial Interamericana, Quinta Edición, Colombia, 2004
7. Hepatitis Aguda. Disponible en:  
<http://www.paho.org/spanish/sha/hepatitisaguda> [10/10/2009]
8. JAWETZ, MELNINCK, ADELBERG, “Microbiología Médica”, Editorial El manual moderno, Décimo séptima Edición, Bogotá, 2002
9. Replicación Virus Hepatitis B. Disponible en:  
<http://www.google.imagenes.com> [20/01/2010]
10. Técnicas Inmunológicas. Microelisa. Disponible en:  
<http://www.monografias.com/trabajos11/microeli/.shtml> [20/01/2010]
11. Técnica Microelisa “Human” REF: 51048
12. Técnica Microelisa “General Biologicals” REF: 00876



**ANEXOS**

**Anexo 1.**

**FICHA DE DATOS DE LOS PACIENTES**

**Datos Personales:**

**Edad:** .....

**Sexo:** .....

**# Muestra:** .....

**ANTECEDENTES SOCIO-ECONÓMICOS**

Residencia

Zona Urbana .....

Zona Rural .....

Asiste a lugares Nocturnos

SI ..... NO .....

Frecuencia .....

Utiliza Protección: SI ..... NO .....

Presenta algún tipo de Adicción

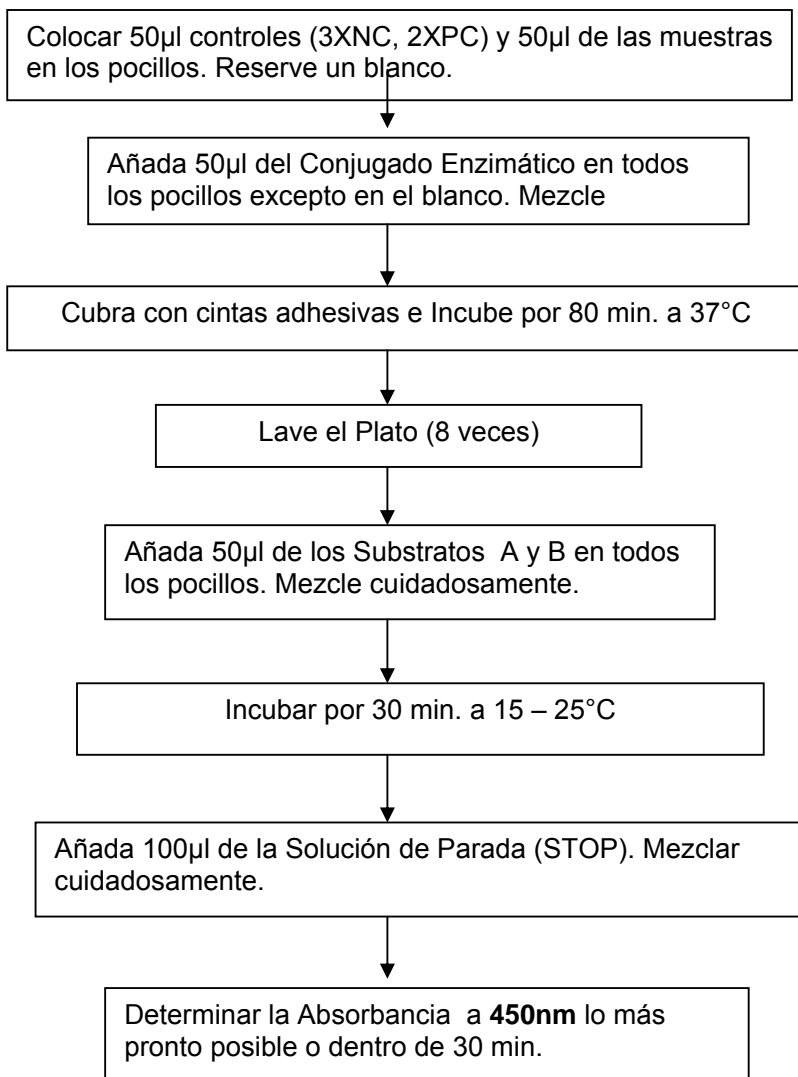
SI ..... NO .....

**Antecedentes de Hepatitis**

.....  
.....

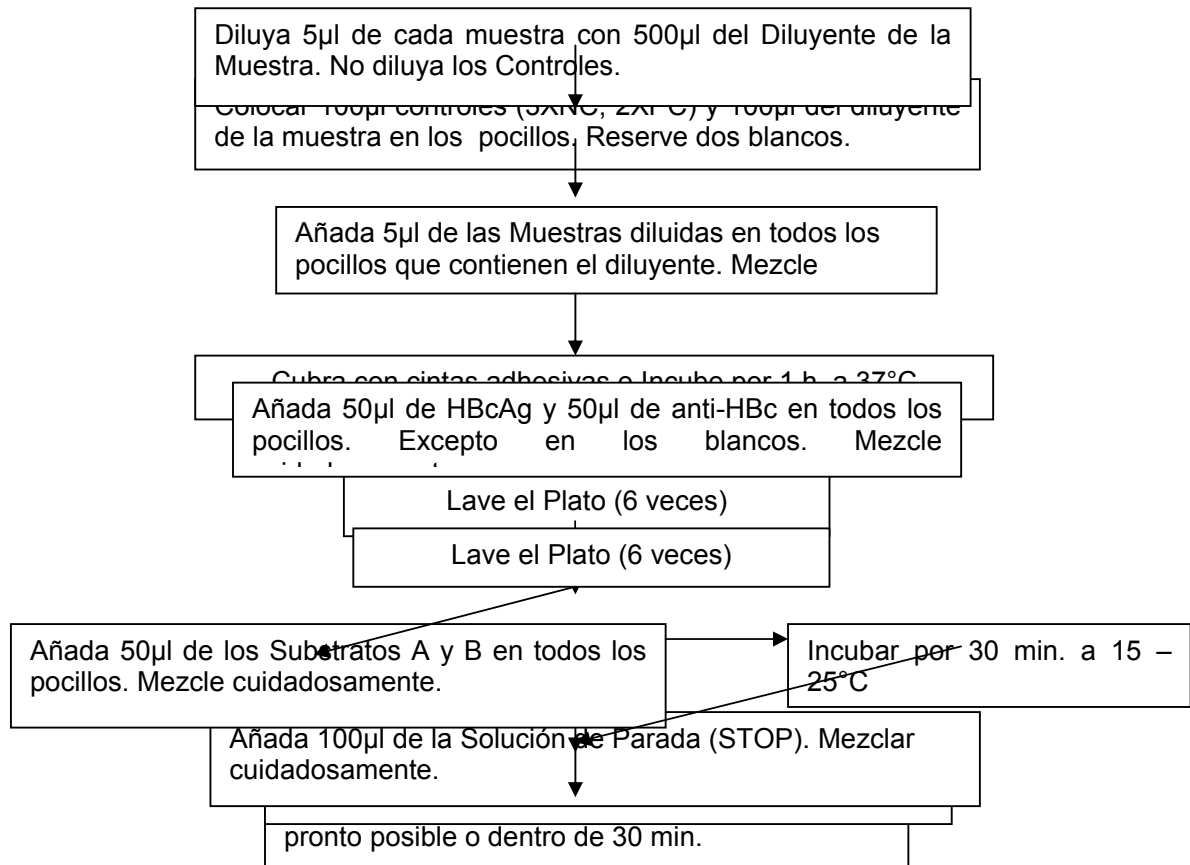


**Anexo 2.**  
**Técnica HBsAg (Human)**





**Anexo 3.**  
**Técnica HBc IgM (General Biologicals)**





**Anexo 4.**  
**TABLA 1**  
**ESQUEMA DE DIAGNOSTICO E INTERPRETACION DE LOS MARCADORES MAS FRECUENTES**

**MARCADORES EN PRESENCIA DE CLINICA DE HEPATITIS AGUDA\***

PERFIL DE DIAGNÓSTICO	HAV	HBV		HCV	INTERPRETACION HEPATITIS AGUDA POR
	Anti-HAV IgM	HBsAg	Anti-HBc IgM	Anti-HCV	
	+	-	-	-	HAV
	-	-	-	+	HCV
	-	-	-	-	Posible HCV** ó NANBNC
	-	+	+	-	HBV

\* La combinación de positividades de estos marcadores hará el diagnóstico de infecciones mixtas.

Dado que la seroconversión puede retrasarse es conveniente repetir este marcador

\*\* pasados 30/45 días.

**TABLA 2**  
**CUALIFICACION DE HEPATITIS B AGUDA (con anti-HBc IgM (+))**  
Menos de 6 meses de evolución

PERFIL DE CUALIFICACION* Hepatitis B y D**	HBsAg	Anti-HBc	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HDV	INTERPRETACION
		+	+	+	-	
	+	+	-	+	-	Baja replicación viral. Posiblemente buena evolución
	+	+	-	-	-	Baja replicación viral Buena evolución***
	+	+	+/-	+/-	+	Confección Delta



**TABLA 3**  
**HEPATITIS B DE EVOLUCION CRONICA**  
Más de 6 meses con HBsAg (+) y anti-HBc (+)

<b>PERFIL DE CUALIFICACION Hepatitis B</b>	<b>HBeAg</b>	<b>Anti-HBe</b>	<b>HBV-DNA*</b>	<b>INTERPRETACION</b>
	+	-	+	Replicación viral
	+	-	-	No replicación viral Posible seroconversión a anti-HBe en poco tiempo
	-	+	+	Replicación viral Infección por variante pre-core menos. Generalmente mala evolución
	-	+	-	Portador asintomático
	-	-	-	Portador asintomático

**Anexo 5.**  
**CRITERIOS DE VALIDACIÓN**  
**TÉCNICA HBsAG (HUMAN)**

La serie analítica se considera válida si se cumple con los siguientes criterios:

<b>1. Color en A1: incolor o ligeramente amarillo, sino la prueba está inválida y debe repetirse.</b>
<b>2. MNC &lt; 0,100</b>
<b>3. MPC ≥ 0,600</b>
<b>4. MPC – MNC ≥ 0,50</b>
<b>5. Punto de Corte (Cut-off) = MNC + 0,025</b>

MNC = Media del Control Negativo  
MPC= Media del Control Positivo





### TÉCNICA HBc IgM (GENERAL BIOLOGICALS)

<b>1. Color en el blanco A1: incolor o ligeramente amarillo, sino la prueba está inválida y debe repetirse.</b>
<b>2. <math>MNC \leq 0,1</math></b>
<b>3. <math>MPC \geq 0,4</math></b>
<b>4. <math>MPC - MNC \geq 0,3</math></b>
<b>5. Punto de Corte (Cut-off) = <math>MNC + (0,025 * MPC)</math></b>

MNC = Media del Control Negativo

MPC= Media del Control Positivo