



# HEPATITIS VIRALES

## MANUAL DE LABORATORIO

Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales  
Servicio Hepatitis y Gastroenteritis  
Departamento Virología  
Laboratorio Nacional de Referencia  
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas  
A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán"

Octubre 2000  
Segunda Edición

**SERVICIO HEPATITIS Y GASTROENTERITIS**

**DEPARTAMENTO VIROLOGIA**

**Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)**

**Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán"**

**PERSONAL PROFESIONAL Y TECNICO**

- Dr. JORGE ENRIQUE GONZALEZ
- Dra. SARA NOEMI VLADIMIRSKY
- Dra. MARIA SILVINA MUNNE
- Sr. LUCIO OSCAR OTEGUI
- Sr. RAUL ENRIQUE CASTRO
- Sr. LEONARDO SERGIO BRAJTERMAN
- Srta. SONIA SOLEDAD SOTO

**TE / FAX (011) 4302 5064  
4301 7428**

**E mail : [jegonzalez@anlis.gov.ar](mailto:jegonzalez@anlis.gov.ar)**

## Indice

VIRUS DE HEPATITIS A (HAV) .....	6
1.- AGENTE ETIOLOGICO.....	6
2.- ASPECTOS CLINICOS .....	6
3.- EPIDEMIOLOGIA.....	6
4.-DIAGNOSTICO VIROLOGICO .....	6
5.- RESPUESTA INMUNE.....	7
6.- MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACION .....	8
VIRUS DE HEPATITIS B (HBV).....	9
1.-Agente etiológico.....	9
2. - ASPECTOS CLINICOS .....	9
3.-EPIDEMIOLOGÍA.....	9
4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO .....	10
Gráfico 1: Marcadores de una Hepatitis B aguda.....	11
Gráfico 2: Marcadores de una Hepatitis B crónica.....	11
Gráfico 3: Hepatitis crónica B con seroconversión tardía de sistema "e" .....	11
5.- MEDIDAS DE CONTROL.....	12
VIRUS DE HEPATITIS C (HCV) .....	13
1.-AGENTE ETIOLOGICO.....	13
2.-ASPECTOS CLINICOS .....	13
3.-EPIDEMIOLOGIA.....	13
4.-DIAGNOSTICO VIROLOGICO .....	13
5.- MEDIDAS DE CONTROL.....	13
6.-MARCADORES CON VALOR PRONOSTICO EN INFECCION POR HCV .....	14
Gráfico 1: Marcadores de una Hepatitis C .....	14
VIRUS DE HEPATITIS D (DELTA) (HDV).....	15
1.- AGENTE ETIOLOGICO.....	15
2.- ASPECTOS CLINICOS .....	15
3.- EPIDEMIOLOGIA.....	15
4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO .....	15
5.- MEDIDAS DE CONTROL.....	15
Gráfico 1: Marcadores de HDV.....	15
VIRUS DE HEPATITIS E (HEV).....	16
1.- AGENTE ETIOLOGICO.....	16
2.- ASPECTOS CLINICOS .....	16
3.- EPIDEMIOLOGIA.....	16
4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO .....	16
5.- MEDIDAS DE CONTROL.....	16
Gráfico 1: Marcadores de la Hepatitis E .....	16
HEPATITIS No-A No-B No-C.....	17
APENDICE DE NOMENCLATURA DE MARCADORES SEROLOGICOS.....	18
TABLA 1.Historia de la ictericia y de las Hepatitis virales._Descub V Hepat Humanos. ....	19
TABLA 2. Taxonomía viral, Genotipos y Serotipos de los Virus Hepatotrópicos Humanos. ....	19
TABLA 3. Propiedades de los Viriones de los Virus Hepatotrópicos Humanos. ....	19
TABLA 4. Propiedades de los Genomas de los Virus Hepatotrópicos Humanos. ....	20
TABLA 5. Propiedades Biológicas de los Virus Hepatotrópicos Humanos.....	20
2. - PAUTAS GENERALES DE PROCEDIMIENTO .....	21
2.1. - OBTENCION DE MUESTRAS PARA ESTUDIO SEROLOGICOS.....	21

2.2. - ALGORITMO EST MARC VIR PAC C/CUADR COMP C/HEPATITIS V AGUDA (ADULTOS).	22
2.3. - ALGORITMO EST MARC VIR PAC PEDIATR C/CUADR COMP C/HEPATITIS VIRAL AGUDA.	22
3.- FUNDAMENTOS Y TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE HEPATITIS VIRALES	23
3.1.- METODOS SEROLOGICOS	23
3.1.1.- DETECCION DE Ac. ESPECIFICOS CONTRA HAV CLASE IgG. (antiHAV-IgG)	24
3.1.2.-DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA HAV CLASE IgM. (antiHAV-IgM)	25
3.1.3.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag CORE DEL HBV. (antiHBc)	26
3.1.4.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag CORE DEL HBV CLASE IgM (antiHBc-IgM)	27
3.1.5.- DETECCION DE Ag DE SUPERFICIE DEL HBV	27
3.1.6 DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag DE SUPERFICIE DEL HBV. (antiHBs)	28
3.1.7.- DETECCION DE Ag e (HBeAg) DEL HBV. (comercial)	28
3.1.8.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag e DEL HBV. (antiHBe) (comercial)	29
3.1.9.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL HDV (antiHDV) (comercial)	29
3.1.10.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL HCV (antiHCV) (clase IgG)	29
3.1.11.- DETECCION DE Ac CONTRA EL HCV (clase IgG)	29
METODOS SUPLEMENTARIOS.	29
3.2.-BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO.	30
3.2.1 - Detección de HCV RNA por RT-nested PCR	30
3.2.2.- DETECCION DE HBV DNA POR HIBRIDIZACION MOLECULAR.	30
3.2.3.- OTRAS MET. MOLEC. APLICADAS AL DIAG. DE LAS HEPATITIS VIRALES.	31
METODOS DE AMPLIFICACION PARA LA DETECCION DE HCV-RNA.	32
METODOS PARA GENOTIPIFICAR EL HCV.	33
4.-PREVENCION Y VACUNACION	34
4.1.- MEDIDAS DE PREVENCION PARA HEPATITIS B y C.	34
4.1.1.- NORMAS PARA EL RESERVORIO (PORTADOR CRONICO).	34
4.1.2.- NORMAS A NIVEL VIAS DE TRANSMISION.	34
4.1.3.- PERSONAS CON RIESGO INCREMENTADO DE INFECCION.	36
4.2.-TAMIZAJE DE LAS EMBARAZADAS EN EL TERCER TRIMESTRE	36
4.3.- PREVENCION DE LA TRANSMISION PERINATAL DE HEPATITIS B.	36
4.4.- VACUNACION CONTRA HBV	37
4.4.1.- TAMIZAJE PRE-VACUNACION	37
4.4.2.- CONDICIONES DE ESTABILIDAD DE LA VACUNA	37
4.4.3.- REGISTRO DE VACUNACION.	37
5.- TRATAMIENTO	38
5.1 HEPATITIS CRONICA B:	38
5.2.- HEPATITIS CRONICA C:	38
6.- GARANTIA DE CALIDAD Y EVALUACION DEL CONTROL DE CALIDAD	40
Control interno y curvas de control	40
Control externo	41
7.- GUIA DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA	43
7.1- MECANISMOS COMUNES DE CONTAGIO	43
7.2.-MEDIDAS DE SEGURIDAD Y/O PREVENCION DE ACCIDENTES	43
TABLA 1	47
TABLA 2	48
ANEXO I	50
ANEXO II	51
ANEXO III	52
Bibliografía	53

## INTRODUCCION

Los virus reconocidamente hepatotropos más importantes descritos hasta el presente son: virus de hepatitis A (HAV), virus de hepatitis B (HBV), virus de hepatitis C (HCV), virus de hepatitis D (HDV) y virus de hepatitis E (HEV). Cabría agregar a esta lista los virus aún no descritos, pero con fuertes evidencias clínicas y experimentales de su existencia, englobados con el nombre genérico de virus de Hepatitis NoA-NoE (NA EV) ó virus de hepatitis X (HXV).

Existen además, otros virus causantes de cuadros clínicos de hepatitis, si bien ésta no es la patología más importante que producen. (virus causantes de fiebres hemorrágicas, rubéola, sarampión, etc.).

También debe mencionarse el virus de Epstein Barr (EBV) y el Citomegalovirus (CMV), en la producción de un cuadro clínico de hepatitis, como así también el Herpes Simplex (HSV), sobre todo en neonatos.

Es importante destacar que la evolución clínica de las hepatitis será diferente para cada individuo. Esto se debe a la naturaleza propia de los virus, parásitos intracelulares obligados. Por lo tanto, la evolución dependerá de la relación que se establezca entre los mecanismos patogénicos del virus y la respuesta inmune del huésped.

### VIRUS de HEPATITIS.

ENFERMEDAD AGUDA	HAV
	HEV
	Hepatitis F ? (tentativo)
ENFERMEDAD AGUDA Y CRONICA (HCC)	HBV.....HDV.
	HCV
HGV / HGBV (A; B; C) // TTV // SEN-V ??????	

## VIRUS DE HEPATITIS A (HAV)

### 1.- AGENTE ETIOLOGICO

Desde su descripción se lo relacionó por sus características fisicoquímicas y biológicas con el género Enterovirus perteneciente a la familia Picornaviridae, designándose como Enterovirus tipo 72. Sin embargo, estudios genómicos, fisicoquímicos, biológicos y de respuesta inmune han permitido diferenciarlo de los integrantes del género Enterovirus. Por ese motivo se creó el género Heparnavirus, siendo HAV, hasta el momento su único miembro.

El virus de la hepatitis A (HAV) es un virus pequeño, desnudo y de simetría icosaédrica, su virión mide entre 27-32 nm. Con el microscopio electrónico pueden observarse partículas vacías y llenas.

El virión está constituido por una cadena lineal de RNA de simple cadena y polaridad (+) de aproximadamente 7.500 nucleótidos. La cápside que lo contiene está formada por 4 proteínas, VP1, VP2, VP3 y VP4 con características similares a las de los otros miembros de la familia.

### 2.- ASPECTOS CLINICOS

La hepatitis por el virus A es una enfermedad benigna, autolimitada y sin evolución a la cronicidad. Si bien se han descrito casos de hepatitis persistentes con un curso prolongado de hasta un año, es una enfermedad que no deja secuelas y confiere una inmunidad de por vida.

El tiempo de incubación oscila entre 2 y 6 semanas y el cuadro agudo en los casos sintomáticos, es de aparición abrupta y caracterizado por un marcado ascenso del nivel de actividad de transaminasas, con ó sin ictericia, anorexia, inclusive con náuseas y vómitos, y en algunos casos, fiebre, hipocolia y astenia.

### 3.- EPIDEMIOLOGIA

La hepatitis por virus A es endémica en casi todo el mundo y una de las características de la enfermedad es presentarse en forma de epidemia o brotes aislados. Esto generalmente ocurre en el período otoño-invierno y está relacionado con su

forma de transmisión. La principal vía es la fecal-oral y, por lo tanto, su epidemiología está relacionada directamente con las condiciones higiénico-sanitarias de la población.

Estas características determinan que su incidencia varíe de región a región en un mismo país y entre países con distinto grado de desarrollo. La hepatitis por virus A es una infección entérica y su diseminación se debe a la excreción de virus en materia fecal por el individuo infectado, en la última etapa del período de incubación.

Esta virocupria tiene su máxima expresión generalmente entre 5 a 10 días antes de la aparición de síntomas clínicos de enfermedad, aunque en algunos casos se ha detectado hasta 2-3 semanas antes, y se extiende hasta 5-7 días luego de la aparición de la ictericia o elevación del nivel de actividad de transaminasas (utilizando técnicas de detección más sensibles es más prolongado). Esta característica tiene importancia epidemiológica-sanitaria ya que constituye el período de mayor contagio y la infección no se hace evidente hasta la aparición de síntomas.

En zonas endémicas, los individuos se infectan en los primeros años de vida, constituyendo una enfermedad de la primera y segunda infancia y/o adolescencia y rara vez de adultos. De manera que generalmente en estas comunidades la prevalencia de anticuerpos específicos, en adultos, alcanzan cifras superiores al 80%.

Cabe destacar que generalmente un 60-70% de los pacientes son asintomáticos cuando la infección se produce en los primeros años de vida, en cambio en adolescentes y/o adultos jóvenes, el 90% ó más son formas ictéricas y con sintomatología importante.

La mortalidad es menor al 0.1% de los casos y generalmente asociada a otras patologías o desórdenes metabólicos, en su mayoría en neonatos y niños de corta edad.

### 4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO

Puede hacerse por métodos directos ó indirectos; el primero se basa en la detección de virus en materia fecal (inmunomicroscopía electrónica, hoy en desuso, RIE y ELISA para antígenos) y el

segundo en la detección de los anticuerpos específicos contra el virus, originados en la respuesta inmune humoral del individuo infectado.

Los métodos serológicos son apropiados para confirmar un diagnóstico ya que mediante la detección de anticuerpos específicos de clase IgM, se puede determinar eficazmente una infección en su etapa aguda. Los niveles detectables con las técnicas utilizadas (RIE y EIE) se extienden por 3 ó 4 meses aproximadamente, de acuerdo a la sensibilidad de las mismas, aunque dependerá fundamentalmente de la respuesta del sistema inmune del individuo afectado. A los 15 ó 20 días del inicio del cuadro clínico comienzan a elevarse también los títulos de anticuerpos específicos de clase IgG (antiHAV-IgG) que permanecerán detectables prácticamente de por vida,

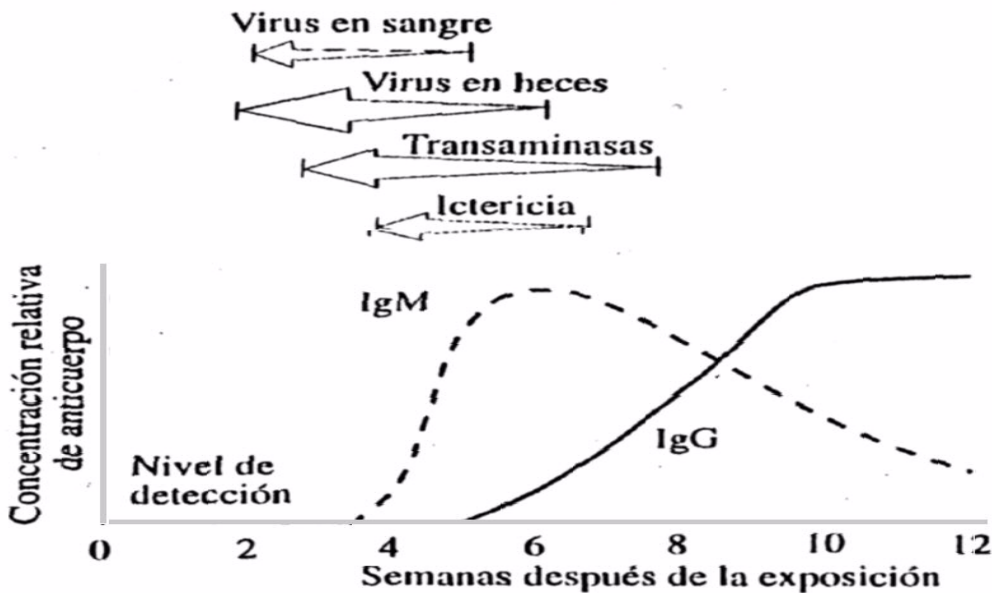
constituyendo la cicatriz inmunológica de la infección.

## 5.- RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune del huésped, que en definitiva es la que contribuye en mayor medida a la patogénesis de la hepatitis causada por este virus, es importante tanto a nivel humoral como a nivel celular.

Si bien numerosas evidencias demuestran altos títulos de anticuerpos tanto de clase IgM primero y clase IgG luego, así como también la presencia de inmunocomplejos y niveles disminuidos de complemento en un cuadro agudo, los estudios realizados in vitro fundamentalmente, indicarían que la respuesta inmune celular es el principal mecanismo involucrado en la patología hepática

Gráfico 1: Marcadores de una hepatitis A



## 6.- MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACION

Por el tipo de transmisión del virus en el individuo infectado, son más importantes las medidas higiénico-sanitarias en el control de la diseminación de la enfermedad, en un brote o epidemia, que la administración indiscriminada de gammaglobulina normal (NIg), alternativa ampliamente difundida en estos casos.

Estas medidas comprenden: el aislamiento de los casos sintomáticos, el seguimiento de los contactos más cercanos, el frecuente lavado de manos, sobre todo luego de usar los baños (inclusive con cepillo para uñas, fundamentalmente en niños), la correcta limpieza de los baños con hipoclorito de sodio (lavandina) y principalmente revisar la potabilidad del agua.

### Inmunización Pasiva:

Se logra mediante la administración de gammaglobulina normal (NIg) ya que esta posee anticuerpos específicos contra el HAV en cantidad suficiente (aproximadamente 100 UI/ml) como para proteger a un individuo, si es utilizada pre-exposición (nivel mínimo protector 10 mUI/ml). Dos dosis separadas por 30 días, en concentración que dependerá del peso del individuo a inmunizar, confieren inmunidad por aproximadamente 3 meses.

Mayores dosis pueden prolongar este período, pero no dan mayor protección. Su eficacia post-exposición es limitada, si bien se ha determinado que, dependiendo del período transcurrido una vez ocurrido el contagio, se consigue atenuar la sintomatología o suprimirla aunque no se logre evitar la seroconversión. Obviamente cuanto más temprana sea su aplicación mejores resultados se obtendrán. De todas maneras son muy pocas las situaciones en que se indica su utilización post-exposición. Ellas son: contactos personales muy estrechos (convivientes, parejas), personal de guarderías, contactos estrechos en instituciones de tiempo completo, aquellas personas que por su trabajo deben manipular alimentos para ser consumidos sin cocción y/o agua.

A su vez éstas y otras situaciones de contacto deben ser muy bien evaluadas en cuanto a riesgo de infección, de acuerdo con lo descrito en epidemiología y vías de transmisión.

### Inmunización Activa:

Se encuentra disponible la vacuna contra este virus. Es una vacuna a virus inactivado, con excelente nivel de respuesta, cuando es administrada en la zona deltoidea tanto en niños como en adultos, en sus dos formas pediátrica y adulta.

Por ser una vacuna de respuesta dosis-dependiente, los esquemas de inmunización varían de acuerdo a la concentración de la dosis aplicada. Pueden ser tres dosis a tiempo 0, 1 y 6 meses; ó 2 dosis con un intervalo de 6 ó 12 meses, para las formas más concentradas.

El nivel de anticuerpos alcanzado y su duración, son muy superiores a los que se logra con la administración de gammaglobulina standard o normal (NIg).

## VIRUS DE HEPATITIS B (HBV)

### 1.-AGENTE ETIOLÓGICO

El HBV presenta un virión de forma esférica de aproximadamente 42 nm de diámetro al que se denomina partícula de Dane. Presenta además una estructura interna electrónicamente densa de aproximadamente 27 nm de diámetro, denominada "core", constituyendo la nucleocápside que contiene el genoma DNA de doble cadena incompleta.

Posee cuatro antígenos que producen respuesta inmune en el individuo infectado : el antígeno de superficie (HBsAg), conocido antiguamente como antígeno australiano, el antígeno "core" (HBcAg), el antígeno "e" (HBeAg) nucleoproteína derivada del HBcAg y la proteína X, cuya función es motivo de fuertes controversias hasta el momento, aunque se la asocia a una función regulatoria.

Por su características se lo clasifica como miembro de la familia Hepadnaviridae, siendo el único miembro conocido que infecta al hombre, si bien al presente se han reconocido otros cuatro virus que infectan animales (mamíferos y aves) que comparten características únicas que dieron origen a esta familia.

### 2.- ASPECTOS CLINICOS

Presenta toda la gama de cuadros clínicos posibles en una infección viral. Desde los individuos que son refractarios a la infección hasta aquellos que hacen una hepatitis fulminante y mueren por falla hepática aguda con una necrosis masiva de hígado.

Si bien en adultos el 90% de las hepatitis por este virus tienen resolución clínica e inmune, existe un porcentaje que oscila entre el 10 y el 12% de los casos que evolucionan a la cronicidad, con distintas características y pronóstico final, en su mayoría, de cirrosis y en menor proporción, de cáncer de hígado.

Los distintos pronósticos, una vez producida la infección, están relacionados con la calidad de la respuesta inmune del huésped y la evolución a la cronicidad está relacionada fundamentalmente con una falla en la respuesta inmune celular.

El tiempo de incubación es variable, de 6 semanas hasta 6 meses y la presentación del cuadro agudo

casi insidiosa, generalmente con astenia, anorexia, con ó sin ictericia y alteración del enzimograma hepático. Esto es válido cuando es sintomática, ya que en un 50-60% de los casos es subclínica o asintomática.

La mortalidad rara vez supera el 1% de los casos (hepatitis fulminantes).

### 3.-EPIDEMIOLOGÍA

Es un virus de distribución mundial, si bien pueden diferenciarse zonas endémicas de alta prevalencia como por ejemplo : sudeste asiático, ciertas zonas de Africa y en Sudamérica la región amazónica.

Existen también zonas de mediana a baja prevalencia, como son : Europa central, países escandinavos, Canadá, EEUU y Australia y otras zonas de las que se carece de datos ciertos o confiables.

En nuestro país, de acuerdo a los datos que provienen del tamizaje que se realiza en los bancos de sangre, estaríamos en zona de baja endemicidad ya que la prevalencia para HBsAg es menor al 2% (0,8-1,1%) (1996). Aunque cabría revisar estos datos ya que es extrapolar datos de banco de sangre a población general, cuando existe autoexclusión y sólo es dador aquel que no haya tenido "hepatitis". Además, a pesar de ser una enfermedad comunicable, se calcula que la subnotificación asciende a un 50% y las comunicaciones sobre hepatitis, en gran proporción, no especifican el agente etiológico causal.

La principal vía de transmisión para este virus es la parenteral, o sea por sangre y/o derivados, si bien no se descartan otras vías ya que ha podido ser demostrada la presencia de HBsAg en todos los líquidos biológicos en individuos afectados, ya sea en etapa aguda, como en aquellos pacientes con hepatitis crónica.

La otra vía importante es la sexual. Se estima que, en general, un tercio de las infecciones ocurren por esta vía.

También reviste importancia la vía de transmisión perinatal sobre todo en zonas endémicas, donde madres con HBsAg Positivo con HBeAg (marcador

de alta replicación viral) en el momento del parto, se estima tienen un 90% de probabilidades de transmitir la infección al neonato.

Esto tiene gran importancia epidemiológica ya que un 90% de los casos de neonatos infectados evolucionarán a una hepatitis crónica, cirrosis y tienen una alta probabilidad de desarrollar un carcinoma hepatocelular. Esto ha sido demostrado por numerosas evidencias epidemiológicas donde más del 80% de los casos de cáncer hepático tienen algún marcador positivo para este virus.

#### 4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO

Se basa en la detección de las proteínas virales como el HBsAg y el HBeAg, (el HBcAg no sale a circulación) y de los anticuerpos específicos contra estos tres antígenos.

Los tiempos que los distintos marcadores permanecen en niveles detectables en circulación dependerán de cada huésped en particular, ya que están directamente relacionados con la calidad de la respuesta inmune.

Generalmente el anticuerpo (Ac) contra el HBcAg (antiHBc) de clase IgG permanece detectable prácticamente de por vida, constituyendo la cicatriz inmunológica de la infección, pero no indica resolución y/o inmunidad, sólo que hubo infección. Por lo tanto si detectamos el Ac de clase IgM (antiHBc-IgM) nos indicará una infección reciente. La negativización del HBsAg constituye la primer evidencia del cese de la replicación viral y posterior resolución de la infección. Con la aparición del Ac contra este Ag (AntiHBs) tenemos la certeza de resolución e inmunidad; aunque muchas veces su aparición en niveles detectables es bastante corta en el tiempo y por lo tanto de difícil detección.

Cuando la negativización del HBsAg no se produce en un período prolongado de evolución (antes se tomaba como límite seis meses, el criterio actual no es tan estricto y evalúa la sintomatología e imagen

histológica) podemos sospechar lo que denominamos una hepatitis crónica.

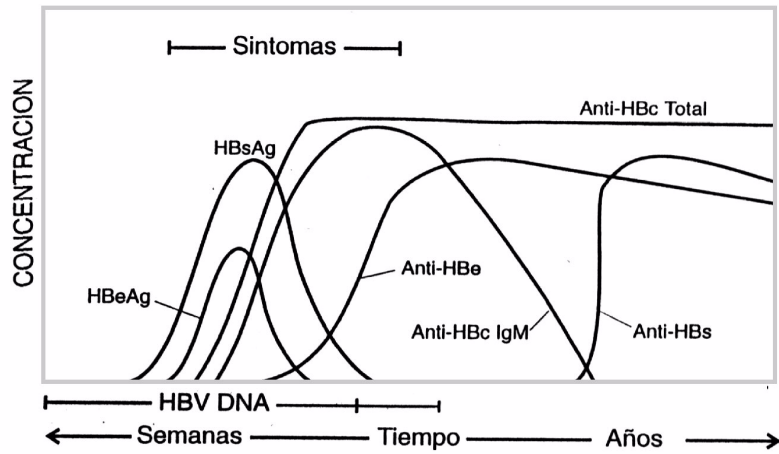
En estos pacientes la infección no se resuelve y el virus continúa su replicación. Esto puede estar acompañado de sintomatología, constituyendo una hepatitis crónica activa ó persistente donde la sintomatología es intermitente, si bien para clasificar una hepatitis crónica es necesario contar con la imagen histológica.

Puede también ser asintomática, determinando un "portador sano". Generalmente la mayoría evoluciona a cirrosis y en menor proporción puede desarrollar un hepatocarcinoma en el curso de 25 a 30 años.

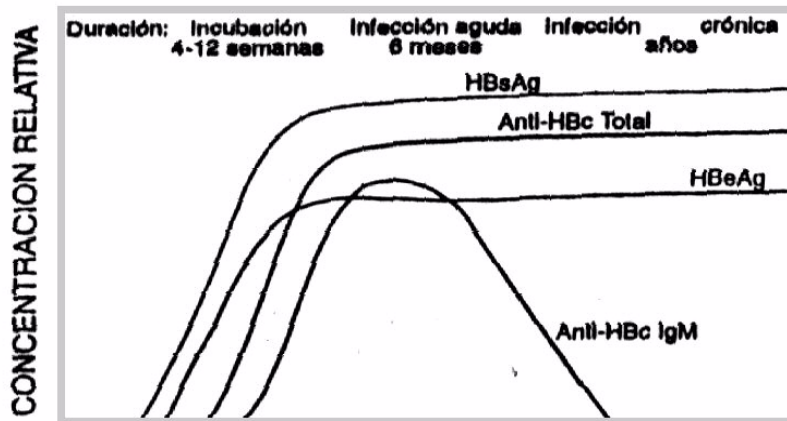
Es muy importante evaluar mediante la detección de los distintos marcadores el curso de infección y pronóstico (sistema HBeAg-antiHBe) y determinar en una hepatitis crónica si se ha producido la integración del genoma viral al hepatocito (etapa no replicativa).

Esto puede determinarse mediante el empleo de sondas genéticas (hibridación molecular) u otras técnicas moleculares (b-DNA o PCR) más sensibles, que permiten la detección del DNA viral de los viriones en circulación si es que dicha integración no ha ocurrido. Permite además la caracterización de la aparición de mutantes e-. Es decir en algunas hepatitis crónicas como resultado de la respuesta inmune del individuo se selecciona una cepa mutante que no sintetiza HBeAg, pero sigue replicando en alto título, inclusive a pesar de tener antiHBe positivo. Generalmente estos pacientes presentan sintomatología clínica (elevación del nivel de actividad de transaminasas e histología hepática con actividad). La presencia de estas mutantes puede certificarse además empleando técnicas de Biología molecular como el LiPA, Hibridación diferencial luego de PCR y también por secuenciación.

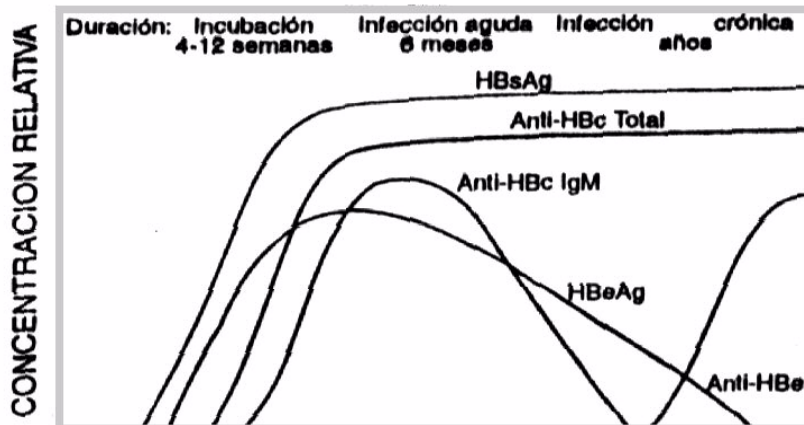
**Gráfico 1: Marcadores de una Hepatitis B aguda**



**Gráfico 2: Marcadores de una Hepatitis B crónica**



**Gráfico 3: Hepatitis crónica B con seroconversión tardía de sistema "e"**



## 5. - MEDIDAS DE CONTROL

a) **Inmunización Pasiva:** la confiere una gammaglobulina hiperinmune (HBIg) contra este virus, que posee alto título de Ac antiHBs, cuando es administrada pre-exposición. La gammaglobulina normal (NIg) no es eficaz porque no tiene o es muy bajo el título de Ac protectores (antiHBs).

La HBIg cuando es usada post-exposición, debe administrarse dentro de las 48 horas de producida la exposición (preferentemente dentro de las 6 horas) por vía intramuscular. Deben darse dos dosis separadas por 30 días. Las dosis están relacionadas con el peso corporal. Posee una concentración de 50.000 mUI/ml de antiHBs para proteger a un individuo de la infección.

b) **Inmunización Activa:** ya desde comienzos de la década de los años ochenta existe la vacuna contra el HBV. Fue la primer vacuna a partir de suero humano (portadores de HBsAg) ahora denominada de primera generación, con muy buenos resultados en cuanto a inocuidad, inmunogenicidad y respuesta.

Los esquemas de vacunación varían según el origen comercial de la vacuna, pero básicamente son 2 ó 3 dosis, a intervalos de 30 días y un refuerzo a los 6 meses ó al año.

Con el propósito de no malgastar vacunas puede realizarse un estudio previo a la vacunación para determinar los individuos susceptibles de infección y así protegerlos.

Desde fines de la década de los años ochenta, están disponibles las vacunas de segunda generación obtenidas por recombinación genética (expresión del HBsAg en bacterias ó levaduras), con resultados comparables a las anteriores.

Ambas confieren una inmunidad promedio de 3 a 5 años.

c) **Inmunización Pasiva -Activa:** es la conducta ideal para aquellos individuos en los cuales por exposición o riesgo de exposición, no puede esperarse la respuesta a la vacunación sola. Consiste en administrar HBIg y vacuna, en distintos lugares (ambos deltoides), simultáneamente.

## VIRUS DE HEPATITIS C (HCV)

### 1.-AGENTE ETIOLOGICO

El agente etiológico de las ahora llamadas hepatitis C es un virus de los que hasta 1988 se denominaban globalmente como los causantes de las hepatitis NoA NoB, principalmente post-transfusionales. Si bien aún no ha sido caracterizado desde el punto de vista morfológico, ya que no ha sido visualizado por microscopía electrónica gracias a la ingeniería genética se ha logrado secuenciar su genoma y se conocen además sus características fisicoquímicas. Así es que se lo relaciona a la Familia Flaviviridae por su tamaño (menor a 60 nm) y su genoma (RNA de simple cadena), además presenta una envoltura lipídica (sensible a solventes orgánicos).

### 2.-ASPECTOS CLINICOS

Posee un tiempo de incubación variable de 4 a 8 semanas y la mayoría cursa la etapa aguda con una forma subclínica (75-80%), con moderada elevación en el nivel de actividad de transaminasas, e inclusive con variación ondulatoria de los niveles normales. El porcentaje de evolución a cronicidad es mayor que en la infección por el HBV, 70-85% de los casos. Los primeros datos epidemiológicos en zonas endémicas, lo relacionan fuertemente al desarrollo de carcinoma hepatocelular.

### 3.-EPIDEMIOLOGIA

Si bien los estudios epidemiológicos son todavía preliminares y limitados por metodologías y disponibilidad técnica, se ha demostrado que este virus tiene distribución mundial y con alta incidencia en los grupos de riesgo que son los mismos que para HBV, ya que su vía de transmisión más importante es la parenteral. Además, aunque no han sido todavía fehacientemente demostradas las vías sexual y perinatal, seguramente también están involucradas.

### 4.-DIAGNOSTICO VIROLOGICO

Por primera vez en la historia de la Microbiología se desarrolló una prueba de laboratorio capaz de

detectar la infección por este virus sin haberlo aún caracterizado.

Efectivamente, mediante ingeniería genética, se obtuvieron proteínas virales que se utilizaron como Ag de captura para detectar anticuerpos específicos en el individuo infectado.

Los primeros equipos, llamados de primera generación, se desarrollaron utilizando una proteína no estructural del virus que produce una seroconversión tardía (5-6 semanas) del cuadro agudo.

Luego los equipos, llamados de segunda generación, que incluyeron otras proteínas virales (estructurales) como antígeno de captura lograron detectar los anticuerpos específicos más precozmente (2-3 meses) de producido el cuadro agudo.

Actualmente se dispone de equipos de tercera generación que parecen aportar mejoras a la sensibilidad, pero no a la especificidad. Todos detectan Ac de clase IgG (respuesta secundaria).

También se han desarrollado pruebas suplementarias utilizando la técnica de inmunoblotting, que inmoviliza las proteínas virales o los péptidos sintéticos en nitrocelulosa o nylon y detecta los anticuerpos específicos (clase IgG) por enzimoimmunoensayo (RIBA o LIA). En los últimos años se ha incorporado como marcador en la evaluación de la evolución de la enfermedad y en individuos tratados, la investigación o detección del RNA del HCV por técnicas moleculares (RT-PCR), y más recientemente por técnicas estandarizadas que permiten la cuantificación de la llamada "carga viral", metodologías útiles como factor pronóstico tanto en la evolución como en la respuesta al tratamiento.

### 5.- MEDIDAS DE CONTROL

No existe por el momento ni profilaxis pasiva ni activa para este virus. El control de la sangre a transfundir es una medida fundamental para mejorar el control de la infección como así también la modificación de conductas de riesgo para la infección.

## 6.-MARCADORES CON VALOR PRONOSTICO EN INFECCION POR HCV

### BUENOS

Joven  
Corto  
Normal  
Declin. Temprana  
HCM/HCP  
Ninguno

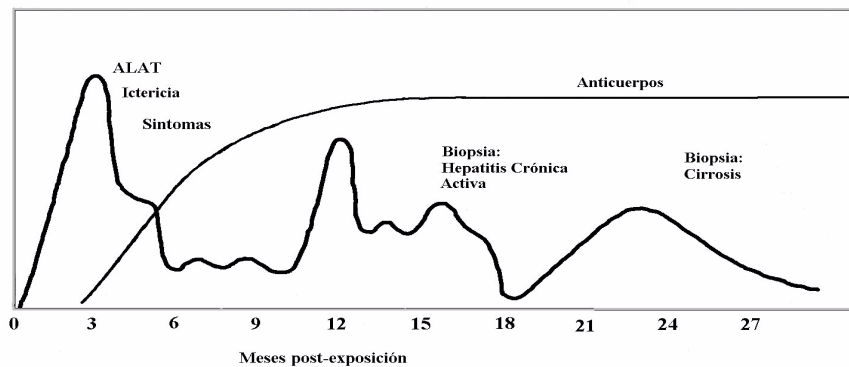
HCM: hepatitis crónica moderada  
HCP: hepatitis crónica persistente  
HCA: hepatitis crónica activa  
HCC: hepatocarcinoma

**EDAD DE INFECCIÓN**  
**DURACION DE LA INFECCIÓN**  
**RESPUESTA INMUNE**  
**PERFIL ENZIMATICO**  
**HISTOLOGIA HEPATICA INICIAL**  
**COFACTORES**

### MALOS

Longevo  
Largo  
Disminuido  
Elevado  
HCA/HCC  
Alcohol/HBV/HIV

### Gráfico 1: Marcadores de una Hepatitis C



## VIRUS DE HEPATITIS D (DELTA) (HDV)

### 1.- AGENTE ETIOLOGICO

Es un virus defectivo que depende de la replicación del HBV para poder infectar y replicarse. Toma la cubierta de éste (HBsAg), aunque tiene un Ag propio (HDAg).

### 2.- ASPECTOS CLINICOS

La infección puede producirse simultáneamente con el HBV lo que denominaremos como coinfección, o bien en un paciente con hepatitis crónica por HBV, lo que se denomina superinfección. Esta última tiene un pronóstico más grave que la anterior, aunque en ambos casos significa una enfermedad hepática más severa e inclusive el desarrollo de una hepatitis fulminante es más frecuente.

### 3.- EPIDEMIOLOGIA

La vía de transmisión es la misma que para el HBV o sea fundamentalmente parenteral. Recordar que para que el HDV pueda infectar, el HBV debe estar replicando.

Es endémico de algunas zonas donde también lo es el HBV (sur de Italia, Amazonas), y también aparece en forma esporádica, generalmente en grupos de riesgo para el HBV.

### 4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO

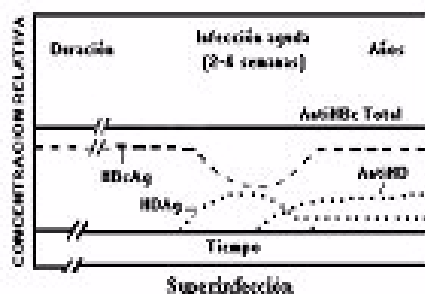
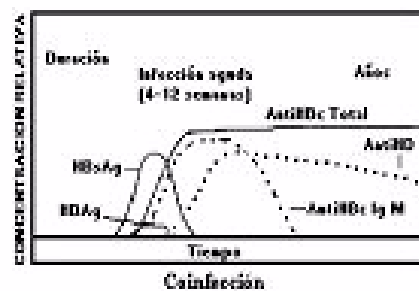
Consiste en la detección de los Ac. específicos contra el HDAg. Este, si bien sale a circulación, lo hace recubierto con el HBsAg, de manera que no es una determinación de rutina, aunque pueda realizarse.

Como esta infección está directamente relacionada con el HBV es útil diferenciar si se trata de una coinfección o una superinfección, para eso se lo relaciona con los marcadores del HBV. El marcador más útil es el antiHBc-IgM, ya que determina si la infección con HBV es aguda o se trata de una infección crónica.

### 5.- MEDIDAS DE CONTROL

Es la que se aplica al HBV, ya que un individuo inmune para el HBV, lo es para HDV.

### Gráfico 1: Marcadores de HDV



## VIRUS DE HEPATITIS E (HEV)

### 1.- AGENTE ETIOLOGICO

El agente etiológico de las ahora llamadas hepatitis E es un virus de los que, hasta 1988, se indicaba como causante de las hepatitis NoANoB transmitidas entéricamente.

Es un virus pequeño, de aproximadamente 30-40 nm y se lo relacionó en un primer momento a la familia Picornaviridae. Al secuenciar su genoma y estudiarlo se lo relaciona con la familia Caliciviridae, aunque todavía no hay una definición al respecto. Su genoma es RNA de cadena simple.

### 2.- ASPECTOS CLINICOS

Produce una enfermedad muy parecida a la hepatitis A, si bien puede tener un curso más grave y mayor mortalidad (2-3%). No evoluciona a cronicidad ni deja secuelas.

Parecería una característica propia la alta mortalidad en embarazadas en las que puede llegar al 15-20%.

### 3.- EPIDEMIOLOGIA

Aún antes de disponerse de métodos diagnósticos para hepatitis E se han podido determinar brotes epidémicos y epidemias ocurridas en diversas partes del mundo, dado que la enfermedad estaba perfectamente caracterizada desde el punto de

vista clínico y se contaba con pruebas sensibles y específicas para los demás virus hepatotropos.

Su principal vía de transmisión es la entérica, es decir por agua o alimentos contaminados. También los brotes tienen cierta estacionalidad, que coincide en ciertas zonas con las épocas de grandes lluvias.

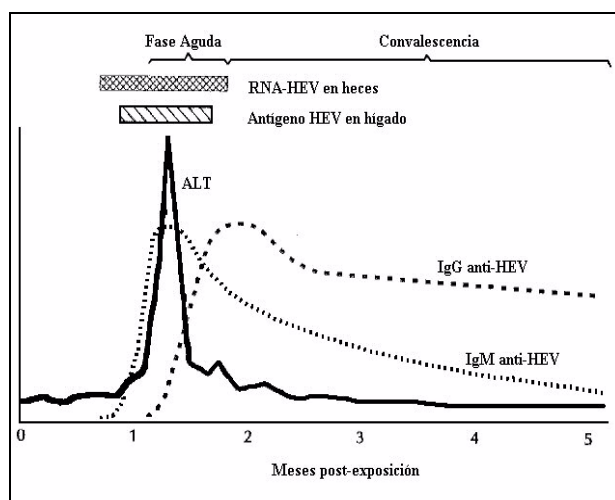
### 4.- DIAGNOSTICO VIROLOGICO

Se realiza por medio de la determinación de anticuerpos específicos por enzimoimmunoensayo. Los anticuerpos IgG antiHEV aumentan coincidiendo con la elevación de las aminotransferasas y disminuyen con el tiempo. La duración de los mismos y si estos anticuerpos protegen de una re-infección todavía esta en discusión. La detección de partículas virales en heces y suero por PCR no resulta práctica en un examen de rutina, pero sí puede dar información en la epidemiología del HEV.

### 5.- MEDIDAS DE CONTROL

No existen por el momento, si bien se ha intentado obtener una inmunización pasiva a través de sueros de individuos convalecientes, habitantes de zonas de alta endemicidad, pero por ahora son sólo intentos a nivel experimental.

**Gráfico 1: Marcadores de la Hepatitis E**



## HEPATITIS No-A No-B No-C

Aunque recientemente ha sido posible caracterizar dos virus (HCV y HEV) de entre las patologías rotuladas como NoANoB, existen evidencias clínicas y experimentales que permiten suponer la existencia de otros agentes etiológicos, además de los ya descritos, capaces de causar una hepatopatía como sintomatología más importante. Teniendo en cuenta las confusiones que ha traído la nomenclatura de NoANoB en las hepatitis, se prefiere ahora denominarlas como hepatitis por virus X o hepatitis NoA-E.

Se deben descartar otros virus conocidos, capaces de producir una hepatopatía con cierta frecuencia, como por ejemplo el citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein Barr (EBV). Además es muy importante tener en cuenta la epidemiología del caso a evaluar, como así también la Historia Clínica del paciente, ya que si bien el diagnóstico es por descarte, es quizás uno de los más difíciles de realizar

### EVIDENCIAS DE OTROS AGENTES ETIOLOGICOS DE HEPATITIS.

- DIFERENTES PERIODOS DE INCUBACION (CORTO Y LARGO).
- VARIOS EPISODIOS DE HEPATITIS.
- HEPATITIS CRONICAS HBV Y HCV NEGATIVAS.
- NoABCV CLOROFORMO RESISTENTE.
- DESAFIOS CRUZADOS EN PRIMATES.
- HEPATITIS FULMINANTES NoA-E.

### HEPATITIS NoANoB (HEPATITIS por VIRUS X).CRITERIOS DE EXCLUSION.

- ALCOHOL.
- AUTOINMUNIDAD.
- ENFERMEDAD HEPATICA PREEXISTENTE.
- TOXICIDAD POR DROGAS.
- FALLA CARDIACA.
- EBV; CMV; (HSV) NEGATIVOS.
- HABCDEV NEGATIVOS (HIGADO Y SUERO).

### OTROS AGENTES IMPLICADOS.

#### TOGAVIRUS.

- FALLA HEPATICA AGUDA.
- FIEBRE HEMORRAGICA SEVERA.
- después de TRANSPLANTE HEPATICO.

#### PARAMIXOVIRUS.

- HEPATITIS a CELULAS GIGANTES.

## APENDICE DE NOMENCLATURA DE MARCADORES SEROLOGICOS

### HAV - VIRUS DE HEPATITIS A

• **Anti HAV-IgM:** Anticuerpo (Ac.) clase IgM contra HAV.

Presente en la etapa aguda de la enfermedad. Es indicador de enfermedad actual

• **Anti HAV-IgG:** Anticuerpo (Ac.) clase IgG contra HAV. Presente en la convalecencia. Su positividad no indica infección actual por HAV.

### HBV - VIRUS DE HEPATITIS B

• **HBsAg:** Antígeno de superficie de la hepatitis B. Antiguamente llamado "Antígeno Australiano" (AgAu). Aparece en la etapa aguda y se mantiene detectable en la infección crónica. Su presencia indica infectividad y generalmente replicación viral.

• **AntiHBs:** Anticuerpo contra el antígeno de superficie. Aparece en la convalecencia. Indica recuperación clínica y generalmente inmunidad.

• **AntiHBc:** Anticuerpo contra el antígeno "core" (antígeno central del HBV). Indica exposición al HBV. Presente en la etapa aguda y se mantiene en la convalecencia. Puede persistir meses o años.

• **AntiHBc-IgM:** Ac. clase IgM contra el antígeno "core". Indica exposición al HBV. Presente en la etapa aguda en altos títulos, es marcador de infección reciente. Se mantiene en niveles detectables, aunque con bajo título, en casi todas las hepatitis crónicas.

• **HBeAg:** Antígeno "e". Aparece en la etapa aguda junto con el antígeno de superficie. Es marcador de alta replicación viral e infectividad.

• **AntiHBe:** Ac. contra el antígeno "e". Generalmente indica recuperación clínica y buen pronóstico.

• **DNA-HBV:** Acido Desoxirribonucleico del HBV. Su presencia en suero o plasma indica replicación viral e infectividad.

### HCV - VIRUS DE HEPATITIS C

• **AntiHCV-IgG:** Anticuerpo clase IgG contra HCV. Indica exposición al HCV.

• **AntiHCV-IgM:** Anticuerpo clase IgM contra HCV. Presente en la etapa aguda. Indica infección actual, aunque en los casos crónicos puede persistir en títulos detectables por meses ó años.

• **HCV RNA:** Acido ribonucleico del HCV. Su presencia en suero ó plasma indica replicación viral e infectividad.

### HDV - VIRUS DE HEPATITIS DELTA

• **AntiHDV-IgM:** Anticuerpo clase IgM contra HDV. Presente en la etapa aguda. Indica infección actual, aunque en los casos crónicos puede persistir en títulos detectables por meses o años.

• **AntiHDV-IgG:** anticuerpo clase IgG contra HDV. Indica exposición al HDV, puede persistir en títulos detectables por meses ó años. Su positividad no indica infección actual por HDV.

**AntiHDV :** Anticuerpos totales contra el antígeno delta. Su presencia indica exposición al virus.

### HEV - VIRUS DE HEPATITIS E

• **AntiHEV:** Anticuerpos totales contra HEV. Su presencia indica exposición al HEV.

**TABLA 1. Historia de la ictericia y de las Hepatitis virales.  
Descubrimiento de Virus Hepatotrópicos Humanos.**

ICTERICIA ASOCIADA AL CONTACTO	B.C.-A.D.
HEPATITIS TRANSMITIDA PARENTERALMENTE	1885
DISTINCION ENTRE HEPATITIS A Y B	1940s
DEFINICION DE LA EPIDEMIOLOGIA DE HAV Y HBV	1950s-1970s
DETECCION DE HBsAg	1963
DESCUBRIMIENTO DEL HBV	1970
IDENTIFICACION DEL HAV	1973
CARACTERIZACION DEL HDV	1977-1986
DESCUBRIMIENTO DEL HEV	1980
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL HCV	1986-1989

**TABLA 2. Taxonomía viral, Genotipos y Serotipos de los Virus Hepatotrópicos Humanos.**

	HAV	HEV	HBV	HCV	HDV
Familia	Picornaviridae	Incieta(*)	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Deltaviridae
Género	Hepatovirus	sin nombre	OrthoHepadnavirus.	sin nombre	Delta-virus
Especie	virus Hep. A	Virus Hep. E	virus Hep. B	virus Hep. C	Virus Hep. D
Genotipos	7	>3 (en estudio)	6	> 6	3
Serotipos	1	>1 (en estudio)	1	?	?

(\*) Su ubicación taxonómica es difícil; tiene características de Caliciviridae y Togaviridae.

**TABLA 3. Propiedades de los Viriones de los Virus Hepatotrópicos Humanos.**

Propiedades	HAV	HEV	HBV	HCV	HDV
Forma	Esférica	esférica	Esférica	Esférica	Esférica
Tamaño(nm)	28	32	42	38-50	43
Envoltura	No	no	Si	Si	Si
Simetría de la cápside	Icosaédrica	Icosaédrica	Icosaédrica	desc.	Icosaédrica
Proteínas de la cápside	3	1	1	1	1
Sitio de Ensamblado	Citoplasma	desc.	Citoplasma	desc.	Citoplasma
Flotación en .CsCl	1.32-1.34	1.35-1.40	1.36	1.29-1.32	1.25

**TABLA 4. Propiedades de los Genomas de los Virus Hepatotrópicos Humanos.**

Propiedades	HAV	HEV	HBV	HCV	HDV
Tipo ác. Nucleico	RNA	RNA	DNA	RNA	RNA
Tipo de cadena	Cadena simple	Cadena simple	cadena doble	cadena simple	Cadena simple
Linear o circular	linear	Linear	Circular	linear	Circular
Polaridad	+	+	n.a.	+	-
Tamaño (Kb)	7.5	7.8	3.2	9.4	1.7
Segmentación	No	No	No	No	No
Sitio de replicación	Citoplasma	Desconocido	Núcleo	desconocido	Núcleo

n.a. : no aplicable.

**TABLA 5. Propiedades Biológicas de los Virus Hepatotrópicos Humanos.**

PROPIEDADES	HAV	HEV	HBV	HCV	HDV
Título máximo/ml	$10^{8-9}$	?	$10^{9-10}$	$10^{6-7}$	$10^{10-11}$
Ppal vía transmisión	Fecal oral	fecal oral	parent. sexual	parent.	parent.
Cronicidad	No	No	si	si	si
Oncogenicidad	No	No	si	si	?
Curso fulminante	Raro	Embarazo	raro	raro	no común
<b>MARCADORES</b>					
Antígeno	si(*)	si(*)	si(#)	no	si(#)
Anticuerpos	si(#)	si(#)	si(#)	si(#)	si(#)
Acido nucleico	si(*)(#)	si(*)(#)	si(#)	si(#)	si(#)
Vacuna Comercial	Si	No	si	no	no

(\*) en heces.

(#) en suero..

## 2.- PAUTAS GENERALES DE PROCEDIMIENTO

### 2.1. - OBTENCION DE MUESTRAS PARA ESTUDIO SEROLOGICOS.

a) La extracción de sangre se debe realizar con el paciente en ayunas. Preferiblemente con un ayuno no menor a 4 hs.

b) Colocar el lazo y elegir la vena adecuada.

c) Realizar la asepsia de la zona, aplicando tintura de yodo al 2% ó alcohol iodado al 3% ó solución iodo - povidona, en forma de círculos crecientes. Dejar secar y eliminar luego el yodo con alcohol 70%. No tocar la zona una vez preparada.

d) Realizar la venopuntura, preferiblemente con sistema tipo Vacutainer sin anticoagulante. De no ser posible, usar jeringa y aguja descartable de un solo uso. Extraer 10-12 ml de sangre en caso de adultos, y no menos de 4 ml en niños.

e) Si se usa jeringa y aguja, descartar la aguja de la jeringa en un recipiente adecuado y trasvasar la muestra a dos tubos, haciéndola deslizar por las paredes sin hacer espuma; tapar con tapón de goma. Los tubos deben estar limpios, secos, rotulados con el código elegido y de ser posible estériles.

f) Dejar retraer el coágulo y centrifugar los tubos tapados 5 minutos a 3000 rpm. Si se usa varilla para despegar los coágulos antes de centrifugar, se debe usar UNA VARILLA PARA CADA MUESTRA, para evitar contaminación entre las mismas. Esto es MUY IMPORTANTE !!

g) Transferir el suero sobrenadante con pipeta, UNA PARA CADA MUESTRA !! o con pipeta automática (UNA PUNTA PARA CADA MUESTRA !!) o por volcado a un tubo plástico con tapa hermética. Este no debe contener hematíes en suspensión, sino realizar una segunda centrifugación.

h) Dividir la muestra en dos alícuotas y conservar una a  $-20^{\circ}C$  o  $<$  temp, (SEROTECA) para futuros estudios. MUY IMPORTANTE !! VOL MIN: 1 ml (adultos) o 0.5 ml (neonatos).

i) La muestra no deberá procesarse si no está en condiciones adecuadas, éstas son: no contaminación, no hemólisis (situación ideal). Sino, la muestra debe desecharse y se solicitará nueva muestra.

j) Si se efectúa el traslado de la/s muestra/s fuera del laboratorio, se deberá cumplir con las normas de bioseguridad que incluyen el uso de contenedores plásticos herméticos e irrompibles. Si se trasladan las muestras fuera del hospital, deberán refrigerarse convenientemente.

k) En caso de no poder realizar alguna de las determinaciones, enviar la alícuota, preferentemente en el día de la extracción, al Laboratorio de Referencia. De no ser posible su envío, conservarla:

\*Hasta 7 días: a  $4^{\circ}C$ . \*Por períodos más prolongados: congelar a  $-20^{\circ}C$  ó a menor temperatura.

Para el envío de muestras para la detección de RNA HCV, deben tenerse en cuenta las sig. pautas:

\*Enviar como mínimo un mililitro (si es un paciente menor de 5 años de edad: 0.5 ml) de suero ó plasma anticoagulado con EDTA ó Citrato de Sodio. NUNCA CON HEPARINA !!!

\*La muestra debe ser separada inmediatamente del paquete globular, aceptándose como máximo 4 horas desde la extracción de sangre (tiempo en el cual ya se produciría una caída en la viremia).

Más allá de ese lapso, la muestra se considera NO APTA para su procesamiento.

\*Alicuotar. Si se cuenta con los medios necesarios, freezar inmediatamente la fracción a ser enviada. Enviar CONGELADA (con hielo seco). Si esto no fuera posible conservar inmediatamente a  $+4^{\circ}C$  y enviar refrigerada, considerándose una muestra adecuada, aquella en la cual entre la obtención de la misma y su procesamiento hayan transcurrido como máximo 7 días.

\*Es fundamental ENVIAR UN RESUMEN DE HISTORIA CLINICA lo más completo posible, toda vez que se derive una muestra. \*NUNCA ENVIAR MUESTRAS LOS FINES DE SEMANA !!

\*SIEMPRE TRATAR DE HACERLO LOS LUNES O MARTES !!

## **2.2. - ALGORITMO DEL ESTUDIO DE MARCADORES VIRALES EN PACIENTES CON CUADROS COMPATIBLES CON HEPATITIS VIRAL AGUDA (ADULTOS).**

Si Ud. está en presencia de un paciente adulto con cuadro compatible con hepatitis viral aguda (astenia, adinamia, ictericia, hiporexia, náuseas, vómitos, y nivel de actividad de transaminasas elevadas por lo menos 5 veces su nivel normal), en primer lugar se debe descartar cualquier otra entidad capaz de producir cuadros clínicos y humorales similares a la hepatitis viral aguda como:

- Litiasis coledociana
- Cáncer de Páncreas
- Carcinoma de la vía biliar

Se interrogará sobre anteced. epidemiol. y se solicitarán marcadores de acuerdo a las sig. pautas:

**a) Antecedentes transfusionales (seis meses previos). Investigar:**

- antiHCV. Si es negativo,
- HBsAg. Si es negativo,
- Repetir el antiHCV a los 30 días.

**b) Drogadicción endovenosa. Investigar:**

- antiHCV y HBsAg.

**c) Contacto homosexual. Investigar:**

- HBsAg. Si es negativo, antiHCV.

**d) Tratamientos odontológicos recientes ó parenterales. Investigar:**

- HBsAg. Si es negativo, antiHCV.

**e) Esporádicas y sin antecedentes de HVA a HAV. Investigar:**

- HBsAg. Si es negativo, antiHCV.

En los casos c, d, y e, ante HBsAg negativo y antiHCV negativo, repetir a los 30 días.

**f) Contacto con familiares infectados con HAV, HBV, ó HCV. Pedir el marcador correspondiente.**

**g) De ser todos los marcadores negativos, solicitar la determinación de antiHAV IgM.**

**h) Descartar la posibilidad de hepatitis autoinmune con la det. de marcadores de autoinmunidad.**

Completar con cada paciente una Ficha Clínica según modelo de Anexo 1.

## **2.3. - ALGORITMO DEL ESTUDIO DE MARCADORES VIRALES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CUADRO COMPATIBLE CON HEPATITIS VIRAL AGUDA.**

Si Ud. está en presencia de un paciente pediátrico con cuadro compatible con hepatitis viral aguda (astenia, fiebre, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, ictericia y nivel de actividad de transaminasas elevadas), proceder de acuerdo a las siguientes pautas:

**a) Historia Clínica y antecedentes epidemiológicos.**

**b) Antecedentes transfusionales (últimos seis meses).**

**c) Solicitar en primer lugar antiHAV IgM.**

**d) Si éste es negativo, solicitar: HBsAg y antiHCV.**

**e) Si son negativos, repetir al mes: antiHAV IgM y antiHCV.**

**f) Si son todos negativos y sin antecedentes epidemiológicos realizar:**

- Ecografía y
- Marcadores de autoinmunidad: FAN, AML, aLKM.

### 3.- FUNDAMENTOS Y TECNICAS UTILIZADAS EN EL DIAGNOSTICO DE HEPATITIS VIRALES

#### 3.1.- METODOS SEROLOGICOS

En el laboratorio diagnóstico de hepatitis virales se usan técnicas serológicas, que nos permiten detectar la presencia de anticuerpos y/o antígenos virales en el suero del paciente, así como técnicas de biología molecular que nos permiten detectar la presencia de genomas virales en circulación.

Hoy en día la técnica más usada en el diagnóstico serológico de hepatitis es el ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) o enzimoimmunoensayo (EIE).

Hay muchos diseños posibles de un ELISA. La elección dependerá, entre otros factores, del marcador, de la disponibilidad de reactivos y de la sensibilidad y precisión requeridas.

#### ✓ Determinación de Antígenos

Se utilizan en general diseños del tipo "no competitivos". En este tipo de ensayos se pegan a superficie sólidas (fosas de placa o perlas de poliestireno o polivinilo o en paredes de tubos) anticuerpos antiantígeno a determinar. Luego se agrega la muestra que contiene los antígenos a determinar. El complejo se completa con el agregado de un segundo anticuerpo antiantígeno marcado con una enzima ("conjugado"). Esta unión se revela con el agregado del sustrato de la enzima y el cromógeno correspondiente.

Los diseños "competitivos" no se aplican en la determinación de antígenos, fundamentalmente por los problemas inherentes a la obtención de antígenos purificados de buena calidad para marcar.

#### ✓ Determinación de Anticuerpos

##### **a) Métodos competitivos**

La muestra que contiene los anticuerpos a determinar junto con un anticuerpo de igual especificidad marcado con una enzima ("conjugado") se agregan a la fase sólida que contiene el antígeno inmovilizado. Cuanto mayor cantidad de anticuerpos haya en la muestra, menor cantidad de conjugado se unirá a la fase sólida, resultando en una señal menor cuando se agregue el sustrato de la enzima y el correspondiente cromógeno.

##### **b) Métodos no competitivos**

**Elisa de Captura** : En este tipo de diseño, la muestra a ensayar se incuba con la fase sólida a la que se le unió el antígeno, ya sea por : a) absorción directa de antígeno, b) por captura de anticuerpos.

a) Elisa de captura por absorción directa de antígeno (sandwich simple) : Los antígenos se pegan al soporte sólido. Luego se agrega la muestra, o una dilución de la misma, en la que se encuentran los anticuerpos a detectar. Esta unión antígeno-anticuerpo es revelada mediante el agregado de un anticuerpo con especificidad para alguna en particular o todas las inmunoglobulinas humanas, marcado con una enzima ("conjugado"). Este "sandwich" así formado, si la muestra contenía los Ac buscados, se evidenciará por el agregado del sustrato de la enzima que en presencia de un cromógeno desarrollará color en el medio de reacción.

b) Elisa por captura de anticuerpo (sandwich doble). Utiliza dos anticuerpos : uno pegado a la

superficie sólida ("anticuerpo de captura") y otro marcado con enzima ("conjugado"). El anticuerpo de captura, de especificidad hacia todas o alguna en particular inmunoglobulina humana, capta del suero del paciente todos los anticuerpos correspondientes. El agregado del antígeno otorga especificidad a la reacción. La segunda parte del "sandwich" la constituye un anticuerpo anti-antígeno marcado con enzima ("conjugado"). Esta unión se revela, como en los casos anteriores, por el agregado del sustrato de la enzima y un cromógeno adecuado.

Si bien hoy en día la mayoría de los equipos de ELISA usados se adquieren comercialmente, es posible desarrollarlos en el laboratorio.

Algunos de los factores a tener en cuenta en el diseño "artesanal" de estos métodos son:

# Superficie usada : son preferibles las superficies de poliestireno, que tienen buena capacidad de unir proteínas y baja absorbancia de fondo.

# Condiciones de pegado de los antígenos o anticuerpos : deben elegirse las condiciones adecuadas que eviten las uniones inespecíficas. El uso de reactivos bloqueantes que contengan albúmina humana y de detergentes en las soluciones de lavado y/o soluciones de dilución de muestras contribuyen a ello.

# Elección de enzimas detectoras y sistemas sustrato-cromógeno : las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina. Si bien la primera es la más económica de las enzimas disponibles, el manejo de sus sustratos suele ser más delicado. Para el caso de la fosfatasa alcalina, el sustrato más utilizado es el p-nitrofenil fosfato. Para el caso de la peroxidasa, el sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con ortofenilendiamina como reactivo cromógeno es el más utilizado.

Desarrollaremos a continuación las técnicas operatorias para la realización de las determinaciones serológicas más frecuentes en el laboratorio. Aquellas técnicas que fueron desarrolladas artesanalmente en el Laboratorio Nacional de Referencia serán descriptas en forma completa para ser puestas a punto en los laboratorios que así lo deseen. De las que no fueron desarrolladas, se describirá el fundamento de los métodos comerciales de uso más frecuente en el mercado.

### **3.1.1.- DETECCION DE Ac. ESPECIFICOS CONTRA HAV CLASE IgG. (antiHAV-IgG)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo, utilizando el principio de sandwich doble. El Ac de captura, adsorbido a la superficie de una policubeta o perla, con especificidad anti-gamma, captura los Ac de clase IgG presentes en el suero. Luego se agrega la solución conteniendo el virus ó fracción antigénica tornando específica la reacción. Con el agregado posterior del Ac específico, conjugado a una enzima, se completa dicho complejo. Este se revela por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción.

#### **Técnica:**

- a) Sensibilizar placas de PVC incubando 18-22 hs a temperatura ambiente, con el Ac anti-gamma dil. 1:1000 en buffer CO<sub>3</sub>=/COH<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.05 M pH 9.5.
- b) Lavar tres veces con PBS(0.01M)-Tw20(0.05%). Desecar 24 hrs como mínimo al vacío y sellar (conservar a +4°C hasta su uso).
- c) Incubar 100 µl de una dilución de suero 1:2000 en PBS-BSA 0.6% durante una hora a 40°C en BM. Proceder de igual forma con sueros controles positivos y negativos.
- d) Lavar cuatro veces con PBS-Tw.
- e) Agregar 100 µl de solución conteniendo virus de hepatitis A. Incubar a temperatura ambiente durante 18 22hs.
- f) Lavar cinco veces con PBS-Tw.
- g) Agregar 100 µl de conjugado antiHAV: Peroxidasa e incubar en BM a 40°C durante dos horas.

- h) Lavar seis veces con PBS-Tw.
- i) Agregar 100 µl de solución sustrato/cromógeno recién preparado (0.04g de o-fenilendiamina (OPD) + 0.04ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en 100ml de buffer fosfato/citrato 0.05 M pH 4.9-5.1). Incubar 15-30 min. a temperatura ambiente en oscuridad.
- j) Bloquear la reacción con 100 ml de ácido sulfúrico 4 N. Leer en espectrofotómetro a 492 nm frente a blanco de sustrato.

**Desarrollo de color: POSITIVO**  
**No desarrollo de color: Negativo**

### Cálculo de resultados

- ◆ **Valor de Corte** : 2,1 x promedio absorbancia del control negativo.
- ◆ **Interpretación de Resultados** : Muestras cuyas absorbancias sean menores que el valor de corte son consideradas negativas. Muestras cuyas absorbancias son mayores que el valor de corte son consideradas positivas. Muestras cuyos valores estén dentro de +/- el 10% del valor de corte deben ser repetidas.

### 3.1.2. -DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA HAV CLASE IgM. (antiHAV-IgM)

#### Fundamento:

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo utilizando el principio de sandwich doble. El Ac de captura con especificidad anti-u, captura los Ac de clase IgM presentes en el suero. Luego se agrega el virus o fracción antigénica, tornando específica la reacción. Con el agregado de Ac específico conjugado a una enzima, se completa dicho complejo. Este se revela por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color indicará la formación del sandwich y positividad de la reacción.

#### Técnica:

- a. - Sensibilizar placas de PVC incubando 18 a 22 hrs a temperatura ambiente con el Ac anti-u diluido 1:1000 en buffer CO<sub>3</sub>=/CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, 0.05 M, pH 9,5.
- b. - Lavar tres veces con PBS-Tw(0,05%). Desecar al vacío y sellar.
- c. - Incubar 100 µl de una dilución de suero (1:2000) en PBS-BSA 0,6% durante una hora a 40° en BM. Proceder de igual forma con sueros controles positivos y negativos.
- d. - Lavar cuatro veces con PBS-TW.
- e. - Agregar 100 µl de solución conteniendo virus de hepatitis A e incubar a temperatura ambiente durante 18/22 hrs.
- f. - Lavar 5 veces con PBS-TW.
- g. - Agregar 100 µl de solución de conj. antiHAV: peroxidasa e incubar en BM a 40°C durante 2 hs.
- h. - Lavar seis veces con PBS-TW.
- i. - Agregar 100 µl de solución sustrato /cromógeno recién preparado (0,04 g de O-fenilendiamina (OPD) + 0,04 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en 100 ml de buffer fosfato-citrato 0.5M, pH 4,9-5,1.) Incubar 15/30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- j. - Bloquear la reacción con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, leer en espectrofotómetro a 492 nm.

**Desarrollo de color: POSITIVO**  
**No desarrollo de color: negativo**

### Cálculo de resultados

♦ **Valor de Corte:** 2,1 x promedio absorbancia control negativo .

♦ **Interpretación de Resultados :** muestras cuyos valores de absorbancias sean menores que el valor de corte son consideradas negativas. Muestras cuyos valores de absorbancias sean mayores que el valor de corte son consideradas positivas. Muestras cuyos valores de absorbancias estén dentro de +/- el 10% del valor de corte deberán ser repetidas.

♦ **Observaciones :** los volúmenes de Ag y conjugado pueden ser modificados a 50 µl, siempre y cuando los controles respondan bien a esta variación.

### **3.1.3.- DETECCIÓN DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag CORE DEL HBV. (antiHBc)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo competitivo en el cual el antígeno HBc se halla unido a la fase sólida. El antiHBc presente en la muestra a analizar competirá con el antiHBc marcado con peroxidasa (antiHBc:Px), por los sitios antigénicos del HBcAg pegado en el soporte sólido. Si hay anticuerpos antiHBc en la muestra a analizar estos bloquearán los sitios antigénicos evitando la unión del antiHBc:Px, lo que se evidenciará por el no desarrollo del color, cuando se agregue el sustrato de la enzima y el cromógeno correspondiente.

#### **Técnica:**

a. - Sensibilizar una placa de PVC incubando 18/22 hs a temperatura ambiente, con un pool de sueros humanos positivos para antiHBc, dil. 1:30.000 en buffer CO<sub>3</sub>=/COH<sub>3</sub>-, 0.05M y pH 9.5.

b. - Lavar 3 veces con PBS(0.01M)-Tw20(0.05 %)

c. - Colocar 50-100 µl de HBcAg incubar 18/22 hs a temperatura ambiente.

d. - Lavar tres veces con PBS-Tw.

e. - Desecar como mínimo 24 hrs al vacío y sellar. Guardar a +4°C (heladera común).

f. - Colocar 100 µl de conjugado (antiHBc:Px) en cada fosa, agregar, mezclando, 10µl de suero. Idem con los controles negativo y positivo.

g. - Incubar a temperatura ambiente durante 18/22 hs ó 2 hs en BM a 40°C.

h. - Lavar 6 veces con PBS-Tw.

i. - Agregar 100 µl de sustrato/cromógeno recién preparado (0.04 g de o-fenilendiamina (OPD) + 0.04 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en 100 ml de buffer fosfato-citrato 0.05M, pH 4.9/5.1)

j. - Incubar 15/30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

k. - Bloquear la reacción con 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Leer en espectrofotómetro a 492 nm.

**Desarrollo de color : negativo**

**No desarrollo de color : POSITIVO**

#### **Cálculo de resultados**

♦ **Valor de Corte :** (0.4 x Abs C Neg.)+(0.6 x Abs C Pos.)

♦ **Interpretación de Resultados :** Muestras cuyos valores de absorbancias sean mayores que el valor de corte son consideradas negativas. Muestras cuyos valores de absorbancias son menores que el valor de corte son consideradas positivas. Muestras cuyos valores de absorbancias estén dentro de +/- el 10% del valor de corte deben ser retesteadas.

### **3.1.4.- DETECCION DE Ac ESPECIF. CONTRA Ag CORE DEL HBV CLASE IgM (antiHBc-IgM)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo, utilizando el principio de ensayo de sandwich doble. El Ac de captura con especificidad anti-u, capta los anticuerpos de clase IgM presentes en el suero. Luego se agrega el antígeno, tornando específica la reacción. Con el agregado posterior del Ac específico conjugado a una enzima se completa dicho complejo. Este se revela por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color indicará la formación del sandwich y positividad de la reacción o muestra.

### **3.1.5.- DETECCION DE Ag DE SUPERFICIE DEL HBV**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo, utilizando el principio de sandwich simple. El Ac de captura antiHBs, capta el antígeno de superficie (HBsAg) presente en la muestra. Con el agregado posterior de Ac específico conjugado a una enzima se completa el complejo. Este se revela por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color indicará la formación del sandwich y la positividad de la reacción

#### **Técnica:**

- a.- Sensibilizar placas de PVC incubando 18/22hs. a temperatura ambiente, con el anticuerpo antiHBs (de cabra) dil. 1:4000 en buffer  $\text{CO}_3^{2-}/\text{CO}_3\text{H}^-$ , 0,05 M. pH 9.5.
- b.- Lavar tres veces con PBS-Tw (0.05%). Desecar al vacío y sellar. Guardar a + 4 ° (heladera común).
- c.- Incubar 100 µl de suero a temperatura ambiente durante 18-22hs. Proceder de igual forma con sueros controles positivos y negativos.
- d.- Lavar cuatro veces con PBS-Tw (0.05%).
- e.- Agregar 100 µl de conjugado antiHBs: Peroxidasa e incubar a BM a 40°C durante una hora.
- f.- Lavar seis veces con PBS-Tw (0.05%).
- g.- Agregar 100 µl de solución sustrato/cromógeno recién preparado (0.04g de o-fenilendiamina (OPD) + 0.04 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en 100ml de buffer fosfato-citrato 0.5 M pH 4.9-5.1). Incubar 15/30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad
- h.- Bloquear la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico 4N. Leer en espectrofotómetro a 492 nm.

**Desarrollo de Color: POSITIVO**

**No desarrollo de color: Negativo**

#### **Cálculo de resultados**

♦ **Valor de Corte:** 2,1 x Abs. Control Negativo .

♦ **Interpretación de Resultados:** Muestras cuyas absorbancias sean menores que el valor de corte son consideradas negativas. Muestras cuyas absorbancias son mayores que el valor de corte son consideradas positivas. Muestras cuyos valores estén dentro de +/- 10% del valor de corte deben ser repetidas.

#### **Prueba confirmatoria para HBsAg.**

a.- Para confirmar la positividad de HBsAg se debe repetir la determinación corriendo en paralelo la muestra neutralizada y sin neutralizar,

b.- Neutralización : mezclar por pipeteo 150 ul de suero a confirmar con 50 ul de gammaglobulina

hiperinmune contra HBV (HBIg).

c.- Incubar a temperatura ambiente durante 18 - 22 hs ó 1 h en BM a 40 °C. Luego realizar el ensayo.

d- Una muestra confirma su positividad si en la muestra neutralizada se observa una disminución mayor al 50% en el valor de absorbancia respecto al valor de absorbancia de la muestra sin neutralizar.

### **3.1.6 DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag DE SUPERFICIE DEL HBV. (antiHBs)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo, utilizando el principio de sandwich simple.

Los Ac antiHBs presentes en la muestra son captados por el Ag, (HBsAg) que se encuentra unido a la fase sólida. El complejo se completa con el agregado de conjugado HBsAg-Biotina y antibiotina:Peroxidasa. Este se revela por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color indicará positividad de la reacción.

#### **Técnica:**

a.- Sensibilizar placas de PVC con anticuerpos policlonales de cabra antiHBs dil 1:4000 en  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ , 0.05 M pH 9.5, 8/22hs. a temperatura ambiente.

b.- Lavar tres veces con PBs-Tw (0.05%)

c.- Agregar 100  $\mu\text{l}$  de HBsAg, incubar de 18/22hs a temperatura ambiente

d.- Lavar tres veces con PBs-Tw (0.05%).

e.- Desecar al vacío y sellar. Guardar a + 4° (hel. común).

f.- Incubar 100  $\mu\text{l}$  de suero, controles positivos y negativos durante 18/22hs a temperatura ambiente.

g.- Lavar cuatro veces con PBs-Tw. Agregar 100  $\mu\text{l}$  de conjugado( 50  $\mu\text{l}$  de HBsAg-Biotina +50 $\mu\text{l}$  de antiBiotina-Px).

i.- Lavar seis veces con PBs-Tw (0.05%).

j.- Agregar 100  $\mu\text{l}$  de sustrato/cromógeno recién preparado (0.04g de o-fenilendiamina + 0.04ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% en 100ml de buffer fosfato-citrato 0.5 M pH 4.9-5.1). Incubar de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad.

k.- Bloquear la reacción con 100  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico 4N. Leer en espectrofotómetro a 492 nm.

**Desarrollo de color: POSITIVO**

**No desarrollo de color: negativo**

#### **Cálculo de resultados**

♦**Valor de Corte:**  $2,1 \times \text{Abs. Control Negativo}$  .

♦**Interpretación de Resultados:** Muestras cuyas absorbancias sean menores que el valor de corte son consideradas negativas. Muestras cuyas absorbancias son mayores que el valor de corte son consideradas positivas. Muestras cuyos valores estén dentro de +/- 10% del valor de corte deben ser retesteadas.

### **3.1.7.- DETECCION DE Ag e (HBeAg) DEL HBV. (o mercial)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo basado en el principio de sandwich simple. La fase sólida consiste en tiras de poliestireno recubiertas con anticuerpo antiHBe humano. El HBeAg presente en el suero se une a la fase sólida ; el complejo se completa con el agregado del conjugado antiHBe-Px. El revelado se realiza por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color indicará positividad de la reacción.

### **3.1.8.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL Ag e DEL HBV. (antiHBe) (comercial)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo basada en el principio de sandwich simple con neutralización. La muestra es incubada con el neutralizante (HBeAg), y la fase sólida (la misma del ensayo anterior), en la cual se hallan fijos los anticuerpos antiHBe. El conjugado utilizado es un anticuerpo antiHBe conjugado con peroxidasa. El revelado se realiza por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color en este caso indicará que la reacción es negativa.

### **3.1.9.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL HDV (antiHDV) (comercial)**

#### **Fundamento:**

La técnica es un enzimoimmunoensayo competitivo, en el cual en la fase sólida se encuentra el antígeno delta inmovilizado, y se utilizan anticuerpos anti-Delta conjugados con peroxidasa, los cuales competirán con los anticuerpos presentes en la muestra por los sitios antigénicos.

El revelado se realiza por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. La positividad de la reacción se da por la ausencia de color.

### **3.1.10.- DETECCION DE Ac ESPECIFICOS CONTRA EL HCV .(antiHCV) (clase IgG)**

#### **Fundamento:**

La técnica utilizada es un enzimoimmunoensayo basado en el principio de sandwich simple.

El antígeno del virus de hepatitis C (tanto regiones estructurales como no estructurales) se encuentra unido a la fase sólida. El conjugado utilizado es un anticuerpo anti-IgG humano unido a peroxidasa.

El revelado se realiza por el agregado del sustrato de la enzima utilizada y un cromógeno para visualizar la reacción. El desarrollo de color indicará positividad de la reacción.

### **3.1.11.- DETECCION DE Ac CONTRA EL HCV (clase IgG)**

#### **METODOS SUPLEMENTARIOS.**

Debido a la existencia de reacciones falsas positivas en los métodos de tamizaje usados actualmente para la determinación de anticuerpos antiHCV, en algunos casos es necesario confirmar las muestras positivas por métodos suplementarios.

El Linear Immune Assay (LIA) para HCV es un enzimoimmunoensayo que utiliza como Ag de captura, epitopes linealizados en péptidos sintéticos, inmovilizados en una tira de nitrocelulosa o nylon, basándose en el principio de "sandwich simple" para la detección de Ac. La prueba detecta anticuerpos específicos clase IgG contra las proteínas fijadas a la tira del HCV.

La muestra de suero, diluída con tampón adecuado, es incubada con la tira. La reacción antígeno-anticuerpo se evidencia con el agregado de un conjugado anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina.

El revelado se realiza con el agregado del sustrato y cromógeno (bromoclorindolfosfato (BCIP)). El desarrollo de color en los lugares donde los Ag han sido fijados indica la presencia de anticuerpos específicos. El patrón de bandeo en cada caso referido al criterio de positividad de la prueba confirmará o no la reactividad de la muestra

Otro método similar disponible en el comercio es el Recombinant Immune Blotting Assay (RIBA) que utiliza antígenos obtenidos por recombinación genética como Ag de captura en lugar de péptidos sintéticos. También para confirmar una reactividad posee un criterio de positividad basado en el bandeo obtenido. El fundamento de la reacción es el mismo que para el LIA.

## **3.2. -BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO**

### **3.2.1 - Detección de HCV RNA por RT-nested PCR**

#### **Fundamento:**

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) aplicada al diagnóstico permite la detección de genoma viral en muestras clínicas, su detección es importante en :

- \*transmisión vertical,
- \*periodo de ventana serológica
- \*infección aguda,
- \*pacientes inmunocomprometidos,
- \*resolución de pruebas suplementarias indeterminadas,
- \*monitoreo de la respuesta al tratamiento.

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) permite amplificar un segmento de DNA que se encuentra entre dos regiones de secuencia conocida. Como se trata de un virus con genoma RNA se debe realizar primero un paso de retro-transcripción para obtener DNA copy y luego primer round de amplificación, y como se trata de un virus con baja viremia, en algunos casos se debe realizar un segundo round de amplificación, con cebadores internos a los del primer round (nested PCR).

#### **Técnica**

A 100 µl suero agregar 500 µl solución desnaturalizante (conteniendo 4M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio pH:7, 0,5% sarcosil ), 500 µl fenol equilibrado con agua tratada con DEPC, 50 µl de NaAc 2M pH 4.0 y 2-mercapto-etanol 0,1 M. Mezclar con vortex inmediatamente. Incubar 30' a 37°C. Agregar 150 µl de cloroformo. Mezclar y enfriar 5'. Después de centrifugar, precipitar la fase superior con un volumen igual de isopropanol en presencia de 20 ug de Dextran T 500 a 20°C. Lavar el pellet resultante con etanol al 70% frío y resuspender en 9 µl de agua-DEPC y 400 ng de random primers (pd(N)6). Desnaturalizar a 70° por 10 minutos.

Llevar a 20µl de volumen final con solución de retrotranscripción conteniendo 1x buffer MMLV, 10 mM DTT, 0,2 mM dNTPs, inhibidor de ribonucleasa y 180 U de transcriptasa reversa MMLV. Incubar la mezcla de reacción por 60' a 40°, luego 5' a 95° y enfriar sobre hielo.

Amplificar este cDNA en un vol. total de 50 µl conteniendo buffer 1x Taq, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 uM de cada uno de los cebadores para la región 5' UTR del genoma (5' CCC-TGT-GAG-GAA-CTA-CTG-TCT-TCA-CGC-3' y 5' GGT-GCA-TCT-ACG-AGA-CCT-3') y 1,5 U de Taq polimerasa

Programación del ciclador (Perkin Elmer 2400): 5' a 95° , 40 ciclos de 45" a 95° , 45 " a 55° y un minuto a 72° , con 5' finales a 72°.

Los productos de PCR se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se visualizan por fluorescencia ultravioleta. En caso de resultar negativo, amplificar 2 µl de la mezcla en un volumen final de 50 µl de mezcla de segunda amplificación conteniendo: buffer 1x Taq 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 uM de los primers internos (5'TCT-AGC-CAT-GGC-GTT-AGT-GCG-AGT-GT 3' y 5' CAC-TCG-CAA-GCA-CCC-TAT-CAG-GCA-GT 3') 0.2 Mm dNTPs y 1,5 U de Taq polimerasa Realizar 40 ciclos de amplificación como en el primer round. Los productos de reacción se visualizan como en el primer round.

### **3.2.2. - DETECCION DE HBV DNA POR HIBRIDIZACION MOLECULAR.**

#### **Fundamento:**

La determinación del DNA del virus de la hepatitis B es un indicador de la replicación viral. Esta es importante en el seguimiento de pacientes HBsAg + y AntiHBe +, en la evaluación de respuesta al

tratamiento y en la detección de mutantes. Las diversas técnicas disponibles poseen niveles de sensibilidad muy variadas. Se debe tener cuidado de elegir un método con la sensibilidad adecuada de tal forma que no estemos detectando HBV DNA en pacientes sin enfermedad asociada al virus., lo que podría confundir la evaluación del mismo. La técnica elegida debe ser capaz de permitir el seguimiento cuantitativo o semicuantitativo en respuesta al tratamiento. En este sentido la hibridación molecular es un método adecuado.

### **Técnica**

**a)** Extracción de DNA : 150 µl de suero son extraídos con 200 µl de NaOH 1N, 10' a 65°C. La solución resultante es bloteada en una membrana de nylon usando un sistema de filtración al vacío (SLOT-BLOT o DOT-BLOT). El DNA es fijado a la membrana por calor en vacío (1h a 80°C).

**b)** Hibridización: prehibridizar la membrana durante 1 hr a 40°C en solución de hibridización (formamida 50%, SSC 5X, solución Denhardt 10X, SDS 0,1%, esperma de salmón 0,1 mg/ml).(Denhardt 50X: 1% seroalbúmina bovina, 1% Ficoll, 1% polivinilpirrolidona)(SSC:0,15M ClNa, 0,015 M citrato trisódico, pH 7,0)

Agregar la sonda correspondiente al genoma completo del VHB marcada con biotina, previamente desnaturalizada (en ebullición 10').

Se incuba 16-20 hs a 40° C con agitación. Se realiza luego 1 lavado a temperatura ambiente con SSC 2X/SDS 0,1%, y luego otro a 65°C con SSC 0.1X/SDS 0,1%; todos los lavados con agitación.

**c)**Revelado : se bloquea la membrana con solución bloqueante (Tris 100mM, pH:7,5; ClNa 100mM, SDS 1%; Reactivo Bloqueante 2%. Se incuba 1 hora a 40°C con agitación.

Se agrega luego en la misma solución, el conjugado streptavidina-fosfatasa alcalina, en la dilución de uso. Se incuba 2 hs a 40°C con agitación.

Se realizan 2 lavados a temperatura ambiente con solución Tris 100 mM, pH:7,5; ClNa 300 mM; Tween20 0,5%, y luego 5 lavados a temperatura ambiente con solución Tris 100 mM, pH:9,5; ClNa 100mM; Cl<sub>2</sub>Mg 10mM. Todos los lavados con agitación.

Se agrega luego el sistema sustrato-cromógeno (BCIP (bromocloroindolil fosfato) y NBT (azul de tetrazolium))en 10 ml del buffer de lavado alcalino, que en presencia de la enzima fosfatasa alcalina, producirán una precipitación que permite visualizar la señal de una reacción positiva.

**d)** Semicuantificación : puede realizarse, si se utilizo el sistema SLOT-BLOT en el bloteo. Las señales obtenidas pueden semicuantificarse por comparación visual con la señal obtenida con patrones de suero de concentración conocida, o cuantificarlas con un densitómetro.

### **3.2.3. - OTRAS MET. MOLEC. APLICADAS AL DIAG. DE LAS HEPATITIS VIRALES.**

Las dos grandes limitaciones de la técnica de PCR (la dificultad para cuantificar en forma reproducible y la facilidad de contaminar muestras con material previamente amplificado) han llevado a numerosas compañías a diseñar metodologías que superen estos inconvenientes.

Por otra parte, dado que el conocimiento del genotipo del HCV presente en un individuo infectado tiene importancia pronóstica, se disponen de métodos que permiten genotipificar a los portadores del virus.

En los cuadros siguientes analizamos brevemente estas tecnologías que permiten cuantificar o semicuantificar RNA de HCV y genotipificar.

## MÉTODOS DE AMPLIFICACION PARA LA DETECCION DE HCV-RNA

MÉTODO	AMPLIFICACION	DETECCION	BREVE DESCRIPCION
Reacción en cadena de la polimerasa	Blanco (RNA del HCV)	Cualitativa	(1) Se extrae el RNA ;el cDNA se sintetiza por RT. Se usa un par de cebadores (simple determinación) ó en caso de resultar negativo, se realiza una segunda amplificación con cebadores anidados sobre el producto de la primera. Los productos de amplificación se detectan por hibridación con sondas ó por electroforesis en gel con tinción con bromuro de etidio.
RT-PCR con dilución a punto final	Blanco	Semi-cuantitativa.	(2) Se realizan diluciones seriadas de plasma ó extracto de RNA del paciente. El título de RNA-HCV es la máxima dilución de plasma que da señal +.
RT-PCR Competitiva	Blanco	Semi-cuantitativa	(3) Una serie de concentraciones conocidas de DNA sintético mutante de HCV se coamplifican con muestras de pacientes. Los productos de amplificación del C-DNA y del Standard, de PM diferentes, muestran bandas distinguibles en una electroforesis. La comparación de las bandas de pacientes con las de concentración conocida permite la semicuantificación.
RT-PCR multicíclica	Blanco	Cualitativa, semi-cuantitativa	(4) Patrones de concentración conocida de RNA-HCV se coamplifican con la muestra. La amplificación se detiene a distintos tiempos y los productos se hibridizan con sondas por dot-blot. Las muestras de pacientes se comparan con series de patrones para semicuantificar.
Amplificación isothermal de ac. Nucleicos (NASBA)	Blanco	Cualitativa, semi-cuantitativa	(5) Se utilizan múltiples enzimas y primers para amplificar RNA. La detección se realiza por electroforesis o por hibridación con sondas.
DNA ramificado (Quantiplex <sup>tm</sup> )	Señal	Cuantitativa	(6) RNA-HCV es capturado en micropocillos por sondas sintéticas. Un segundo juego de sondas hibridiza con las regiones 5' NC y core y con un DNA ramificado amplificador. Una sonda asociada a fosfatasa alcalina se hibridiza al complejo. La emisión de luz de la reacción con un sustrato quimiolumincente es directamente proporcional a la cantidad de RNA.

### Referencias

- (1) Okamoto et al, 1990.
- (2) Simmonds et al, 1990.
- (3) Kaneko et al, 1992.

- (4) Ishiyama et al, 1992.
- (5) Kievits et al, 1991.
- (6) Urdea et al, 1993.

## METODOS PARA GENOTIPIFICAR EL HCV.

METODO	BREVE DESCRIPCION	REFERENCIAS
Secuenciación directa de los productos de PCR.	Se utilizan primers (cebadores) de cualquier región variable del genoma (Preferentemente la región del Core) para amplificar cDNA y luego realizar secuenciación directa.	Simmonds et al, 1993.
Amplificación por PCR utilizando primers tipo específicos	Se utilizan primers tipo específicos de las regiones del Core y NS5 para amplificar cDNA.	Okamoto et al, 1992 y 1993
PCR y posterior hibridación con sondas.	Luego de la amplificación no específica por PCR, se utilizan sondas de oligonucleótidos tipo-específicas para las regiones del Core y E1.	Cha et al, 1992.
Análisis de RFLPs (Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción).	Se amplifica el cDNA de la región 5'NCR ; los fragmentos amplificados se digieren con enzimas de restricción y se corren por electroforesis. Distintos tipos de virus muestran bandeo diferente.	McOmish et al, 1993.
PCR seguida por hibridación con múltiples sondas (InnoLipa).	Se inmovilizan sondas oligonucleóticas genotipo-específicas en una membrana. El cDNA-HCV amplificado por nested PCR se hibridiza con el/as. El patron de positividad se utiliza para diferenciar tipos y subtipos de HCV.	Stuyer et al, 1993.
Serotipificación	Utiliza péptidos sintéticos tipo-específicos de la región NS4 como antígenos de captura en un ensayo de ELISA.	Simmonds, Rose et al, 1993.

## **4.-PREVENCION Y VACUNACION**

### **4.1.- MEDIDAS DE PREVENCION PARA HEPATITIS B Y C.**

Las normas de prevención deben estipularse para tres niveles:

- 1) Nivel reservorio
- 2) Nivel vías de transmisión
- 3) Personas con riesgo incrementado de infección.

#### **4.1.1.- NORMAS PARA EL RESERVORIO (PORTADOR CRONICO).**

- a) Deberá ser instruido respecto de su condición. En forma personal, oral ó escrita recibirá información respecto de la capacidad infectiva de su sangre y secreciones corporales.
- b) Deberá saber sobre :
  - Su imposibilidad de donar sangre
  - Su obligación de informar su estado de portador crónico ante la necesidad de atención médica u odontológica.
  - La conveniencia del uso de profilácticos en sus relaciones sexuales.
  - La conveniencia de vacunar contra el HBV a la pareja y a los que comparten el hogar.
  - La capacidad viricida del hipoclorito de sodio.

#### **4.1.2.- NORMAS A NIVEL VIAS DE TRANSMISION.**

##### **4.1.2.1.- Bancos de Sangre, Servicios de Hemoterapia y Medicina Transfusional.**

- a) Todo probable dador que tenga un antecedente de hepatitis viral será desestimado como tal. Será excepción a la presente el haber padecido hepatitis A, o el manifestar haber tenido hepatitis antes de los 10 años de edad.
- b) Será excluido como donante aquel que tenga o haya tenido una prueba positiva para HBsAg, para antiHCV, ó antiHIV.
- c) Será excluido todo donante que manifieste haber tenido una elevación de alanina amino transferasa (transaminasa glutámico pirúvica), en el doble ó más del límite superior normal, en ocasiones reiteradas y sin que medien causas tóxicas, obesidad, etc.
- d) Se abstendrá de donar sangre todo individuo con conductas de riesgo para Hepatitis y SIDA :
  - Varones homosexuales y bisexuales.
  - Quienes sean o hayan sido adictos a drogas inyectables.
  - Los hemofílicos.
  - Las personas de residencia con origen en áreas de alta endemicidad.
  - Los varones o mujeres que ejerzan o hayan ejercido la prostitución y quienes hayan tenido relaciones con ellos en los últimos 6 meses.
  - Quienes hayan tenido relación sexual con alguien que tenga o haya tenido una prueba reactiva para HIV
  - Aquellas personas que presenten tatuajes.
  - Aquellas personas que hayan sido transfundidas con sangre y/o componentes en los últimos 12 meses.

- Aquellas personas que hayan estado bajo tratamiento con acupuntura dentro del último año.
  - Aquellas personas que en el último año hayan tenido estrecho contacto con individuos con hepatitis virales.
- e) No se aceptará como donante a quien haya donado la única unidad de sangre y/o componente a un paciente con evidencias clínicas y/o de laboratorio de hepatitis postransfusional o infección con HIV, no existiendo otros antecedentes o causas probables de infección.
- f) Al dador de sangre se le brindará una información adecuada a fin de que pueda manifestar la existencia de algún riesgo de transmitir hepatitis. Se responderán todas las preguntas y se le permitirá la posibilidad de autoexclusión.
- g) En todo dador que haya cumplido con los requisitos previos se tomará una muestra de sangre un vez finalizada la donación. En dicha muestra se realizarán, entre otras, los siguientes estudios tendientes a disminuir el riesgo de hepatitis postransfusional: HBsAg, antiHCV, antiHIV. Se recomienda la realización de antiHBc y nivel de alanina aminotransferasa dentro de un perfil de máxima seguridad transfusional.
- h) Toda prueba inicialmente reactiva deberá repetirse por duplicado con la misma muestra. Si dos de los tres resultados fueran no reactivos, la unidad será aprobada para uso transfusional. Si por el contrario dos de los tres resultados fueran reactivos se descartará la unidad.
- i) En caso de detectar muestras reactivas a las pruebas de selección mencionados en el párrafo f) se deberá enviar la muestra en tiempo y forma, al Laboratorio de Referencia asignado para confirmar los resultados mediante los estudios que correspondan.
- j) El resultado de confirmación inmunoserológica, deberá llegar en forma oportuna al Banco de Sangre o Servicio de Hemoterapia que tendrá la responsabilidad y obligación de citar al donante de sangre post confirmación, por el medio que determine cada Institución. Ante la concurrencia del donante citado, se lo deberá informar de su situación adecuadamente y proceder a la derivación del mismo a un Servicio de Gastroenterología que lo captará para completar el diagnóstico, e implementar el tratamiento y las acciones tendientes a evitar la transmisión de las hepatitis virales diagnosticadas.
- k) Los servicios de Hemoterapia y/o los Bancos de Sangre deberán llevar registro de los dadores con resultados reactivos, y con registro de la notificación y derivación de éstos a los servicios de atención clínica.
- l) A los efectos de la notificación epidemiológica se recomienda el uso de la ficha de Bco de Sangre.

#### 4.1.2.2 -ESTABLECIMIENTOS DE SALUD

- a) Promover el uso de material descartable.
- b) Promover el uso de guantes para la asistencia de pacientes en circunstancias que supone contacto con sangre ó secreciones.
- c) Promover el cumplimiento de normas de bioseguridad en el manejo de instrumental, recipientes, residuos, etc, que contengan ó hayan estado en contacto con sangre o secreciones.
- d) Implantar el uso diario de hipoclorito de sodio diluido para la higiene de pisos, mesadas, etc.

#### 4.1.2.3.- MATERNIDAD.

#.- Catastro de HBsAg en todas las embarazadas.

### 4.1.3. - PERSONAS CON RIESGO INCREMENTADO DE INFECCION.

Se incluyen en esta categoría a aquellas personas que por sus hábitos, trabajo o enfermedad subyacente, tienen mayor riesgo de contraer infección por virus de hepatitis : trabajadores de la salud, prostitutas, familiares de portadores crónicos, hemodializados, hemofílicos, integrantes de comunidades cerradas.

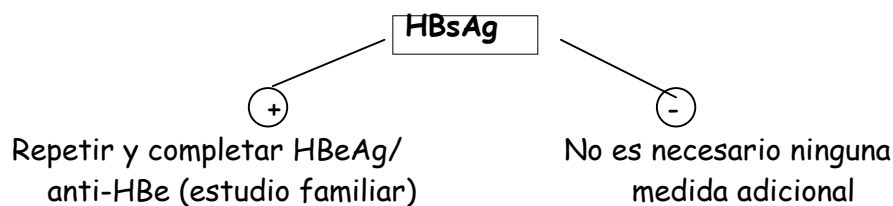
a) Educación concerniente a las características de las infecciones en juego, formas de contagio y medidas de prevención específicas para cada grupo de riesgo.

b) Inmunización pasiva con gammaglobulina hiperinmune contra HBV, en forma inmediata para aquellos que accidentalmente hayan sufrido una herida con instrumental contaminado con sangre o secreciones de personas que se sepan o sospechen ser HBsAg positivas y no estén bajo inmunización activa previa.

c) Serán pasibles del mismo tratamiento los recién nacidos de madres HBsAg positivas y los que deban iniciar tratamiento hemodiálico sin haber podido completar su programa de vacunación previa.

d) La medida principal para el control de la infección por HBV es la vacunación. En los países de baja y mediana endemicidad, corresponde vacunar, en una primera etapa, a todos los individuos que integren poblaciones de alto riesgo.

### 4.2. - TAMIZAJE DE LAS EMBARAZADAS EN EL TERCER TRIMESTRE



### 4.3. - PREVENCIÓN DE LA TRANSMISIÓN PERINATAL DE HEPATITIS B.

Los recién nacidos (RN) de madres portadoras del virus de la hepatitis B (HBV), son altamente susceptibles a la infección por dicho virus durante el parto.

Si se infectan por esta vía, serán vulnerables a severas enfermedades hepáticas durante la infancia y en la edad adulta, que incluyen hepatitis crónicas, cirrosis y hepatocarcinoma, aproximadamente en el 25% de los casos.

La posibilidad de adquirir la infección perinatal por el HBV es del 70-90% convirtiéndose en portadores crónicos del virus en un 85-90%.

Hasta el año 1984, el Comité de Prácticas de Inmunizaciones (ACIP) recomendaba la búsqueda de antígeno de superficie (HBsAg) solamente a las embarazadas de alto riesgo, portadores, drogadictos, trabajadores de salud, etc.

Luego, en 1988 el mismo comité (ACIP) indicó que en toda mujer embarazada debe ser investigado rutinariamente el HBsAg con el fin de reducir efectivamente la posibilidad del RN de infectarse con el HBV, ello implica instrumentar un programa de profilaxis pasiva-activa que proveerá alrededor de un 90% de protección efectiva.

Deben tomarse medidas inmediatas, dentro de las primeras 12 hs de vida según el siguiente esquema:

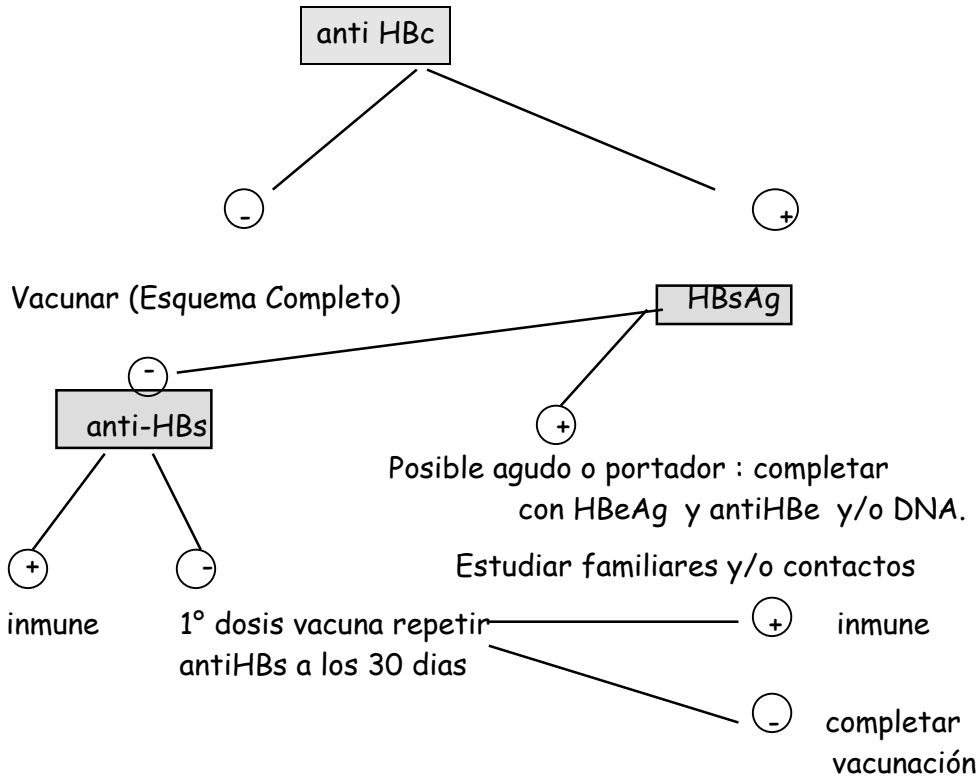
- Dentro de las 12 hs de vida: Gammaglobulina hiperinmune contra la hepatitis B (0,5 ml IM)
- Hasta 7 días de vida: Primera dosis de vacuna contra la hepatitis B (0,5 ml IM)
- Hasta 30 días de vida: Segunda dosis de vacuna contra la hepatitis B (0,5 ml IM)

• Al 6° mes: Tercera dosis de vacuna contra la hepatitis B (0,5 ml IM)

El seguimiento de los niños debe prolongarse, controlándose los niveles del anticuerpo de superficie (anti HBs). Si estos disminuyen, deben recibir una dosis de refuerzo de la vacuna.

#### 4.4. - VACUNACION CONTRA HBV

##### 4.4.1. - TAMIZAJE PRE-VACUNACION



Dado que es una vacuna probadamente inmunógena y segura, en un análisis de costo- eficacia, no es imprescindible realizar un control de respuesta de anticuerpos (antiHBs) (eficiencia de adultos sanos mayor del 90%) una vez completado el esquema de inmunización.

##### 4.4.2. - CONDICIONES DE ESTABILIDAD DE LA VACUNA

Es conveniente almacenarla en heladera común (4 - 8°C). Por ser una vacuna a subunidad viral, es decir que el producto inmunizante es una proteína viral pura (HBsAg), la pérdida de la inmunogenicidad por pérdida de la cadena de frío no es un punto tan crítico, de hecho, todas las vacunas disponibles en el mercado están desarrolladas para soportar hasta temperaturas de 30°C sin perder su inmunogenicidad. En cambio esta sí se pierde si la vacuna debe soportar ciclos de congelación y descongelación. En caso de transporte deben tomarse las precauciones para que no se congele.

##### 4.4.3. - REGISTRO DE VACUNACION.

Se recomienda el uso de la ficha "Protocolo clínico-epidemiológico para vacunar contra HBV (anexo 3 )

## **5. - TRATAMIENTO**

Las Hepatitis crónicas B y C se tratan con interferones y drogas antivirales con el objeto de amplificar la respuesta inmune del huésped e inhibir y/o eliminar la replicación viral.

### **5.1 HEPATITIS CRONICA B:**

Indicaciones: Pacientes con elevación persistente en las transaminasas, niveles detectables de HBsAg, HBeAg y DNA-HBV en suero, hepatitis crónica por biopsia y enfermedad hepática compensada.

#### **METAS FINALES DEL TRATAMIENTO:**

##### **I. - Supresión de la replicación**

- 1.- Eliminación del HBV-DNA del suero (medido por hibridización molecular)
- 2.- Eliminación del HBeAg +/- Detección del antiHBe.

##### **II. - Mejoramiento de la enfermedad hepática**

- 1.- Normalización de los niveles de transaminasas séricas
- 2.- Disminución de la actividad necro-inflamatoria en biopsias hepáticas.

##### **III. - Erradicación del HBV**

- 1.- Eliminación del HBsAg +/- detección del antiHBs
- 2.- Eliminación del DNA-HBV del suero (monitoreado por PCR)
- 3.- Desaparición del DNA-HBV del hígado (monitoreado por PCR)

##### **IV. - Prevención de cirrosis y carcinoma hepatocelular y aumento de la *sobrevida***

### **5.2. - HEPATITIS CRONICA C:**

Indicaciones: Pacientes con antiHCV POSITIVO, con transaminasas elevadas, y hepatitis crónica por biopsia.

#### **METAS FINALES DEL TRATAMIENTO**

- |  |
|--|
| 1. Eliminación de formas replicantes del HCV de sangre e hígado.         |
| 2. Resolución de los signos bioquímicos (niveles de ALT) .               |
| 3. Resolución de los signos histológicos de inflamación hepática crónica |

Factores predictivos de respuesta favorable al tratamiento en Hepatitis Crónica B y C.

HEPATITIS B	HEPATITIS C
<ul style="list-style-type: none"><li>• DNA HBV &lt; 200 pg/ml</li><li>• ALT &gt; 100 UI/l</li><li>• Sexo femenino</li><li>• Corta duración de la enfermedad</li><li>• anti-HIV negativo</li><li>• Heterosexual</li><li>• Raza no asiática</li><li>• Enfermedad hepática activa</li><li>• Infección con virus salvaje</li><li>• Ausencia de inmunosupresión</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Corta duración de la enfermedad</li><li>• Edad joven</li><li>• Ausencia de cirrosis</li><li>• Bajos niveles de HCV-RNA</li><li>• Genotipo 2 ó 3</li><li>• Bajos niveles de hierro hepático</li></ul>

## **6.- GARANTIA DE CALIDAD Y EVALUACION DEL CONTROL DE CALIDAD**

Definiremos estos conceptos, porque su conocimiento es básico para programar las acciones que aseguren la confiabilidad de los resultados serológicos.

La calidad de un producto o servicio, se define como el conjunto de características que satisfagan las necesidades establecidas para ese producto o servicio.

Garantía de calidad : Se refiere a un programa completo, que asegure que el resultado final informado por el laboratorio sea confiable y útil.

Evaluación de la calidad : Puede hacerse mediante diferentes técnicas de control externo, efectuadas por los centros referenciales en cada país.

Control de calidad: Representa las actividades y técnicas operativas desarrolladas para cumplir con los requisitos de calidad establecidos. Se refiere a los procedimientos de control que operan sobre cada uno de los múltiples factores que pueden incidir en los resultados del diagnóstico serológico.

### **CONTROL INTERNO Y CURVAS DE CONTROL**

El control interno (CI) de la calidad tiene por objetivo asegurar el cumplimiento de todos los procedimientos establecidos para el trabajo del laboratorio y el monitoreo de la precisión de los resultados (construcción de curvas de control) con el propósito de detectar y corregir eventuales errores.

Un programa de CI, deberá contemplar el monitoreo diario de los procesos analíticos mediante sueros control y construcción de curvas de control, así como la participación en programas de control externo.

Entre los controles múltiples y acciones que contemplará un programa de CI, podemos citar:

- ✓ Composición y organización del personal del laboratorio.
- ✓ Formación y actualización técnica del personal.
- ✓ Elaboración del Manual de Procedimientos Operacionales.
- ✓ Selección de métodos analíticos adecuados.
- ✓ Colección, identificación, almacenamiento y transporte de muestras.
- ✓ Mantenimiento y control periódico de equipos, pipetas y materiales volumétricos.
- ✓ Decontaminación, limpieza y esterilización de los materiales en uso ( vidrios y equipos).
- ✓ Control de los reactivos.
- ✓ Normas de bioseguridad.
- ✓ Controles internos y externos.
- ✓ Evaluación constante de mejoras.

El monitoreo diario del proceso analítico para c/ prueba, se realiza a través de la evaluación de dicha prueba con sueros de control, construyendo curvas con la repet. diaria de los result. de estos sueros. Los sueros de control son sueros individuales, preparados por cada laboratorio o por laboratorios de referencia, reactivos (altos y bajos) y no reactivos para la prueba que se controla, alicuotados y conservados de tal modo que se asegure contar con el mismo espécimen para varios meses.

## CONTROL EXTERNO

Se trata de diferentes procedimientos que realizan los laboratorios referenciales para evaluar el desempeño de los laboratorios periféricos. Es muy importante que todos los laboratorios tengan control externo, pues sólo mediante este tipo de controles puede detectarse el sesgo (corrimiento del valor verdadero) en los resultados.

El Laboratorio Nacional de Referencia para Hepatitis Virales ha comenzado desde Octubre de 1996, un Programa de Control de Calidad externo para la red de laboratorios (catorce) que constituyen las Unidades Centinela del Programa Nacional de Control de las Hepatitis Virales.

El mismo consiste en el envío, dos veces por año (Abril y Octubre) de un panel de cinco miembros para ser analizados para los marcadores de HBV y HCV : HBsAg, antiHBc y antiHCV. Este panel es enviado a los laboratorios participantes, quienes remiten al Laboratorio Nacional de Referencia los resultados obtenidos, de acuerdo a la planilla en anexo 4. Una vez recepcionados todos los resultados, se envía a los laboratorios participantes la "clave" del Panel, mientras comienzan a procesarse los resultados totales. Se analizan para cada marcador: técnica y equipo usado, con sus correspondientes valores de corte, discrepancias con respecto a los resultados verdaderos (marca y técnica usada en verdaderos negativos y positivos, falsos negativos y positivos).

Se evalúa también el desempeño de cada laboratorio, analizando el número de errores cometidos y la evolución del desempeño con los paneles sucesivos.

Este informe es enviado a los participantes con el panel siguiente, donde cada laboratorio es nombrado con un código de manera que la evaluación global es anónima.

Evolución del N° de participantes :

Programa de Control de Calidad SEROLOGIA PARA HEPATITIS B Y C							
Panel	Fechas	N° de participantes	Lab. U.C.R	Lab. UCP	Serv. Hemoterapia Públicos Privados		Laboratorios grales Hosp.
I	Octubre 1996	16	14	--	2	0	0
II	Julio 1997	19	14	--	5	0	0
III	Octubre 1997	21	14	--	5	1	1
IV	Abril 1998	28	14	--	10	2	2
V	Octubre 1998	39	14	--	20	3	2
VI	Mayo 1999	50	14	--	26	3	7
VII	Octubre 1999	53	14	--	28	3	8
VIII	Abril 2000	58	14	--	30	4	10
IX	Octubre 2000	64	14	6	30	4	10
X	Abril 2001	65	14	6	30	4	11

U. Centinela Reg. (UCR) 09 jurisdicciones

U. Centinela Prov. (UCP) 06 jurisdicciones

Serv. Hemoterapia (SHT) 17 jurisdicciones (algunas coinciden con las de las UCRs).

Lab Grales Hosp (LGH) 06 jurisdicciones (algunas coinciden con las de las UCRs).

**Con lo cual están comprendidas las veinticuatro jurisdicciones del país.**

## **7.- GUIA DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA**

El personal de laboratorio de virología se expone a la infección al manejar muestras de sangre, plasma, suero, exudados, tejidos, heces u orina de los enfermos con hepatitis ó de enfermos que, sin hepatitis clínicamente manifiesta, son portadores de virus.

Debido a las características fisicoquímicas de algunos virus (por ej. termoestabilidad) y a las pequeñas cantidades de sangre que pueden producir infección (0.4 µl), se debe tener especial precaución en evitar el riesgo de accidentes. Por ej. el HBsAg (HBV) se ha encontrado en todos los componentes del plasma obtenidos por el método de fraccionamiento de Cohn.

Si bien el rigor de los cuidados debe extremarse en todos los laboratorios (de análisis, centros de hemoterapia, hemodiálisis, asistenciales, etc) es evidente que en un laboratorio dedicado específicamente a Hepatitis (diagnóstico, encuestas epidemiológicas, purificación, etc) se incrementa el riesgo a la exposición.

Además está perfectamente demostrado que ciertas profesiones y/u ocupaciones deben considerarse como actividades de alto riesgo para la infección por virus de Hepatitis tales como: técnicos de laboratorio, enfermeras, personal de hemodiálisis, médicos, cirujanos, dentistas y patólogos; actividades desarrolladas en servicios de hemodiálisis y oncología, laboratorios hospitalarios, bancos de sangre, y servicios de asistencia quirúrgica intensiva.

### **7.1- MECANISMOS COMUNES DE CONTAGIO**

La vía predominante es la parenteral, si bien no se descartan las demás vías comunes de contagio :

- 1) Autoinoculación accidental (agujas, pipetas Pasteur, micropipetas)
- 2) Contaminación de piel o mucosas con sangre o derivados (eslabón mano-boca).
  - a) Permeabilidad alterada (heridas, escoriaciones, eczemas)
  - b) Areas sanas extensas.
- 3) Contaminación de manos con sangre ó derivados.
- 4) Aspiración bucal y salpicaduras en los ojos.
- 5) Inhalación de gotitas en aerosol; éstas pueden producirse :
  - al agitar muestras,
  - durante la homogeneización mecánica,
  - en roturas,
  - al abrir frascos,
  - en el momento de expulsar la última gota de una pipeta,
  - derramando líquidos con formación de gotas,
  - en la centrifugación de tubos ó botellas con bordes húmedos,
  - en la centrifugación de tubos abiertos y casi llenos,
  - al frenar súbitamente la centrífuga para ganar tiempo.
- 6) Ciertos insectos, como los mosquitos, moscas o cucarachas podrían actuar como vectores mecánicos.

### **7.2.-MEDIDAS DE SEGURIDAD Y/O PREVENCION DE ACCIDENTES**

1) **NOMBRAR** : Un Encargado de Seguridad, un Suplente, y un Comité de Seguridad.

a) **Funciones del Encargado de Seguridad** :

- Vigilar el cumplimiento de las normas.
- Registrar todo lo ocurrido en el laboratorio que pueda poner en peligro al personal (accid, etc).

- Notificar las novedades y/o infracciones al director del laboratorio.
- Enseñar al personal nuevo las normas vigentes.
- Proveer de equipos protectores, bolsas para desechos, desinfectantes, etc.
- Controlar el estado inmunoserológico del personal del laboratorio en forma periódica.

#### **b) Funciones del Comité de Seguridad:**

- Observar en forma corriente las medidas de seguridad.
- Asesorar para la revisión de alguna de ellas.

### **2) HIGIENE PERSONAL:**

- a) No fumar, ni beber, ni comer en el laboratorio.
- b) No llevarse a la boca dedos u otros objetos (lápices, lápiceras, etiquetas para rotular, etc)
- c) No pipetear con la boca (usar peras de goma o propipetas)
- d) No tocarse la cara, cabellos u ojos durante un ensayo.
- e) Lavarse las manos frecuentemente:
  - Después de manipular muestras.
  - Al terminar con la experiencia.
  - Al salir del laboratorio.
- f) Nunca utilizar la ropa que se lleva puesta en ese momento para secarse las manos.
- g) Uso de cremas humectantes para manos.

### **3) ROPAS PROTECTORAS**

Al entrar a una zona de trabajo, todos los miembros del personal deben llevar una bata abrochada por detrás o por delante, cruzada en este último caso, y para abrir o preparar las muestras, tendrán que ponerse además un delantal de plástico y guantes desechables.

Se aplicará en las manos una crema protectora antes de ponerse los guantes, que no se han de llevar más de 2 horas seguidas.

Antes de salir del laboratorio, sea cual fuere el motivo, ó de ir a la sala de personal, toda persona deberá quitarse la bata, el delantal y los guantes, y lavarse las manos.

Los guantes desechables se utilizarán una sola vez y se pondrán después en una bolsa destinada a la incineración.

El delantal y la bata deben colgarse en los ganchos especiales, que para cada uno de esos fines tiene destinado cada miembro del personal.

Al terminar cada jornada, el delantal se sumerge durante unos minutos en hipoclorito diluído, después se enjuaga con agua caliente y se deja secar. La bata se dejará en el cesto destinado a la lavandería al final de cada semana (con mayor frecuencia si es necesario).

Si bien no se debe manchar la ropa, si se manchara accidentalmente con sangre u otros materiales de los enfermos, debe frotarse inmediatamente con una buena cantidad de hipoclorito diluído y al cabo de unos minutos, enjuagarse con agua.

Cuando pudieran producirse salpicaduras de la muestra, se protegerá la cara con una visera ó con gafas de seguridad.

Se recomienda el uso de aparatos de flujo laminar vertical cuando la/s muestras a manipular sean muy peligrosas (tipo 3).

#### **4) MANEJO DE MUESTRAS**

##### **a) Recepción de las muestras.**

- Se observará que estén correctamente cerradas y/o empaquetadas.
- Los recipientes sucios o no bien cerrados se presentarán al encargado de seguridad que habrá de decidir si deben desecharse sin sacarlos de sus envoltorios.
- Las hojas de petición sucias se incinerarán, luego de ser transcrita y haber sido separada en una bolsa en el recipiente de los desechos para incineración, por el técnico receptor de los sueros, que por supuesto llevará guantes desechables.
- Al abrir el recipiente de la muestra se debe evitar que se produzcan gotitas en aerosol y salpicaduras.

##### **b) Manipulación de las muestras.**

- Utilizar una pinza para retirar la aguja de la jeringa en las extracciones de sangre, de no contar con descartadores adecuados.
- Colocar los tubos y demás recipientes en sus correspondientes gradillas, nunca sobre la mesada, perfectamente tapados.
- Preferentemente utilizar materiales de plástico, no de vidrio.

##### **c) Manejo de pipetas.**

- Nunca se utilizará la boca.
- Las pipetas Pasteur y de otros tipos se manejarán con dispositivo de succión de goma ó automáticos.
- Debe procurarse que el nivel de líquido nunca alcance la extremidad superior de la pipeta.
- El contenido se dejará escurrir suavemente por las paredes del recipiente para evitar salpicaduras ó aerosoles.
- Deben mantenerse verticales mientras se utilicen.
- Luego de usados, no se dejarán sobre la mesa, sino que se desecharán suavemente sumergiéndolos por completo en una solución de hipoclorito, del mismo modo con los dispositivos de succión de goma contaminados.

##### **d) Centrifugación.**

- Las muestras de sangre deben centrifugarse con los tubos bien tapados y perfectamente equilibrados.
- Si un tubo se rompiera en la centrífuga, detenerla inmediatamente y esperar como mínimo diez (10) minutos para abrir la tapa.

La cubeta donde se ha derramado la sangre y han caído los restos del tubo roto, se introducirá con suavidad en un recipiente con, por ejemplo: glutaraldehído al 2% (ver tabla 2). Con ese mismo desinfectante, se frotarán las superficies de la cabeza de la centrífuga, la caja, las articulaciones y las otras cubetas. También pueden autoclavarse las articulaciones y cubetas, cuando el equipo lo permita.

#### **5) PRECAUCIONES EN LOS LUGARES DE TRABAJO**

- Cada uno de los miembros del personal, al realizar cada experiencia debe tener a su alcance un frasco lavador y un recipiente para desechos con hipoclorito diluído, una cantidad suficiente de torundas de algodón y una bolsa de plástico para residuos.
- Los materiales usados se pondrán en el recipiente con hipoclorito y deben quedar totalmente inmersos en el líquido.

- Los materiales descartables se colocarán en bolsas de plástico y se incinerarán.
- Los materiales no descartables se dejarán toda la noche en hipoclorito y luego se deberán autoclavar.
- Los grandes volúmenes de orina y otros líquidos contaminados deben tratarse con hipoclorito concentrado, la mezcla se deja durante toda la noche y al día siguiente se arroja por el desagüe destinado a la evacuación.
- También pueden esterilizarse los líquidos en autoclave.
- En caso de muestras consideradas **"muy peligrosas"**, suero u otros líquidos infectados, deben pasarse a frascos con tapón roscado de vidrio, que se pondrán en un recipiente metálico con agua y se esterilizarán en autoclave.
- El hipoclorito se deberá renovar diariamente, se probará varias veces al día, con un papel de yoduro de almidón que dará una reacción azul oscuro mientras el producto sea activo.
- Al final de cada jornada, se enjuagará con hipoclorito diluido la superficie de la mesada y se verterá una pequeña cantidad por el desagüe de las piletas.
- Como las probabilidades de errores y/o accidentes aumentan cuando en el lugar de trabajo se aglomeran distintos equipos y materiales, debe mantenerse el laboratorio en orden y con adecuada limpieza diaria.

## 6) MEDIDAS EN CASO DE ACCIDENTES

- En cortes, raspaduras o pinchazos : lavarse inmediatamente con agua y jabón.
- Salpicadura en los ojos : enjuagar inmediatamente con agua o solución fisiológica, manteniéndolos abiertos.
- Aspiración de material sospechoso ó salpicaduras en la boca : enjuagarse repetidamente con agua, sin efectuar ningún movimiento de deglución.
- Manchas de sangre en la piel : lavar con hipoclorito diluido y luego con agua y jabón.
- Las salpicaduras de sangre o de otros materiales procedentes de enfermos, se frotarán sin pérdida de tiempo con solución diluida de hipoclorito.
- En caso de inoculación accidental si el individuo no estuviera vacunado contra HBV, debe practicarse inmediatamente inmunización pasiva-activa. Ello consiste en administrar simultáneamente Gammaglobulina Hiperinmune (HBIg) y vacuna contra el HBV.

## 7) DESINFECCION Y ESTERILIZACION.

- Los tratamientos esterilizantes (esporicidas) inactivan al HBV.
- Si bien los efectos del tratamiento de desinfección son en su mayor parte empíricos, aquellos que son esporicidas también inactivan al HBV. Un tratamiento que inactive total ó parcialmente la reactividad inmunológica del HBsAg, también inactivaría al HBV.
- Para un buen tratamiento de desinfección hay que tener en cuenta el producto químico adecuado, su concentración y el tiempo eficiente de contacto.
- Ciertos desinfectantes (alcoholes, fenoles, iodo, compuesto de amonio cuaternario, mercuriales) no son recomendados porque carecen de actividad esporicida, tienen inconvenientes para aplicarse a objetos del medio ambiente (rápida evaporación, corrosividad) ó son ineficaces contra HBV.

La tabla 1 da una clasificación de desinfectantes de acuerdo a su nivel de actividad. (Spaulding, 1972).

**TABLA 1**

AGENTE QUIMICO	NIVEL DE ACTIVIDAD POSIBLE		
	BAJO	INTERMEDIO	ALTO
Oxido de Etileno (gas)			+
Formaldehído 3% (sol. Acuosa)		+	
Formaldehído 8% (sol. Acuosa)			+
Formaldehído 8% y 70% en alcohol			+
Glutaraldehído 2% (sol.acuosa a calina)			+
Compuestos clorados 500/5000 ppm *(1)		+	
Iodoformo 500/5000 ppm *(1)		+	
Etanol isopropanol 70/90% *(2)		+	
Fenoles 1/3% *(2)		+	
Compuestos con Amonio Cuaternario *(2)	+		

\*(1) Halógeno Libre.

\*(2) No recomendables como desinfectantes para contaminación con HBV.

\*(3) Dependiendo del período de exposición, temperatura y ausencia de desechos orgánicos.

Spaulding y Groschel (1974) establecieron los requerimientos para una buena esterilización y desinfección para los distintos elementos del medio ambiente, clasificando estos últimos en: **críticos**, **semicríticos** y **no críticos**, basándose en el grado de posibilidad de contacto directo de éstos con lastimaduras ó mucosas.

Las normas a seguir se detallan en la Tabla 2.

**TABLA 2**

OBJETOS	DESINFECCION		ESTERILIZACION
	No crítico : contacto elementos c/piel y mucosas: no usual	Crítico:contacto de elementos c/piel y mucosas: frecuente	Elementos que penetran en piel y mucosas
Superficies duras y lisas	C>30' E-I>10'	C,E,I>30'	A,B,D,E 12 hs. F,G 10 hs.
Gomas	C>30' E-I>10'	C-E,I>30' *	A,D
Plásticos	C>30' E-I >10'	C,E,I>30' *	A,D,E 12 hs. F,I 10 hs.
Instrumentos de vidrio	.-	E-I>30'	D E 12 hs. G 10 hs.
Termómetros	.-	E-I>30'	D E 12 hs. F-G 10 hs.
Instrumentos metálicos	C>30' E-G-I>10'	C >30' E-G,I>30'	D E 12 hs. F,G 10 hs.
Sup. del medio amb. (pisos,paredes, mesadas, etc.)(**)	E-I>10'		

- Dependiendo de la estabilidad térmica.

\*\* Reconociendo que una pequeña dosis es infectiva y que la estabilidad ambiental del HBV en distintas superficies y en ambientes de alto riesgo, es alta, los elementos pueden fácilmente contaminarse directa ó indirectamente, pertenezca a uno ó a otro ítem (Crítico - No Crítico).

## REFERENCIAS.

**CALOR** :Los valores dados son, por el período de aplicación de la temperatura, en las áreas más ocluidas. Ver manual en cada caso, para constatar la compatibilidad del material con el calor.

**A - Vapor a presión (Autoclave)** 121°C 15 libras15'

126°C20 libras10'

134°C29 libras 3'

**B - Horno seco (Estufa)** 121°C16 horas

140°C 3 horas

160°C 2 horas

170°C 1 hora

**C - Agua Hirviendo** > 98°C 30'

**QUIMICOS** : Algunos son muy corrosivos, por eso debe constatarse con pequeñas dosis, la concentración a usar sobre un material determinado **D-Oxido de**

Etileno (gas) 3-16 hs (depende del objeto)

**E-Formalina** al 20% en sol.acuosa (formaldehído 8%)

**F-Formalina** al 20% en 70% de alcohol.

**G-Solución acuosa de glutaraldehído alcalinizado 2% H - Hipoclorito de Sodio** : 500/5000 ppm (0.05/0.5% de cloro libre).

La lavandina de uso doméstico generalmente es una solución al 5%, pero a veces las conc. son al 2% .

Es altamente corrosiva para metales. Como el hipoclorito es inestable, la solución de trabajo debe prepararse diariamente.

**I- Iodoformo** : 500/5000 ppm (0.05/0.5% de iodo activo).

Los productos comerciales son al 1% .

# ANEXO I

## RESUMEN DE HISTORIA CLINICA (según médico tratante )

**FECHA :**  
 Apellido : \_\_\_\_\_ Nombres : \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo : \_\_\_\_\_  
 Domicilio : \_\_\_\_\_  
 Profesión /Ocupación : \_\_\_\_\_  
 Hospital : \_\_\_\_\_ Sala : \_\_\_\_\_ Cama: \_\_\_\_\_  
 Enviado por Dr /a: \_\_\_\_\_ Tel./ fax \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES :** 1º VEZ \_\_\_\_\_ 2º VEZ \_\_\_\_\_ 3º VEZ \_\_\_\_\_ .....º VEZ/ FECHA ULTIMA VEZ \_\_\_\_\_

**TIEMPO DE EVOLUCION :** días  meses  años  Cuantos? .....  
 desconocido

**DIAGNOSTICO PRESUNTIVO :** Hepatitis  aguda  crónica   
 c. activa  c. persist.  cirrosis  HCC   
 fulminante  autoinmune  tóxica  desconocido   
 otros: .....

**ENFERMEDAD ACTUAL :** sintomática  asintomática

ICTERICIA : SI - NO \_\_\_\_\_ ESPLENOMEGALIA : SI - NO \_\_\_\_\_ HEPATOMEGALIA : SI - NO \_\_\_\_\_ ASCITIS : SI - NO \_\_\_\_\_

**HEPATOGRAMA ( FECHA ) :**  
 Bt: \_\_\_\_\_ Bd: \_\_\_\_\_ ALAT : \_\_\_\_\_ ASAT : \_\_\_\_\_ F. ALC : \_\_\_\_\_ GGT : \_\_\_\_\_ CHE : \_\_\_\_\_ T. PROT. : \_\_\_\_\_  
 V.N. : ..... V.N. : ..... V.N. : ..... V.N. : ..... V.N. : .....

**EPIDEMIOLOGIA :** parenteral  enteral  sexual  vertical   
 desconocida  otra : .....

**GR. RIESGO :** DEV.  transfus  transpl  pers. salud  HIV   
 hemod:  cirugía  homosex  familiar  desconoc.   
 otro : .....

**PROBABLE FUENTE DE CONTAGIO :** .....

**OTRAS ENFERMEDADES IMPORTANTES Y/O ASOCIADAS :** .....

**GAMMAGLOBULINAS :** SI - NO \_\_\_\_\_  
 HBIG  NSIG  FECHA : \_\_\_\_\_ Nº Dosis \_\_\_\_\_ FECHA ULTIMA DOSIS \_\_\_\_\_

**VACUNAS :** SI - NO \_\_\_\_\_  
 HBV FECHA : \_\_\_\_\_ Nº Dosis \_\_\_\_\_ FECHA ULTIMA DOSIS \_\_\_\_\_  
 HAV FECHA : \_\_\_\_\_ Nº Dosis \_\_\_\_\_ FECHA ULTIMA DOSIS \_\_\_\_\_

**TRATAMIENTO :** SI - NO \_\_\_\_\_  
 INTERFERON : FECHA COMIENZO \_\_\_\_\_ FINALIZO : SI - NO \_\_\_\_\_  
 ANTIVIRALES: FECHA COMIENZO \_\_\_\_\_ FINALIZO : SI - NO \_\_\_\_\_

**HALLAZGOS QUIRURGICOS :** (Biopsia ) (fecha ) : .....

**OTROS DATOS DE INTERES :** embarazo  pretrat.  postrat  pretranspl.   
 postranspl.  prevacuna  otro: .....

**RESULTADOS ANTERIORES (MARCADORES VIRALES ) SI - NO**  
**REALIZADOS EN :** \_\_\_\_\_ **FECHA :** \_\_\_\_\_

HAV		HBV						HCV				HDV	HEV
IgM	IgG	HBsAg	Δ HBs	anti HBc IgM IgG	HBeAg	antiHBe	DNA w m	IgM	IgG	LIA o RIBA	RT-PCR 1ºr 2ºr		

**ESTUDIOS SOLICITADOS PARA :**  
 HAV  HBV  HCV  HDV  HEV

**FIRMA MEDICO TRATANTE :** .....

## ANEXO II

### Protocolo clínico - epidemiológico para vacunación contra HBV :

Ficha N°: \_\_\_\_\_

#### 1.DATOS GENERALES

NUMERO DE CODIGO : \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_ AÑOS                      SEXO : FEMENINO                      MASCULINO

LUGAR DE NACIMIENTO : \_\_\_\_\_

OCUPACION : \_\_\_\_\_ ESPECIALIDAD : \_\_\_\_\_

DOMICILIO : \_\_\_\_\_ CP : \_\_\_\_\_ TE : \_\_\_\_\_

DOMICILIO TRABAJO : \_\_\_\_\_ TE: \_\_\_\_\_

SERVICIO : \_\_\_\_\_

#### 2.ANTECEDENTES PATOLOGICOS

HEPATITIS VIRAL (FECHA) :

CONFIRMACION SEROLOGICA : HAV : \_\_\_\_\_ HBV: \_\_\_\_\_ HCV : \_\_\_\_\_

OTRAS : \_\_\_\_\_

EPISODIOS FAMILIARES DE HEPATITIS: \_\_\_\_\_

#### 3.HISTORIA EPIDEMIOLOGICA :

##### a) CONTACTOS

###### •CON PERSONAS ICTERICAS PREVIOS

A LA TOMA DE MUESTRA : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

• EN LUGAR DE TRABAJO : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

• FAMILIARES : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

• EN OTROS LUGARES Y/O CIRCUNSTANCIAS : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

##### b) INOCULACIONES PREVIAS A LA TOMA DE MUESTRA :

###### ACCIDENTES CON ELEMENTOS

CORTANTES O PUNZANTES: \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

INYECCIONES : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

VACUNAS: \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

PRUEBAS INTRADERMICAS : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

TATUAJES : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

ACTOS QUIRURGICOS : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

EXAMEN O EXTRACCIONES DENTALES : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

EXAMEN DE LABORATORIO : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

TRANSFUSION DE SANGRE O DERIVADOS : \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

OTRAS ALTERNATIVAS SIMILARES: \_\_\_\_\_ FECHA : \_\_\_\_\_

#### 4.FECHA DE OBTENCION DE LA MUESTRA :

#### 5.RESULTADOS :

HbsAg: \_\_\_\_\_ anti-Hbe: \_\_\_\_\_

HbeAg: \_\_\_\_\_ anti-HBs: \_\_\_\_\_

anti-HBc : \_\_\_\_\_ anti-HBc Ig M: \_\_\_\_\_

1<sup>ra</sup> dosis : \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

2<sup>da</sup> dosis : \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

3<sup>ra</sup> dosis : \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

**ANEXO III**  
**PANEL DE CONTROL DE CALIDAD VII .**  
**SEROLOGIA PARA HEPATITIS B Y C.**

VOL : 1 ml POR TUBO. VTO : ABRIL 2000.

Sugerencia : alicuotar y congelar para evitar contaminación!

LABORATORIO ( UCR ) :

FAX/s y TE/s :

RESPONSABLE/S :

FECHA DE REALIZACION DEL CONTROL :

OPERADOR/ES :

TECNICA/S :

VENCIMIENTO :

Equipo marca técnica y vencimiento	HBsAg	Ab mtra(*)	V.Corte(*)	Resultado	Observaciones
	TUBO N° 1				
	TUBO N° 2				
	TUBO N° 3				
	TUBO N° 4				
	TUBO N° 5				

Equipo marca técnica y vencimiento	AntiHBc	Ab mtra(*)	V.Corte(*)	Resultado	Observaciones
	TUBO N° 1				
	TUBO N° 2				
	TUBO N° 3				
	TUBO N° 4				
	TUBO N° 5				

Equipo marca técnica y vencimiento	AntiHCV	Ab mtra(*)	V.Corte(*)	Resultado	Observaciones
	TUBO N° 1				
	TUBO N° 2				
	TUBO N° 3				
	TUBO N° 4				
	TUBO N° 5				

(\*) si corresponde, sino poner NA (no aplicable).

FECHA Y FIRMA DEL RESPONSABLE :

## Bibliografía

- \*Gonzalez,J ; Posadas, M A ; Planes,E . Guía de Bioseguridad en el Laboratorio.
- \*Hepatitis C : Diagnostic Assays. Seminars in Liver Disease. Vol 15. No 1. 1995. 33-40
- \*Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serologic de los Bancos de Sangre. Organización Panamericana de la Salud. Febrero 1994
- \*Roisman b. MonathT ; Chanok R, HirschM ; Melnik J. Virology (Second Edition) Fields,B Knipe, D y col. Raven Press. N.Y. 1990.
- \*Viral Hepatitis and Liver Disease. Proceedings of the 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Contemporary Issues and Future Prospects.
- \*Rational use of diagnostic tools in hepatitis C. Journal of Hepatology;1996, 24 (suppl2) 26-34
- \*The treatment of chronic viral hepatitis. Drug Therapy vol. 336 No 5 347-355
- \*"The five viruses : a perspective" F. Blaine Hollinger, MD. Baylor College of Medicine, Houston, TX,USA.En :VIRAL HEPATITIS A TO F : AN UPDATE. Postgraduate Course. November 11-12, 1994. Sheraton Chicago Hotel and Towers.Chicago, Illinois. USA. AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES.
- \*MICROBIOLOGÍA BIOMEDICA. De Torres, Coto, Basualdo  
Capítulo 90. Hepatitis Virales. Dr Jorge E. Gonzalez.
- \*Documento distribuido en la 1ra Reunión Anual de Unidades Centinela.  
GRUPO ASESOR EN HEPATITIS VIRALES. Diciembre 1992.  
Instituto Nacional de Microbiología "Dr C.G. Malbrán". Bs. As.