



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA TECNOLOGÍA MÉDICA

ESPECIALIDAD LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

TÍTULO:

“DETERMINACIÓN DEL AgBs COMO AYUDA AL DIAGNOSTICO DE HEPATITIS
B EN LAS TRABAJADORAS SEXUALES QUE ACUDEN AL CENTRO DE SALUD
N°1, ÁREA GUANO-PENIPE EN ENERO A JUNIO 2012”

AUTORAS:

ROSA KARINA LEMA SAMANIEGO
MARÍA JOSÉ MARCHÁN HERNÁNDEZ

TUTOR(S):

Licenciada Ximena Robalino

DEDICATORIA

Primero a Dios y a mi padre que desde el cielo me permite realizar este trabajo, a mis viejitos que son mi vida y han estado presentes en todo momento, a mi madre, hermano por último a esa persona especial gracias a todos por el apoyo, la paciencia. Los amo.

Rosita

A mis progenitores, de manera especial a mi madre que con su cariño y ejemplo supo dirigirme en mi trayectoria estudiantil, a mis hermanos, que con sus ocurrencias me daban la fuerza para seguir adelante, a mi abuelito que esta en el cielo que desde ahí me manda sus bendiciones.

Ma. José

AGRADECIMIENTO

A nuestras familias el aliento, la fuerza, la comprensión y la paciencia puesta en nuestro caminar durante la realización de este trabajo y de nuestra vida estudiantil, a esas personas especiales que sin saberlo han sido nuestro mayor apoyo en momentos difíciles, gracias por las palabras de aliento y consejos.

Rosita Lema

Ma. José Marchán

RESUMEN

En el presente trabajo se podrá encontrar de manera muy franca y concisa algunas de las temáticas que se refieren a la determinación de antígenos de superficie de Hepatitis B, la cual es una enfermedad viral principalmente en humanos, que puede producir secuelas muy graves y hasta la muerte de los infectados si no se ha tratado oportunamente, para esto se empezará por dar a conocer la anatomía, fisiología y patología del órgano afectado, continuando se describirá la realización de la prueba de laboratorio por el método de ELISA, que es un análisis de screening, el cual se utiliza para obtener una información rápida sobre la patología, siendo este el pilar fundamental para esta tesina y finalmente se realizará un estudio estadístico con los datos obtenidos de las muestras de sangre que ingresaron al Laboratorio del Centro de Salud N° 1 Guano-Penipe y en base a este estudio comparativo se presentan las respectivas conclusiones y recomendaciones.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	2
1 PROBLEMATIZACIÓN	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	3
CAPÍTULO II	5
2 MARCO TEÓRICO	5
2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL.....	5
2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.2.1 EL HÍGADO	5
2.2.2 ANTIGENOS.....	13
2.2.3 ANTICUERPOS	15
2.2.4 ENFERMEDADES DEL HÍGADO	17
2.2.5 LA HEPATITIS	17
2.2.6 HEPATITIS B	20
2.2.7 DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS B.....	23
2.2.8 ELISA	27
2.2.9 ANALIZADOR DE ELISA	32
2.3 DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS	37
2.4 HIPOTESIS Y VARIABLE	40
2.4.1 HIPOTESIS.....	40
2.4.2 VARIABLES	40
2.5 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	41
CAPÍTULO III	42
3 MARCO METODOLÓGICO	42

3.1 MÉTODO	42
3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	42
3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	42
3.1.3 TIPO DE ESTUDIO	43
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	43
3.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	43
3.4 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	44
3.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	50
3.5.1 INTERPRETACION DE LOS CALCULOS	51
3.5.2 INTERPRETACION DE RESULTADOS	51
3.6 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS	52
CAPITULO IV	53
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
4.1 CONCLUSIONES.....	53
4.2 RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFIA.	55
ANEXOS	56

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: MNC (MEDIA DE CONTROLES NEGATIVOS).....	44
TABLA 2: MNP (MEDIA DE CONTROLES POSITIVOS)	44
TABLA 3: VALOR DE CUT OFF	45
TABLA 4: RESULTADOS DE LA CORRIDA DE LA PRUEBA DE AGBS	46
TABLA 6: VERIFICACIÓN DE LOS CRITERIOS DE RESULTADOS	50
TABLA 7: PORCENTAJE DE AGBS POSITIVOS Y NEGATIVOS	51

INDICE DE GRÁFICOS

FIGURA 1: EL HIGADO	5
FIGURA 2: ANATOMÍA HEPÁTICA	6
FIGURA 3: LOCALIZACIÓN DEL HIGADO	7
FIGURA 4: HEPATOCITO.....	9
FIGURA 5: VIRUS.....	11
FIGURA 6: ESQUEMA DE ANTICUERPO.....	15
FIGURA 7: RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	16
FIGURA 8: PRUEBA RÁPIDA PARA HEPATITIS B	25
FIGURA 9: ELISA KITS	26
FIGURA 10: LECTOR DE ELISA	32
FIGURA 11: ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS CON RELACION AL PUNTO DE CORTE	47
FIGURA 12: ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS CON RELACION AL PUNTO DE CORTE.....	48
FIGURA 13: ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS CONFIRMADAS CON RELACION AL PUNTO DE CORTE.....	49
FIGURA 14: RELACIÓN PORCENTUAL DE MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS.....	52
FIGURA 15: REGISTRO DE LA PACIENTE	56
FIGURA 16: TOMA DE MUESTRA	56
FIGURA 17: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	56
FIGURA 18: SEPARACIÓN DE SUERO PARA ALMACENARLO EN REFRIGERACIÓN -4°C	57
FIGURA 19: DETERMINACION DE HEPATITIS B CON ELISA	57
FIGURA 20: PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS	60
FIGURA 21: TECNICA DE HUMAN	62
FIGURA 22: PROCEDIMIENTO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS	64
FIGURA 23: HOJA DE ABSORVANCIAS DE LAS MUESTRAS.ANEXO.....	64
FIGURA 24: PRUEBAS CONFIRMANTORIAS	66

INTRODUCCIÓN

La hepatitis B es una enfermedad inflamatoria del hígado, producida por el virus de la hepatitis B (VHB) y caracterizada por diversos signos y síntomas de comienzo rápido o bien de curso leve o asintomático. El virus se transmite a través de suero contaminado, secreciones o empleo de agujas o instrumentos contaminados, saliva, exudado de heridas, secreciones cervicales o seminales, transfusiones, exposición de mucosas a sangre o fluidos corporales, contacto percutáneo con objetos inanimados contaminados, transmisión materna fetal, relaciones heterosexuales y homosexuales.

El virus de hepatitis B es un virus DNA de tamaño medio. Es capaz de inducir hepatitis aguda o crónica, siendo también causa importante en la morbilidad y mortalidad por enfermedad hepática alrededor del mundo. Está descrito que, dependiendo de ciertos factores, el 95 % de pacientes con hepatitis crónica se puede conducir a cirrosis, carcinoma hepatocelular y muerte.

El riesgo de infección por la hepatitis B es más un factor de exposición ante la sangre, que de exposición con el paciente. Sólo del 3 al 5 % de los adultos con hepatitis B aguda van a progresar a una infección crónica, y estos individuos son identificados por la presencia del antígeno de superficie de hepatitis B (AgBs) en sangre, seis meses después de la infección.

Por lo anteriormente expuesto y tomando en cuenta que la hepatitis B es una de las infecciones virales en las que en el transcurso de los años van apareciendo miles de casos nuevos y que su epidemiología es a nivel mundial, se decidió realizar el siguiente estudio tratando de determinar la presencia de la infección por este virus en las trabajadoras sexuales sanas o las que presentan las características clínicas o complicaciones, desde Enero a Junio 2012 en el Centro de Salud N°1 Área Guano – Penipe.

CAPÍTULO I

1 PROBLEMATIZACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prostitución desde años atrás ha sido uno de los trabajos más antiguos del mundo y que se define como el acto de participar en actividades sexuales a cambio de dinero o bienes. Aunque esta actividad es llevada a cabo por miembros de ambos sexos, es más a menudo por las mujeres.

Ya que las prostitutas o trabajadoras sexuales mantienen habitualmente relaciones con un elevado número de clientes, se las asocia con la difusión de enfermedades de transmisión sexual. Entre éstas, el sida, sífilis, hepatitis B las de mayor riesgo.

En el presente trabajo de investigación se trata a esta enfermedad del hígado causada por el virus de la hepatitis B, es infección de transmisión sexual causada por este virus y caracterizada por necrosis hepatocelular e inflamación además de ser asintomática en los procesos iniciales de la enfermedad.

Por esta razón hemos visto la necesidad de utilizar como medios de protección las revisiones médicas y sobre todo la realización de la prueba de AgBs en este tipo de personas, así evitaremos la propagación de la enfermedad en las personas que acuden a estos lugares de diversión y así se evitara la tasa de mortalidad de personas a causa de esta enfermedad infecciosa de transmisión sexual.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo ayuda la determinación del AgBs al diagnóstico de Hepatitis B en las trabajadoras sexuales que acuden al Centro de Salud N°1, Área Guano-Penipe?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de AgBs como ayuda al diagnóstico de Hepatitis B en las trabajadoras sexuales que acuden al Centro de Salud N°1 Área Guano – Penipe.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Conocer la anatomía fisiología del hígado y las características de la Hepatitis B (patología)
- ✓ Aplicar el método de Elisa para la determinación del Antígeno de superficie de las pacientes (trabajadoras sexuales)
- ✓ Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos para establecer un patrón de positividad y negatividad en la población en riesgo

1.4 JUSTIFICACIÓN

Mediante un sondeo verbal pudimos percatarnos que población de las trabajadoras sexuales está en alto grado de riesgo ya que esta enfermedad puede estar presente en el medio que ellas se relacionan y desconocen de la existencia de la misma.

La accesibilidad a las pacientes y las vías de transmisión (sexual) del virus es lo que motiva al tratamiento de este tema en el presente trabajo y su implicación en relación con el mundo de la prostitución.

El propósito de esta investigación pretende determinar la cantidad de trabajadoras sexuales que presentan la enfermedad, los factores que pueden afectar a la especie humana durante todo el proceso y recalcar la importancia de la prevención en el contagio de la hepatitis B.

El beneficio de esta investigación será el diagnóstico oportuno, la concientización a los Centros de Salud de la importancia de la adición de este análisis para el expendio del permiso de funcionamiento de las trabajadoras sexuales.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

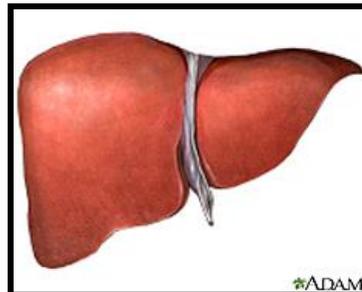
2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL

Este trabajo de investigación está basado en la técnica del pragmatismo ya que se va a realizar el estudio de la hepatitis B en las trabajadoras sexuales mediante la prueba de antígeno de superficie como ensayos prácticos para correlacionar la teoría.

2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.2.1 EL HÍGADO

FIGURA 1: EL HIGADO



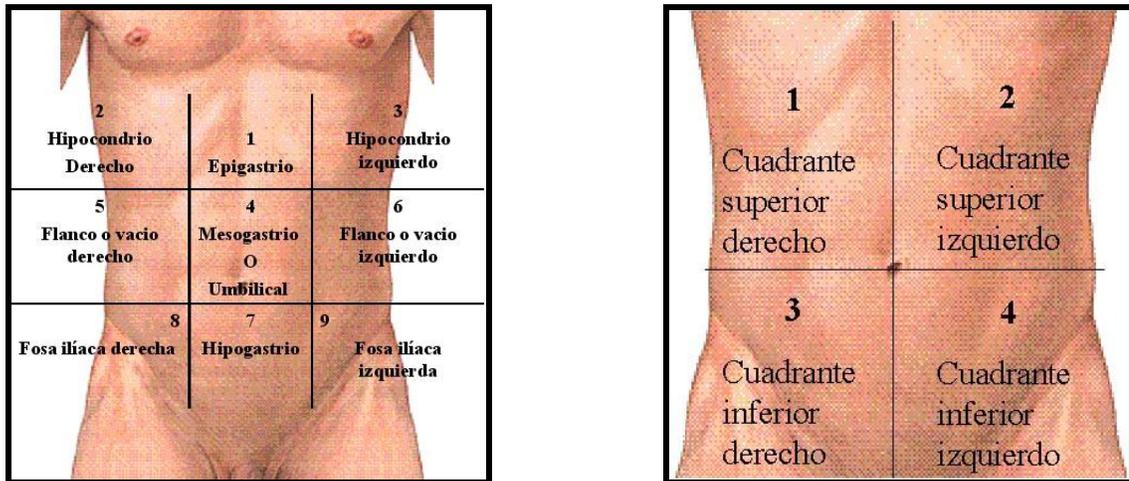
Fuente: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/liverdiseases.html>

EL HIGADO Y CONCEPTO

El hígado es un órgano o víscera más voluminosa presente en los vertebrados y en algunos otros animales, a la vez es la glándula más voluminosa de la anatomía y una de las más importantes en cuanto a la actividad metabólica del organismo, desempeña funciones únicas y vitales como la síntesis de proteínas plasmáticas, función desintoxicante, almacena vitaminas, glucógeno, entre otros para el buen funcionamiento de las defensas. (www.juntadeandalucia.es)

ANATOMÍA HEPÁTICA

FIGURA 2: ANATOMÍA HEPÁTICA



Fuente: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/anatomia/computo/higado/index2.html>

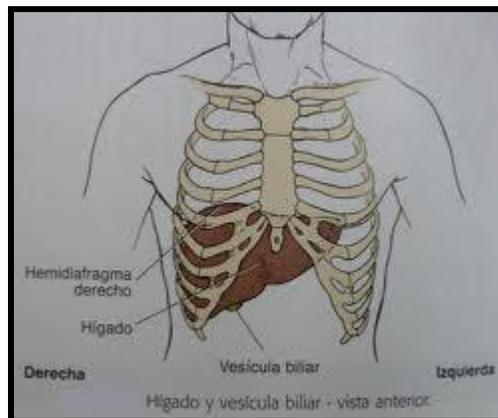
El hígado se localiza en casi la totalidad de la región del hipocondrio derecho, el epigastrio (no sobrepasa el límite del reborde costal, salvo en un cuadro de hepatomegalia) y una porción del hipocondrio izquierdo.

Llenando el espacio de la cúpula diafragmática, donde puede alcanzar hasta la quinta costilla, y se relaciona con el corazón a través del centro frénico, a la izquierda de la vena cava inferior. El hígado situado debajo del diafragma comprende tres compartimientos peritoneales, llámense: compartimiento subfrénico derecho o hepático, compartimiento sub-frénico izquierdo o esplénico, y compartimiento medio o celiaco.

Su consistencia es blanda y depreciable, y está recubierto por una cápsula fibrosa, sobre la cual se aplica el peritoneo, parte de la superficie del hígado (excepto en el área desnuda del hígado, que corresponde a su superficie postero-superior).

ASPECTOS GENERALES

FIGURA 3: LOCALIZACIÓN DEL HIGADO



Fuente: <http://www.google.com.ec>

- ✓ Forma: Su forma es semiovoidea, con dos extremidades, la más gruesa está dirigida a la derecha. (<http://www.facmed.unam.mx>)
- ✓ Coloración: rojo pardo.
- ✓ Consistencia: friable (desgarrable). Está constituido por un parénquima, rodeado por una fina cápsula fibrosa, llamada cápsula de Glisson.
- ✓ Longitud: en el adulto mide aproximadamente 26 cm (horizontal) por 15 cm (vertical) en sentido anteroposterior, y 8 cm de espesor a nivel del lóbulo derecho.
- ✓ Peso aproximado: 2 kg.

Está dividido en cuatro lóbulos:

- ✓ Lóbulo derecho, situado a la derecha del ligamento falciforme
- ✓ Lóbulo izquierdo, extendido sobre el estómago y situado a la izquierda del ligamento falciforme
- ✓ Lóbulo cuadrado, visible solamente en la cara inferior del hígado; no se encuentra limitado por el surco umbilical a la izquierda, el lecho vesicular a la derecha y el hilio del hígado por detrás

FISIOLOGÍA DEL HÍGADO

El hígado desempeña múltiples funciones en el organismo como son:

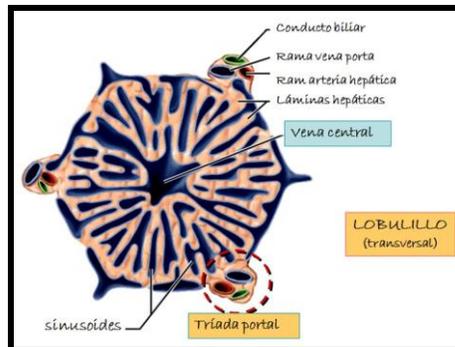
- ✓ Producción de bilis: el hígado excreta la bilis hacia la vía biliar, y de allí al duodeno. La bilis es necesaria para la digestión de los alimentos.
- ✓ Metabolismo de los carbohidratos: La gluconeogénesis es la formación de glucosa a partir de ciertos aminoácidos, lactato y glicerol.
- ✓ La glucogenólisis es la fragmentación de glucógeno para liberar glucosa en la sangre.
- ✓ La glucogenogénesis o glucogénesis es la síntesis de glucógeno a partir de glucosa.
- ✓ Metabolismo de los lípidos.
- ✓ Síntesis de colesterol.
- ✓ Producción de triglicéridos.
- ✓ Síntesis de proteínas, como la albúmina y las lipoproteínas.
- ✓ Síntesis de factores de coagulación como el fibrinógeno (I), la protrombina (II), la globulina aceleradora (V), proconvertina (VII), el factor antihemofílico B (IX) y el factor Stuart-Prower (X).
- ✓ Desintoxicación de la sangre: Neutralización de toxinas, la mayor parte de los fármacos y de la hemoglobina.
- ✓ Transformación del amonio en urea.
- ✓ Depósito de múltiples sustancias, como: glucosa en forma de glucógeno (un reservorio importante de aproximadamente 150 g); vitamina B12, hierro, cobre.

HISTOLOGÍA HEPÁTICA

El tejido hepático es un tejido estable, presenta una gran capacidad de regeneración en respuesta a estímulos externos.

Sin embargo, las lesiones crónicas como el alcoholismo y las infecciones hepáticas implican una pérdida constante y prolongada del parénquima, sin la proliferación compensatoria necesaria. En consecuencia, el parénquima hepático es reemplazado por tejido fibroso y acúmulos de grasa, produciendo así cirrosis.

FIGURA 4: HEPATOCITO



Fuente: plantaodemedico.blogspot.com

El parénquima hepático está formado por: Lobulillos hepáticos: son subunidades irregularmente hexagonales formadas por láminas fenestradas de hepatocitos que se disponen en forma radiada en torno a una vena central o vena centrolobulillar, ubicada en el centro del lobulillo ([es.wikipedia.org/wiki/Hígado](http://es.wikipedia.org/wiki/H%C3%ADgado))

Espacios porta o triadas: son áreas triangulares situadas en los ángulos de los lobulillos hepáticos, constituidas por un estroma conjuntivo laxo; contienen en su interior una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un capilar linfático y un conductillo biliar; la bilis producida por los hepatocitos se vierte en una red de canalículos dentro de las láminas de hepatocitos y fluye, en forma centrípeta al lobulillo, hacia los conductillos biliares de los espacios porta.

Sinusoides hepáticos: son capilares que se disponen entre las láminas de hepatocitos y donde confluyen, desde la periferia de los lobulillos, las ramas de la arteria hepática y de la vena porta; la sangre fluye desde las triadas hasta la vena central, circulando en forma

centrípeta; la pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas, que carecen de membrana basal. En las sinusoides confluyen la circulación hepática y porta. Éstos drenan su contenido a la vena hepática central, de ésta a las venas hepáticas derecha e izquierda, y finalmente a la vena cava inferior.

Espacio de Disse: es un estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de las sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos. En el espacio de Disse se produce el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma donde se forma la abundante linfa hepática. En este espacio también se encuentran células estrelladas hepáticas o células de Ito, de forma estrellada y su función es almacenar vitamina A (al ser la Vit. A liposoluble, hace que en las preparaciones de H&E, se vea como un adipocito), regula y produce Tejido Conectivo.

Células de Kupffer: son macrófagos fijos pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear que se encuentran adheridos al endotelio y que emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Su función es fagocitar eritrocitos envejecidos (en un 20%, y el 80% en el bazo) y otros antígenos. Además actúan como células presentadoras de antígeno. (<http://medicinafarmacologia.blogspot.com/2009/12/celulas-de-kupffer.html>)

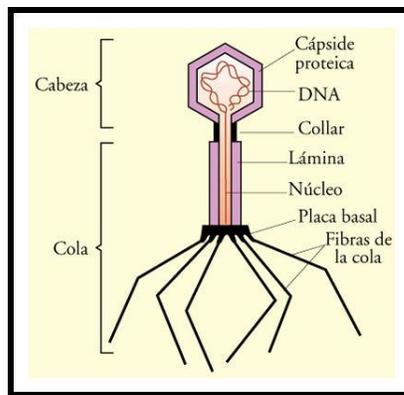
Hepatocitos: constituyen alrededor del 80 por ciento de la población celular del tejido hepático. Son células poliédricas con 1 o 2 núcleos esféricos poliploides y un nucléolo prominente. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos, y son muy ricos en orgánulos. Además, en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. La membrana plasmática de los hepatocitos presenta un dominio sinusoidal con microvellosidades que mira hacia el espacio de Disse y un dominio lateral que mira hacia el hepatocito vecino. Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos delimitan un canalículo donde será secretada la bilis. La presencia de múltiples orgánulos en el hepatocito se relaciona con sus múltiples funciones: la síntesis de proteínas (albúmina, fibrinógeno y lipoproteínas del plasma), el metabolismo de hidratos

de carbono, la formación de bilis, el catabolismo de fármacos y tóxicos y el metabolismo de lípidos, purinas y gluconeogénesis.

VIRUS

Es un agente infeccioso microscópico que sólo puede multiplicarse dentro de las células de otros organismos. Los virus infectan todos los tipos de organismos, desde animales y plantas, hasta bacterias y arqueas. Los virus son demasiado pequeños para poder ser observados con la ayuda de un microscopio óptico, por lo que se dice que son submicroscópicos. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Virus>).

FIGURA 5: VIRUS



Fuente: www.botanica.cnba.uba.ar

Los virus se diseminan de muchas maneras diferentes y cada tipo de virus tiene un método distinto de transmisión. Entre estos métodos se encuentran los vectores de transmisión, que son otros organismos que los transmiten entre portadores. Los virus vegetales se propagan frecuentemente por insectos que se alimentan de su savia, mientras que los virus animales se suelen propagar por medio de insectos hematófagos. Por otro lado, otros virus no precisan de vectores. No todos los virus provocan enfermedades, ya que muchos virus se reproducen sin causar ningún daño al organismo infectado.

ESTRUCTURA

Presentan una amplia diversidad de formas y tamaños, son unas 100 veces más pequeñas que las bacterias. La mayoría de los virus estudiados tienen un diámetro de entre 10 y 300 nanómetros, algunos de virus no pueden ser observados con un microscopio óptico de manera que se utilizan microscopios electrónicos de barrido y de transmisión para visualizar partículas víricas para aumentar el contraste entre los virus y el trasfondo se utilizan tinciones densas en electrones, son soluciones de sales de metales pesados como wolframio, que dispersan electrones en las regiones cubiertas por la tinción, cuando las partículas víricas están cubiertas por la tinción (tinción positiva) oscurecen los detalles finos. La tinción negativa evita este problema, tiñendo únicamente el trasfondo.

En general, hay cuatro tipos principales de morfología vírica: (<http://es.wikipedia.org/wiki/Virus>)

Helicoidal: Las cápsides helicoidales se componen de un único tipo de capsómero apilado alrededor de un eje central para formar una estructura helicoidal que puede tener una cavidad central o un tubo hueco, esta formación produce viriones en forma de barra o de hilo, pueden ser cortos y muy rígidos, o largos y muy flexibles. El material genético, normalmente ARN monocatenario, pero a veces ADN monocatenario, queda unido a la hélice proteica por interacciones entre el ácido nucleico con carga negativa y la carga positiva de las proteínas. En general, la longitud de una cápside helicoidal está en relación con la longitud del ácido nucleico que contiene, y el diámetro depende del tamaño y la distribución de los capsómeros.

Icosaédrica: La mayoría de virus que infectan los animales son icosaédricos o casi-esféricos con simetría icosaédrica. Un icosaedro regular es la mejor manera de formar una carcasa cerrada a partir de subunidades idénticas. El número mínimo requerido de capsómeros idénticos es doce, cada uno compuesto de cinco subunidades idénticas.

Muchos virus, como los rotavirus, tienen más de doce capsómeros y parecen esféricos, manteniendo esta simetría. Los ápices de los capsómeros están rodeados por otros cinco capsómeros y reciben el nombre de pentones. Las caras triangulares de éstos también se componen de otros seis capsómeros y reciben el nombre de hexones.

Envoltura: Algunas especies de virus se envuelven en una forma modificada de una de las membranas celulares, o bien es la membrana externa que rodea una célula huésped infectado, o bien membranas internas como la membrana nuclear o el retículo endoplasmático consiguiendo así una bicapa lipídica exterior conocida como envoltorio vírico. Esta membrana se rellena de proteínas codificadas por el genoma vírico y el del huésped, la membrana lipídica en sí y todos los carbohidratos presentes son codificados completamente por el huésped. El virus de la gripe y el VIH utilizan esta estrategia. La mayoría de virus envueltos dependen de la envoltura para infectar.

Complejos: Los virus tienen una cápside que no es ni puramente helicoidal, ni puramente icosaédrica, y que puede poseer estructuras adicionales como colas proteicas o una pared exterior compleja. Algunos bacteriófagos tienen una estructura compleja que consiste en un cuerpo icosaédrico unido a una cola helicoidal (esta cola actúa como una jeringa molecular, atacando e inyectando el genoma del virus a la célula huésped) que puede tener una base hexagonal con fibras caudales proteicas que sobresalgan.

2.2.2 ANTIGENOS

Se entiende como antígeno (Ag) cualquier molécula que puede ser reconocida específicamente por cualquiera de los componentes del Sistema Inmunológico (SI)

Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye partes de bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias, y toxinas), de virus y otros microorganismos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y polisacáridos. Los antígenos no-microbianos exógenos (ajenos al individuo)

pueden incluir polen, clara de huevo, y proteínas de tejidos y órganos trasplantados, o proteínas en la superficie de glóbulos rojos transfundidos. (<http://es.wikipedia.org>)

ANTÍGENOS EXÓGENOS

Los antígenos exógenos son antígenos que han entrado al cuerpo desde el exterior, por ejemplo mediante inhalación, ingestión o inyección. Estos antígenos son tomados en las células presentadoras de antígenos mediante endocitosis o fagocitosis (CPAs) y procesados en fragmentos. Las CPAs entonces presentarán esos fragmentos a linfocitos T colaboradores (CD4+) con ayuda de moléculas de histocompatibilidad de clase II en su superficie.

Algunos linfocitos T pueden reconocer de manera específica la dupla péptida, es entonces cuando son activados y comenzarán a secretar citoquinas. Las citoquinas son sustancias que a su vez pueden activar linfocitos T citotóxicos (CD8+), células productoras de anticuerpos o linfocitos B, macrófagos, y otras partículas.

ANTÍGENOS ENDÓGENOS

Los antígenos endógenos son aquellos antígenos que han sido generados al interior de una célula, como resultado del metabolismo celular normal, o debido a infecciones virales o bacterianas intracelulares. Los fragmentos de esos antígenos son presentados sobre la superficie celular en un complejo con moléculas de clase I.

Si son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CD8+) activados, éstos comenzarán a secretar varias toxinas que causarán la lisis o apoptosis (muerte celular) de la célula infectada. Para prevenir que las células citotóxicas destruyan células normales que presenten proteínas propias del organismo, estos linfocitos T auto reactivos son eliminados del repertorio como resultado de la tolerancia (también conocida como selección negativa).

AUTOANTÍGENOS

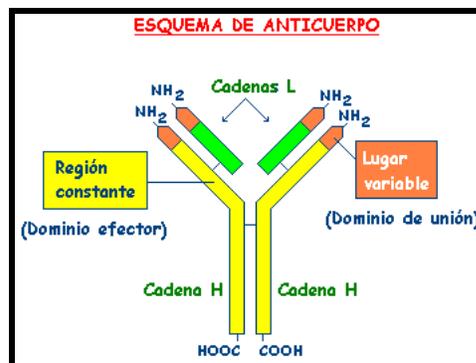
Un auto antígeno se refiere a una proteína o complejo de proteínas normal (algunas veces ADN o ARN) que es reconocido por el sistema inmune. Ocurre en pacientes que sufren de alguna enfermedad autoinmune específica. Estos antígenos no deberían, en condiciones normales, activar el sistema inmune, pero debido principalmente por factores genéticos y ambientales, se ha perdido una correcta tolerancia inmunológica en esos pacientes.

Cada antígeno está definido por su anticuerpo, los cuales interactúan por complementariedad espacial. La zona donde el antígeno se une al anticuerpo recibe el nombre de epítipo o determinante antigénico, mientras que el área correspondiente de la molécula del anticuerpo es el paratopo.

Las células presentan los antígenos al sistema inmune mediante una molécula de histocompatibilidad. Dependiendo del antígeno presentado y del tipo de molécula de histocompatibilidad, podrían activarse diferentes tipos de leucocitos

2.2.3 ANTICUERPOS

FIGURA 6: ESQUEMA DE ANTICUERPO



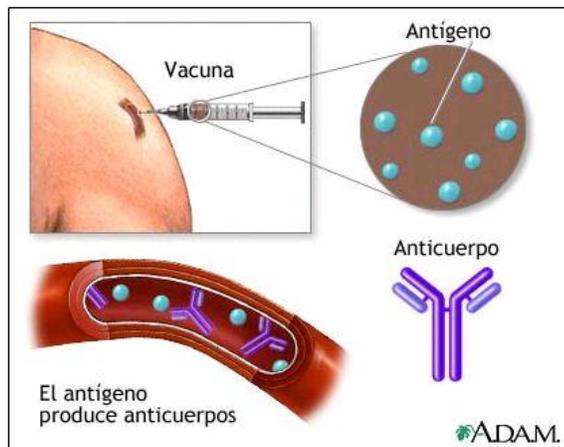
Fuente: todosobretusistemainmunologico.blogspot.com

Los anticuerpos (Ac), también conocidos como inmunoglobulinas, son un grupo de moléculas que producen los linfocitos B. Los diferentes tipos de Ac tienen una estructura básica común a todos ellos. La parte de la molécula que se une al Ag se denomina región Fab (fragmentantigenbinding) mientras que la zona que interactúa con otros elementos del SI se denomina región Fc (algunas células del SI tienen sobre su superficie receptores de Fc por lo que si un Ac se une a un patógeno esas células también pueden unirse a él). La zona de la molécula del Ag a la que se une el Ac se denomina epítopo y una molécula de Ag puede tener varios de ellos por lo que los Ac en realidad son específicos de un epítopo y no de la molécula completa de antígenos (<http://abderainmunologia.wetpaint.com>).

RESPUESTA INMUNOLOGICA

Una vacuna con un antígeno libera una serie de reacciones a nivel de las células inmunológicas, las cuales producen la formación de los anticuerpos cuando el organismo entra en contacto por primera vez con el antígeno, la respuesta inmunológica producida se denomina respuesta primaria.

FIGURA 7: RESPUESTA INMUNOLÓGICA



Fuente: www.sosfarma.com

Esta respuesta inicial requiere de un lazo entre 7 a 10 días y este tiempo conocido como período de inducción, durante el cual las pruebas muy sensibles ocasionalmente podrían mostrar pequeñas cantidades de anticuerpos en el organismo, a los 10 días la concentración de anticuerpos es evidente y dichas pruebas se manifiestan de manera positiva.

2.2.4 ENFERMEDADES DEL HÍGADO

Los padecimientos del hígado son:

- ✓ La hepatitis A;
- ✓ La hepatitis B;
- ✓ La hepatitis C;
- ✓ La hepatitis D;
- ✓ La hepatitis E;
- ✓ La cirrosis hepática
- ✓ Enfermedades autoinmunes tales como la colangitis esclerosante primaria, la cirrosis biliar primaria y la hepatitis autoinmune;
- ✓ Enfermedades congénitas tales como el síndrome de Gilbert, el síndrome de Crigler-Najjar, el síndrome de Rotor y el síndrome de Dubin-Johnson;
- ✓ La esteatohepatitis no alcohólica.

2.2.5 LA HEPATITIS

Importante problema de salud pública en todo el mundo es una afección o enfermedad inflamatoria que afecta al hígado, su causa puede ser infecciosa viral, bacteriana inmunitaria (por autoanticuerpos, hepatitis autoinmune) o tóxica (por ejemplo por alcohol, venenos o fármacos), como consecuencia de la inflamación, se bloquea el paso de la bilis que produce el hígado al descomponer la grasa, se altera la función de

eliminar las toxinas de la sangre, de producir diversas sustancias importantes, almacenar y distribuir la glucosa, vitaminas, minerales; hay virus específicos para la hepatitis (virus hepatotropos), es decir aquellos que sólo provocan hepatitis. (<http://www.monografias.com>)

Existen muchos: virus A, virus B, C, D, E, F, G. Los más importantes son los virus A, B, C y, en menor medida, el D y el E, siendo los últimos, F y G los últimos descritos y los menos estudiados.

Otros virus no específicos son:

- Virus de Epstein-Barr (EBV): causante de la mononucleosis infecciosa y de amigdalitis.
- Citomegalovirus (CMV): tiene tropismo hepático aunque puede causar encefalitis.

CAUSAS Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Virus A (HAV) y E (HEV): fecal-oral. La forma de transmisión más frecuente es por el agua contaminada: verduras lavadas con esta agua, mariscos de aguas pantanosas, por lo que la higiene es fundamental para una buena prevención. También lo puede contagiar un familiar o cualquier otra persona infectada por el virus.

Virus B (HBV), D (HDV): Por vía parenteral: por transfusiones, heridas, jeringas contaminadas; por contacto sexual al estar presente los virus en los distintos fluidos corporales (semen, saliva) o por relaciones sexuales traumáticas con heridas.

Virus C (HCV); Por vía parenteral, contaminación con sangre infectada, se ha encontrado presencia del virus en algunos fluidos aunque no puede considerarse en cantidad como para producir la transmisión del virus. El contagio por vía sexual de la

hepatitis C es muy poco frecuente; se cree que se transmite por vía parenteral únicamente en aquellos casos en los que haya relaciones sexuales con sangrado y altos niveles de daño en la mucosa ano-genital. Se cree que el sexo vaginal con penetración implica un nivel de riesgo menor de transmisión en comparación con las prácticas sexuales que implican niveles mayores de traumatismo para la mucosa ano-genital (penetración anal, el uso de juguetes sexuales). (<http://www.nlm.nih.gov>)

EPIDEMIOLOGÍA

Hepatitis A: es una enfermedad del hígado causada por el virus de la hepatitis A (VHA). Se transmite por el contacto con deposiciones de otro enfermo, por falta de higiene en el hogar o bien el consumo de alimentos contaminados y deficientemente lavados (como verduras regadas con aguas no tratadas o en contacto con vectores, como moscas o cucarachas). Puede afectar a cualquier individuo y tener carácter epidémico en aquellos lugares que no cuenten con tratamiento adecuado de sus aguas servidas. En países más desarrollados la hepatitis A afecta principalmente a casos aislados de individuos, aunque han ocurrido epidemias que han llegado a cubrir grandes áreas en el pasado. Si bien hoy en día existen vacunas que pueden prevenirla, las condiciones de saneamiento ambiental y las normas de higiene al interior del hogar son la forma más eficaz de evitar su desarrollo.

Hepatitis B: es una enfermedad grave causada por un virus que se transmite por la sangre o por vía sexual desde un enfermo con hepatitis activa o de un portador sano del virus de la hepatitis B (VHB). Puede causar una infección aguda o crónica y así persistir en la sangre, causando cirrosis (cicatrización) del hígado, cáncer del hígado, insuficiencia hepática y la muerte. También existe una vacuna para su prevención.

Hepatitis C: es una enfermedad del hígado causada por el virus hepatitis C (VHC) que se encuentra en la sangre de las personas que tienen la enfermedad. La infección del VHC también es transmitida mediante el contacto con la sangre de una persona infectada (en

etapa de actividad o portación del virus) y también es causa de hepatitis crónica, cirrosis, cáncer de hígado, insuficiencia hepática y muerte.

Hepatitis D: es un virus defectuoso que necesita el virus de hepatitis B para existir. El virus de la hepatitis D (VHD) se encuentra en la sangre de las personas infectadas con el virus.

Hepatitis E: es un virus (VHE) que se transmite en forma muy similar al virus de hepatitis A y se disemina a través de agua contaminada.

Hepatitis F: de aparición reciente, puede ser el mismo conocido como G.

Hepatitis G: es el virus más nuevo, se conoce poco. Se cree que se transmite a través de la sangre sobre todo en personas que usan drogas endovenosas, y se supone que con otras enfermedades y tratamientos relacionados con la coagulación.

2.2.6 HEPATITIS B

DATOS HISTÓRICOS

El primer brote de hepatitis B se registró en 1885. Como consecuencia de un brote de viruela en 1883 se vacunaron a 1289 astilleros utilizando linfa de otros individuos. Tras varias semanas, y hasta ocho meses más tarde, 191 trabajadores vacunados enfermaron con una forma de ictericia que fue diagnosticada como hepatitis sérica.

Otros empleados que fueron inoculados con lotes diferentes de linfa humana permanecieron sanos. La publicación de Lurman se considera un ejemplo clásico de estudio epidemiológico, concluyendo que la linfa contaminada fue la fuente de la epidemia. Más tarde, muchos casos similares se reportaban después de la introducción en 1909 de agujas hipodérmicas que han sido utilizados y reutilizados en varias

oportunidades para la administración de Salvarsán para el tratamiento de la sífilis. Aunque se había sospechado de la existencia de un virus desde el trabajo de MacCallum en 1947, Dane y sus colegas descubrieron en 1970 las partículas virales bajo un microscopio electrónico. A principios de 1980, el genoma del virus fue secuenciado y las primeras vacunas fueron experimentadas.

El virus fue descubierto finalmente en 1963, cuando Baruch Blumberg, un genetista en los Institutos Nacionales de Salud en los Estados Unidos, puso de manifiesto una inusual reacción entre el suero de individuos politransfundidos y el de un aborigen australiano. Pensó que había descubierto una nueva lipoproteína en la población indígena que llamó antígeno Australia, más tarde conocido como el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

En 1967, después de varios estudios, se publicó un artículo que muestra la relación entre este antígeno y la hepatitis. Blumberg recibió en 1976 el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de este antígeno y el diseño de la primera generación de vacunas contra la hepatitis.

ETIOLOGIA

La hepatitis B es causada por un virus del género Orthohepadnavirus perteneciente a la familia Hepadnaviridae conocido con el nombre de virus de la hepatitis B (VHB o HBV, por sus siglas en inglés). El virus tiene aproximadamente 42 nm de diámetro con un ADN que es parcialmente de doble cadena de unos 3200 pb de largo encapsulado por una cápside, el cual está a su vez cubierta por una envoltura viral rodeado por lípidos y proteínas incrustadas en su superficie. La proteína viral de superficie (HBsAg) tiene tres formas principales, L-, M- y S-. El virus de la hepatitis B consta de ocho genotipos (A-H), los cuales se distribuyen de forma desigual geográficamente. (<http://www.scielo.sa.cr/sciel>.)

ESTRUCTURA

El virus de la hepatitis B tiene una nucleocápside de forma icosaédrica y presenta una envoltura exterior de lípidos. La cápside encierra un ADN viral y una ADN polimerasa con actividad de transcriptasa inversa. La envoltura exterior contiene proteínas incrustadas que participan en la unión del virus, y a su entrada en las células susceptibles. El virus es uno de los más pequeños viriones con envoltura, aunque existen formas pleomórficas, incluidos filamentos y cuerpos esféricos que carecen de núcleo (core). Estas partículas no son infecciosas y se componen simplemente de los lípidos y proteínas que forma parte de la superficie del virión, es decir los antígenos de superficie (HBsAg), y estos antígenos se producen en exceso durante el ciclo de vida del virus.

GENOMA

El genoma del VHB está compuesto de ADN circular, y tiene la peculiaridad de que no se conforma una doble hebra completa. El extremo de una de las hebras está asociado con la ADN polimerasa viral. El genoma contiene entre 3020-3320 (la hebra de longitud máxima) y 1700-2800 nucleótidos de longitud (la hebra de longitud mínima). El segmento no codificante tiene sentido negativo y es complementaria al ARNm viral. El ADN viral se puede encontrar en el núcleo celular de la célula hospedadora poco después de la infección de la célula. La porción del ADN que una vez fue parcialmente doble cadena se hace plenamente doble porque se completa la hebra corta de sentido (+) y se elimina la molécula proteica de la hebra de sentido (-), así como una corta secuencia de la hebra de sentido (+), constituida por ARN. Las bases que no son codificadas se eliminan de los extremos de las hebras de sentido (-), y esos extremos se unen luego el uno al otro. Hay cuatro genes conocidos codificados por el genoma, llamados C, X, P y S. La proteína del núcleo (core) es codificada por el gen C (HBcAg), y su codón de inicio está precedido por otro codón de inicio hacia arriba AUG de donde se sintetizan la proteína del pre-core. El procesamiento de esa proteína pre-core por proteólisis produce el antígeno HBeAg. La ADN polimerasa es codificada por el gen P. El gen S es el que

codifica para el antígeno de superficie (HBsAg). El gen HBsAg es un extenso marco de lectura abierto, dentro del cual existen tres codones de inicio ATG que dividen la secuencia en tres secciones: pre-S1, pre-S2, y S.

TRATAMIENTO

Las vacunas contra VHB son de dos tipos: una derivada de plasma de portadores crónicos y otra por ingeniería de proteínas recombinantes.

Tienen como único inmunógeno el HbsAg, las cuales inducen la formación de anticuerpos neutralizantes contra el determinante a del HbsAg, anticuerpos que confieren inmunidad protectora contra todos los genotipos del virus hasta el momento descritos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha aceptado que un nivel de estos anticuerpos de 10 mU/ml tiene carácter protector.

2.2.7 DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS B

MARCADORES SEROLÓGICOS

Cuando una persona se presenta con síntomas y/o antecedentes que sugieren una hepatitis viral, después de un periodo de incubación, que puede llegar hasta 10 semanas, se desarrolla la infección aguda con síntomas o no, que puede resolverse o seguir en cronicidad. Se debe estudiar en la sangre de un individuo expuesto al virus, la presencia o no de antígenos virales como el HBsAg y el antígeno " e" HBeAg.

El HBsAg es el primer marcador serológico que se detecta, porque aparece en semanas o meses (1 a 6 meses) luego de la exposición inicial al virus. Su título llega a un pico en varias semanas, persiste durante un período variable, disminuye y desaparece con la recuperación clínica.

El HBeAg está presente durante la fase aguda de la infección en paralelo o a los pocos días de aparecer HBsAg, e indica un estado altamente infeccioso, por la replicación activa del virus donde el ADN del VHB está circulando en sangre y declina en paralelo con el HBsAg.

El diagnóstico del estadio de la enfermedad se completa por la evidencia de la lesión hepática con pruebas de laboratorio como las Transaminasas (TGO, TGP) y anatomía patológica.

Debe valorarse además la respuesta de anticuerpos específicos contra los antígenos HBsAg, HBeAg y antígeno del core (HBcAg). El primer anticuerpo en aparecer es el anti-HBc tipo IgM. La IgM va declinando y desaparece alrededor de seis meses, pero la IgG anti-HBc persiste durante años.

Muy frecuentemente los pacientes se presentan de manera tardía durante el curso de la enfermedad, cuando el HBsAg ya ha desaparecido. La detección de IgM anti-HBc es el marcador serológico de mayor valor en una infección aguda por HBV. El HBeAg es reemplazado con el anticuerpo Anti-HBe al comienzo de la recuperación clínica. Este anticuerpo persiste 1-2 años tras desaparecer la infección aguda por hepatitis B.

A los 4-6 meses suele desaparecer el HBsAg y aparece el anticuerpo Anti-HBs durante la fase de convalecencia. Alcanza un título alto semanas o meses más tarde y luego disminuye gradualmente. En una mayoría de los casos el "período de ventana" puede ocurrir al no ser detectables ambos marcadores, solo se detecta AntiHBc IgM y anti HBc total. La duración del "período ventana" típicamente es de 2 a 6 semanas.

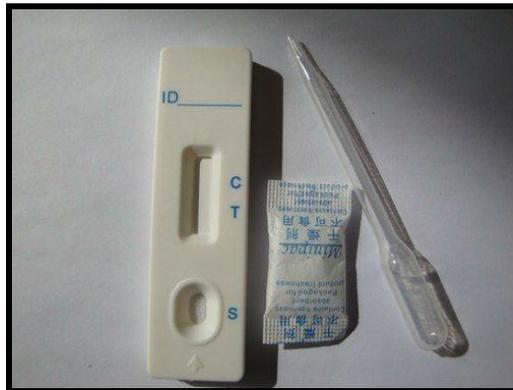
Este anticuerpo es protector y neutralizante, se asocia con la recuperación de la infección por VHB y con la inmunidad a la reinfección por este virus. El Anti-HBs se puede producir de tres modos diferentes:

- 1) por infección, en cuyo caso se adquieren tanto el anti-HBs como el anti-HBc.
- 2) por inyección de inmunoglobulina de hepatitis B, que es rica en anti-HBs.
- 3) por inmunización al recibir la vacuna con HBsAg.

DETERMINACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE HEPATITIS B EN CASSETE

Es un ensayo Inmuno-cromatográfico mediante la determinación visual cualitativa en un sólo paso de la presencia de Antígeno de superficie de la Hepatitis B en Suero / Plasma como ayuda en el diagnóstico de la infección por el Virus de la Hepatitis B. Los resultados de la prueba son rápidos, fáciles de leer y no se requiere de instrumentación o reactivos adicionales (<http://www.xerion.com>)

FIGURA 8: PRUEBA RÁPIDA PARA HEPATITIS B



Fuente: prueba de hbsag kits de - spanish.alibaba.com

La membrana es pre-cubierta por anticuerpos anti-HBs Ag en la región de la banda de la prueba. Durante el examen la muestra reacciona con la partícula cubierta con anticuerpos anti-HBs Ag. La mezcla migra a lo largo de la membrana cromatografica por acción capilar para reaccionar con los anticuerpos anti-HBsAg en la membrana generando una línea de color. La presencia de esta línea de color en la región de la banda

del examen indica un resultado positivo, mientras que su ausencia indica un resultado negativo.

DETERMINACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE HEPATITIS B EN ELISA

Se basa en la cuantificación, a partir de suero o plasma, de diferentes marcadores serológicos y virológicos que correlacionan con la enfermedad en sus diferentes estadios, actualmente se recurre no solo a las pruebas convencionales tales como el inmunoensayo, sino también a métodos moleculares, cargas virales y PCR para su diagnóstico y control. Las pruebas para la determinación de marcadores en el diagnóstico de las hepatitis han obtenido un gran desarrollo y optimización desde su desarrollo inicial. Las mejoras están desde la fuente y purificación de las proteínas antigénicas empleadas, como los anticuerpos y principios técnicos en que se fundamentan las pruebas. Técnica ELISA específica para la detección de antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg), utilizan un anticuerpo anti-HBsAg en fase sólida, que se une al antígeno presente en el suero del paciente, el cual reacciona frente a un conjugado marcado con una enzima, la que en contacto con un sustrato apropiado, desarrolla una reacción colorimétrica, la que puede ser leída visual o instrumentalmente. La sensibilidad mínima exigida para una técnica ELISA es que detecte al menos 1 ng/ml de HBsAg.

FIGURA 9: ELISA Kits



Fuente: ELISA Kits - Atlas Link Biotech Co

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

2.2.8 ELISA

Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que si no se ajustan correctamente puede afectar a los pasos sucesivos y al resultado de la prueba.

La interacción antígeno-anticuerpo en el laboratorio puede ser utilizada para determinar si un paciente tiene una infección o una enfermedad autoinmune. Pero como prueba diagnóstica, posee diversas limitaciones que conviene conocer:

En primer lugar, un resultado positivo que confirma la presencia de anticuerpos no significa necesariamente que el paciente esté enfermo. El cuerpo de una persona que ha estado enferma y que ya se ha recuperado, puede seguir produciendo anticuerpos. Esto originaría un falso positivo.

En segundo lugar, hay personas que producen una baja cantidad de anticuerpos, por lo que éstos pueden pasar desapercibidos y no ser medidos, dando lugar a un falso negativo. Sería el caso, por ejemplo, de personas que padezcan una inmunodeficiencia, o que se encuentren en el periodo ventana de la infección en el momento de realizar la prueba, o que estén infectadas por una cepa extraña.

En tercer lugar, pueden aparecer falsos positivos cuando se da inespecificidad entre antígeno-anticuerpo.

En estos casos de diagnóstico de enfermedad es recomendable la eliminación (mediante centrifugación) de células de la sangre que puedan interferir con el ensayo y pueda ocasionar un resultado falso positivo, careciendo aquél de especificidad. También, debemos tener en cuenta que cuando se trata de diagnosticar una enfermedad que posee un valor predictivo positivo bajo en una determinada población, es decir, que esa enfermedad tiene muy baja incidencia en dicha población, es necesario volver a confirmar el resultado positivo mediante otro método de diagnóstico independiente. Normalmente, se lleva a cabo un western blot donde se detecta la presencia de varios anticuerpos, simultáneamente, frente a la misma infección en una muestra. El resultado del western se considera positivo cuando aparecen al menos 5 bandas, que indica que anticuerpos diferentes están presentes en el sujeto frente a esa infección. Entonces es cuando se diagnostica como positivo a dicho paciente.

Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales) o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes.

ELISA DIRECTO

Ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas, sangre u orina, pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado).

ELISA INDIRECTO

Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran variedad de antígenos, por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más

con respecto al método directo. La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario (por ejemplo: suero sanguíneo) es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja. Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable.

Método de elección para detectar la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Según esta técnica, proteínas recombinantes de la envoltura y el núcleo se absorben como antígenos en fase sólida a los pocillos. Las personas afectadas producen anticuerpos séricos contra epítomos en estas proteínas víricas. En general, el ELISA indirecto permite detectar anticuerpos séricos desde las primeras seis semanas de una infección.

ELISA SÁNDWICH

Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

QUIMIOLUMINISCENCIA

Durante determinadas reacciones químicas, la luz generada por este fenómeno constituye una alternativa conveniente y muy sensible para las mediciones de absorbancia en ELISA. Los tipos de ELISA que recurren a la quimioluminiscencia utilizan un sustrato que genera luz, en lugar del sustrato cromógeno de las reacciones ELISA ordinarias. Tales son los casos de la oxidación del compuesto luminol por peróxido de hidrógeno y la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que producen luz.

La luz que se genera en dichas reacciones puede detectarse gracias a su capacidad de sensibilizar una película fotográfica. La medición cuantitativa de la emisión de luz puede hacerse mediante el uso de un luminómetro. La ventaja de las pruebas de quimioluminiscencia sobre las cromógenas es la mejoría de la sensibilidad. En general, el límite de detección puede aumentarse al menos diez veces si se cambia un sustrato cromógeno por uno que emita luz, y más de doscientas veces cuando se adicionan agentes potenciadores. (<http://www.human.de/es/products/elisa/instruments-and-systems/Reader.php>)

MARCADORES ENZIMÁTICOS MÁS COMÚNMENTE UTILIZADOS

Enzima Sustrato Tampón

- ✓ HRPO (peroxidasa de rábano) OPD 10 mg/25 mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; añadir microL de 30% peróxido de hidrógeno 30%
- ✓ TMB 2.5 mg/250 microL de DMSO; hasta 25 ml con tampón citrato sódico 0.1M pH 6; añadir 5 microL de peróxido de hidrógeno 30%
- ✓ ABTS 60 mg/100 mL de tampón citrato sódico 0.1 M pH 6; añadir 35 microL de peróxido de hidrógeno 30%; parar con fluoruro sódico 1.25%; leer a 405 nm
- ✓ DAB 10 mg/20 mL de tampón Tris 50 mM pH 7.4; filtrar y añadir 20 microL de peróxido de hidrógeno 1%

2.2.9 ANALIZADOR DE ELISA

Es un espectrofotómetro especializado, diseñado para efectuar la lectura de los resultados de una técnica que se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos o antígenos específicos presentes en una muestra.

FIGURA 10: LECTOR DE ELISA



Fuente: <http://www.human.com>

PRINCIPIO

El analizador de ELISA es un espectrofotómetro especializado, que permiten efectuar lecturas en un rango amplio de longitudes de onda, este dispone de filtros o rejillas de difracción que limitan el rango de longitudes de onda a aquellas que se utilizan en la técnica ELISA, la cual generalmente se realiza con longitudes de onda comprendidas entre los 400 y los 750 nm. (<http://www.human.de/es/products/elisa/instruments-and-systems/Reader.php>)

Algunos analizadores operan en el rango ultravioleta y pueden efectuar análisis entre los 340 y los 700 nm. El sistema óptico utiliza la fibra óptica para llevar la luz hasta los

pozos de la placa, donde se encuentra la muestra bajo análisis. La luz que atraviesa la muestra tiene un diámetro que varía entre 1 y 3 mm. Un sistema de detección recibe la energía lumínica, proveniente de la muestra, la amplifica, determina la absorbancia y, a través de un sistema de lectura, la convierte en datos que permiten interpretar el resultado de la prueba.

Hay analizadores de ELISA que emplean sistemas lumínicos de doble haz. Las muestras se colocan en placas de diseño especial, las cuales disponen de un número definido de pozos o vasos, en los cuales se lleva a cabo el procedimiento o ensayo.

Son comunes las placas de 8 columnas por 12 filas, con un total de 96 pozos. Las hay de 384 pozos y la tendencia actual busca aumentar el número de pozos, y reducir la cantidad de reactivos y el volumen de las muestras requeridas. La ubicación de los sensores ópticos están sobre la placa porta muestras, mientras que otros los ponen directamente bajo los pozos de la placa; disponen de controles regulados por microprocesadores, interfases de conexión a sistemas de información, programas de control de procesos y control de calidad que, a través del computador, permiten la automatización completa de los ensayos requeridos.

CONDICIONES DE USO

Para que el analizador de ELISA opere correctamente, es necesario verificar los siguientes puntos:

1. Un ambiente limpio, libre de polvo.
2. Una mesa de trabajo estable. Lo recomendable es que la misma esté alejada de equipos que generen vibraciones –centrífugas, agitadores–, que tenga un tamaño adecuado que permita ubicar, al lado del analizador de ELISA, los equipos complementarios requeridos para efectuar la técnica en mención: lavadores, incubadora, dispensador y computador con periféricos.
3. Una fuente de suministro eléctrico de acuerdo con las normas y estándares implementados en el país. En los países americanos se utilizan por lo general voltajes de 110 V y frecuencias de 60 Hz.

CALIBRACIÓN DEL ANALIZADOR DE ELISA

La calibración de un analizador de ELISA es un proceso especializado que debe realizar un técnico debidamente entrenado, siguiendo las instrucciones que para el efecto brinda cada fabricante. Para efectuar la calibración se requiere disponer de un juego de filtros grises, los cuales se encuentran montados en una placa de igual geometría a las utilizadas para efectuar los análisis. Los fabricantes suministran dichos filtros y pueden ser utilizados para realizar calibraciones a cualquier longitud de onda de las que utiliza el equipo.

Los filtros de calibración disponen de al menos tres valores de densidad óptica, restablecidos dentro de los rangos de medición; uno bajo, uno medio y el último, un valor alto.

Para efectuar la calibración se realiza el siguiente proceso:

1. Colocar el filtro de calibración en el equipo.
2. Efectuar una lectura completa con el filtro de calibración. Verificar si se presentan diferencias en las lecturas obtenidas de canal a canal. Si es así, invertir el filtro (180°) y repetir nuevamente la lectura para descartar que las diferencias puedan ser atribuibles al filtro en sí. Por lo general, se acepta que el instrumento no requiere calibración, si se encuentra ajustado en dos longitudes de onda.
3. Verificar si el lector está descalibrado. Si es así, proceder a la calibración, siguiendo la rutina definida por el fabricante, verificando especialmente que la linealidad de las lecturas se mantenga lo más rigurosamente posible.
4. Si no se dispone de filtro de calibración, verificar la misma colocando una solución de color en los pozos de una placa y efectuando en seguida una lectura completa.
5. Luego invertir la placa 180° y efectuar una nueva lectura. Si ambas lecturas presentan valores promedio idénticos en cada fila, el analizador se encuentra calibrado.
6. Verificar si el desplazamiento de la placa se encuentra calibrado, columna por columna

7. Colocar una placa vacía y efectuar las lecturas. Si no se observan diferencias medias entre las lecturas de columna a columna de la primera a la última, podría asumirse que el avance se encuentra calibrado.(<http://www.human.com>)

RUTINAS DE MANTENIMIENTO

Las rutinas que se describen a continuación están enfocadas exclusivamente al analizador de ELISA. El mantenimiento del lavador de ELISA está tratado en el capítulo correspondiente.

Mantenimiento básico: Frecuencia: Diaria

- ✓ Revisar que los sensores ópticos de cada canal estén limpios. Si se detecta suciedad, limpiar con un pincel la superficie de las ventanas de los emisores de luz y de los sensores.
- ✓ Verificar que la calibración del analizador es adecuada. Cuando se inicien las operaciones diarias, permitir que el analizador se caliente durante 30 minutos. A continuación, realizar una lectura en blanco y luego leer un módulo lleno de sustrato.
- ✓ Las lecturas deben ser idénticas. Si no lo son, invertir el módulo y repetir la lectura, a fin de determinar si la desviación se origina en el módulo o en el lector.
- ✓ Examinar el avance automático de la placa. El mismo debe ser suave y constante.

Mantenimiento preventivo: Frecuencia: Trimestral

- ✓ Verificar la estabilidad de la lámpara. Usar el filtro de calibración, efectuando lecturas con intervalos de 30 minutos o una misma placa. Comparar las lecturas. No deben existir diferencias.
- ✓ Limpiar los sistemas ópticos de los detectores y los sistemas de iluminación.
- ✓ Limpiar el mecanismo de avance de la placa.
- ✓ Verificar la alineación de cada pozo con los sistemas emisores y detectores de luz.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para realizar el tamizaje se deben utilizar ensayos evaluados y recomendados por el ISP que cumplan los requisitos técnicos de: 95 % de especificidad y 100% de sensibilidad. Para utilizar los controles en los ensayos individuales, se recomienda realizarlos por lo menos una vez el día de su ejecución. Se deben incorporar controles Positivos (alícuotas congeladas de muestras confirmadas por el ISP) cuando abra un nuevo estuche o set de reactivos. SUARDÍAZ Jorge, CRUZ Celso, COLINA Ariel: Laboratorio Clínico, Editorial Ciencias Médicas, La Habana - Cuba, (2004).

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Participar del Programa Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) del ISP, para antígeno de superficie de la Hepatitis B (AgBs).

CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

Las muestras deben manejarse con todas las medidas de precaución universal (utilizar guantes desechables, mascarillas, sistema de eliminación de desechos biopeligrosos, utilizar solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % para desinfectar cualquier salpicadura.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En las técnicas por ELISA, las muestras con valores de absorbancia inferiores al valor de la línea de corte (CUT OFF) se considera que no contiene AgBs, de acuerdo al límite de sensibilidad de la técnica. Las muestras con valores de absorbancia superiores o iguales al valor de la línea de corte se consideran inicialmente reactivas y deberán repetirse. Si vuelve a tener valores de absorbancia superior o igual a la línea de corte, deberá ser confirmada con alguna técnica confirmatoria.

En el caso de las técnicas confirmatorias, un resultado no reactivo indica que la muestra analizada no contiene AgBs, o que lo contiene por debajo del límite de detección del ensayo confirmatorio. Un resultado positivo confirmado indica que la muestra analizada contiene AgBs.

2.3 DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS

Alérgeno: Un alérgeno es aquella sustancia que causa una reacción alérgica. La acción resultante puede producirse luego de la ingestión, inhalación, inyección, o contacto con la piel. MEJIA Gilberto: Diccionario de Laboratorio Aplicado a la Clínica, Editorial Panamericana, Bogota- Colombia, (2005)

Aminotransferasas: También conocidas como transaminasas, son exámenes que permiten estimar el grado de inflamación hepática. La ALT (alanino-transferasa o SGPT) y la AST (aspartato-transferasa o SGOT) pueden elevarse a valores sobre 1000 U/L en una hepatitis aguda y varían desde el rango normal (menos de 40 U/L) hasta algunos cientos en la hepatitis crónica.

Antígeno: Un antígeno ("anti", del griego αντι- que significa 'opuesto' o 'con propiedades contrarias' y "geno", de la raíz griega γεν, generar, producir) es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria.

Anticuerpo: Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado Ig) son glicoproteínas del tipo gamma globulina, disponiendo de una forma idéntica que actúa como receptor de los linfocitos B y son empleados por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos.

Autoantígenos: Se refiere a una proteína o complejo de proteínas normal (algunas veces ADN o ARN) que es reconocido por el sistema inmune. Ocurre en pacientes que sufren de alguna enfermedad autoinmune específica. Estos antígenos no deberían, en

condiciones normales, activar el sistema inmune, pero debido principalmente por factores genéticos y ambientales, se ha perdido una correcta tolerancia inmunológica en esos pacientes.

Biopsia hepática: Método por el que se realiza la extracción de una muestra de tejido hepático para su estudio microscópico. MEJIA Gilberto: Diccionario de Laboratorio Aplicado a la Clínica, Editorial Panamericana, Bogota- Colombia, (2005)

Biopsia percutánea: Es la técnica más ampliamente utilizada para la toma de tejido hepático. Se practica una punción a través de una pequeña incisión en la pared abdominal. Precisa anestesia local. La aguja de punción tiene una amplia luz que permite obtener un cilindro de tejido hepático.

Punción-aspiración con aguja fina (PAAF) guiada con ecografía o tomografía axial computadorizada (TAC). Únicamente se aplica anestesia local. El tamaño de la muestra obtenida es variable. Puede ser útil para evaluar enfermedades hepáticas difusas.

Biopsia laparoscópica: Se realiza una incisión en la pared abdominal con sedación y anestesia local. El paciente permanece consciente durante la exploración. Permite visualizar la superficie del hígado para la toma de la muestra. Su uso ha decrecido con el desarrollo de los procedimientos anteriormente enumerados.

Carga viral: Es la cuantificación de la infección por virus que se calcula por estimación de la cantidad de partículas virales en los fluidos corporales, como por ejemplo ARN viral por milímetros de sangre.

La carga viral se usa para control terapéutico de virosis crónicas y control de pacientes inmune suprimidos como los que han recibido trasplante de órganos o de células madre hematopoyéticas o de médula ósea. (www.esacademic.com)

Carcinoma: Un carcinoma es una forma de cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular, de tipo maligno. Diccionario de Medicina Océano Mosby, Editorial MMIII océano, Barcelona- España

Elisa: ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color.

Hepatocito: Hepatocito es la célula propia del hígado y que forma su parénquima.

Patogénesis: El receptor responsable del reconocimiento del virus en dichas células no se ha identificado aún, aunque hay evidencias de que el receptor en el virus de la hepatitis B del pato (estrechamente relacionado al virus humano) es la carboxipeptidasa D. SUARDÍAZ Jorge, CRUZ Celso, COLINA Ariel: Laboratorio Clínico, Editorial Ciencias Médicas, La Habana - Cuba, (2004).

Proteínas víricas: Forman la cubierta externa o cápside, compuesta por subunidades que se denominan "capsómeros". Cada capsómero puede estar formado por una o más subunidades proteicas que son constantes para cada virus. Los capsómeros son proteínas estructurales, pero el virión puede tener también proteínas enzimáticas y aglutinantes.

Tolerógeno: Antígeno que invoca una no-respuesta inmune específica debido a su forma molecular. Si su forma molecular es cambiada, un tolerógeno puede convertirse en inmunógeno.

Virión: En medicina, microbiología y biología se denomina virión a la partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa. Está compuesto por: Ácido nucleico vírico: Puede ser ADN o ARN, solo una de ellos, de cadena doble o sencilla. Lo más frecuente es ADN bicatenario, lineal o circular, o bien ARN monocatenario siempre lineal.

2.4 HIPOTESIS Y VARIABLE

2.4.1 HIPOTESIS

La prueba del AgBs mediante Elisa ayuda al Diagnóstico de la Hepatitis B en las trabajadoras sexuales que acuden al Centro de Salud #1 Guano- Penipe.

2.4.2 VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

El AgBs

VARIABLE DEPENDIENTE

Diagnóstico para la hepatitis B en las trabajadoras sexuales

2.5 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Concepto	Categoría	Indicadores	Técnicas e Instrumentos
V. Independiente El AgBs	HBs Ag. Antígeno de superficie del virus B: marcador serológico de infección por VHB. Localizado en la cubierta externa del virus	Marcador serológico, indicador precoz de la enfermedad	Método Inmunológico ELISA	Técnica de Human, Equipo de micro Elisa, Pipetas graduables
V. Dependiente Diagnóstico de Hepatitis B.	Es una enfermedad infecciosa del hígado causada por el virus de la hepatitis B y caracterizada por necrosis hepatocelular e inflamación.	Enfermedad infectocontagiosa	Biológica Física Funcional	

CAPÍTULO III

3 MARCO METODOLÓGICO

3.1 MÉTODO

Para esta investigación el método que se utilizó es el deductivo – inductivo, con un procedimiento analítico – sintético.

Método Deductivo- Inductivo: Utilizamos este método ya que nos ayudó al estudio de la enfermedad para obtener resultados generales que nos lleva a sacar conclusiones particulares de nuestro tema de investigación.

La Aplicación Del Método Analítico: Nos permitió analizar las muestras.

La Utilización Del Método Sintético: Nos permitió unificar todos los conceptos y los diversos elementos para formular una teoría.

3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Para este trabajo se realizó una investigación descriptiva, y se llegó por el alcance a una investigación explicativa.

3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Es una investigación de campo, debido a que el proceso investigativo se llevó a cabo en un lugar específico en este caso en el laboratorio del centro de salud N°1, área Guano-Penipe y a la vez se apoyó en informaciones que provienen de observaciones.

3.1.3 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio prospectivo, el cual posee una característica fundamental, es la de iniciarse con la exposición de una supuesta causa, y luego seguir a través del tiempo a una población hasta determinar o no la aparición del efecto.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Esta investigación se trabajó con la totalidad de la población en un número de 91 pacientes que asisten a los controles profilácticos, en el Centro de Salud #1 Guano-Penipe

3.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

En la presente investigación se utilizó la recolección de muestras a las trabajadoras sexuales atendidas en el Centro de Salud #1 Guano- Penipe, a través de una punción venosa, con aguja multi-toma en un tubo para obtener suero (tapa color rojo), se los codifica del 1 al 91 y luego se somete a centrifugación a 3000 RPM por 5 minutos.

Se separó el suero de los otros componentes celulares, para el almacenamiento hasta el procesamiento de las muestras.

Una vez obtenidos todas las muestras se descongelaron para ser procesadas basándonos en la técnica incluida en el kit Elisa, siguiendo las especificaciones de la prueba y los tiempos de incubación se terminó con la lectura de las muestras el equipo Human Reader.

3.4 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Análisis

Los cálculos son válidos si cumplen los siguientes criterios:

La absorbancia del blanco debe ser < 0.100

La Media del Control Negativo: $MNC < 0.100$

TABLA 1: MNC (Media de controles negativos)

Media de Controles Negativos	
CN1	0,035
CN2	0,036
CN3	0,039
MNC	0.037

La Media del Control Positivo: $MPC > 0.600$

TABLA 2: MNP (Media de Controles Positivos)

Media de controles Positivos	
CP1	0,884
CP2	0,973
MNP	0.92

$MPC - MNC \leq 0.500$. Nota: Si la diferencia es menor, una técnica inadecuada pudo ser la razón. La prueba debe ser repetida. Si la diferencia es consistentemente menor a 0.500, deterioro de los reactivos se sospecharía

Valores en los individual de NC deben estar entre 0.5 x MNC y 2x MNC. si un valor esta fuera de este rango, descarte este valor y recalculé la MNC. Si dos valores están fuera de rango la prueba debe ser repetida

$$NC=0.5 \times MNC < MNC < 2 \times MNC$$

La presencia o ausencia de HbsAg es determinada por comparación de los valores de la absorvancia contra el valor de cut-off. El valor de cut-off es calculado con el control negativo:

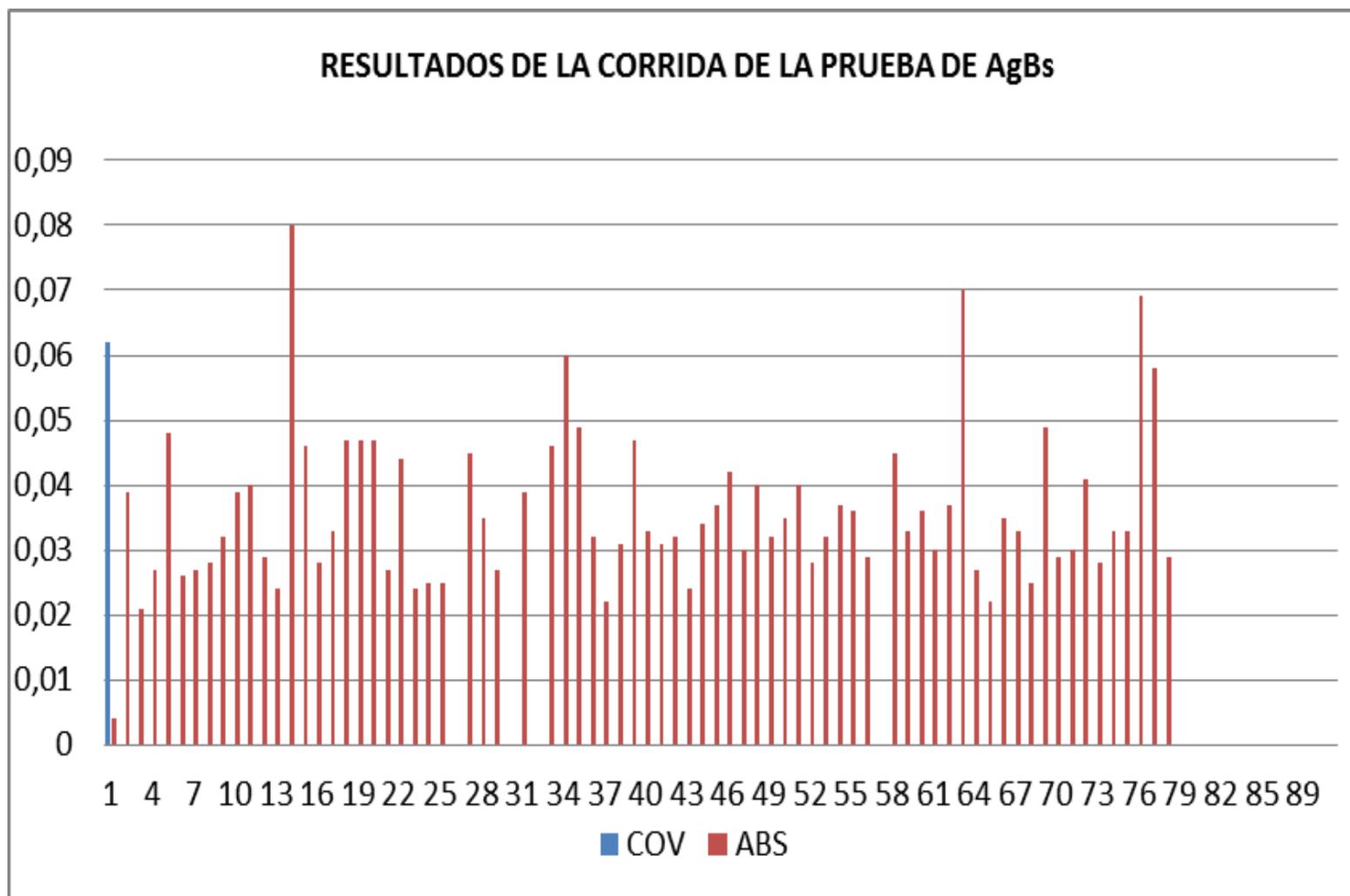
TABLA 3: VALOR DE CUT OFF

Valor de Cut Off COV= MNC +0.025
Valor de Cut Off COV= 0.037 +0.025
Valor de Cut Off COV= 0.062

TABLA 4: RESULTADOS DE LA CORRIDA DE LA PRUEBA DE AgBs

RESULTADOS DE LA CORRIDA DE LA PRUEBA DE AgBs							
HECHAS A TRABAJADORAS SEXUALES							
N	ABS	N	ABS	N	ABS	N	ABS
1	0,004	24	0,025	47	0,03	70	0,029
2	0,039	25	0,025	48	0,04	71	0,03
3	0,021	26	0.138	49	0,032	72	0,041
4	0,027	27	0,045	50	0,035	73	0,028
5	0,048	28	0,035	51	0,04	74	0,033
6	0,026	29	0,027	52	0,028	75	0,033
7	0,027	30	0.092	53	0,032	76	0,069
8	0,028	31	0,039	54	0,037	77	0,058
9	0,032	32	0.089	55	0,036	78	0,029
10	0,039	33	0,046	56	0,029	79	0,024
11	0,04	34	0,06	57	0.311	80	0,028
12	0,029	35	0,049	58	0,045	81	0,027
13	0,024	36	0,032	59	0,033	82	0,023
14	0,08	37	0,022	60	0,036	83	0,035
15	0,046	38	0,031	61	0,03	84	0,048
16	0,028	39	0,047	62	0,037	85	0,029
17	0,033	40	0,033	63	0,07	86	0,034
18	0,047	41	0,031	64	0,027	87	0,037
19	0,047	42	0,032	65	0,022	89	0,034
20	0,047	43	0,024	66	0,035	90	0,029
21	0,027	44	0,034	67	0,033	91	0,046
22	0,044	45	0,037	68	0,025		
23	0,024	46	0,042	69	0,049		

FIGURA 11: ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS CON RELACION AL PUNTO DE CORTE



Fuente: Kit De HbsAg de Human

TABLA 5: RESULTADOS POSITIVOS QUE FUERON SOMETIDOS A COMPROBACION

RESULTADOS POSITIVOS	
MUESTRA	ABS
26	0,138
30	0,092
32	0,089
57	0,311
76	0,069
77	0,058

FIGURA 12: ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS CON RELACION AL PUNTO DE CORTE

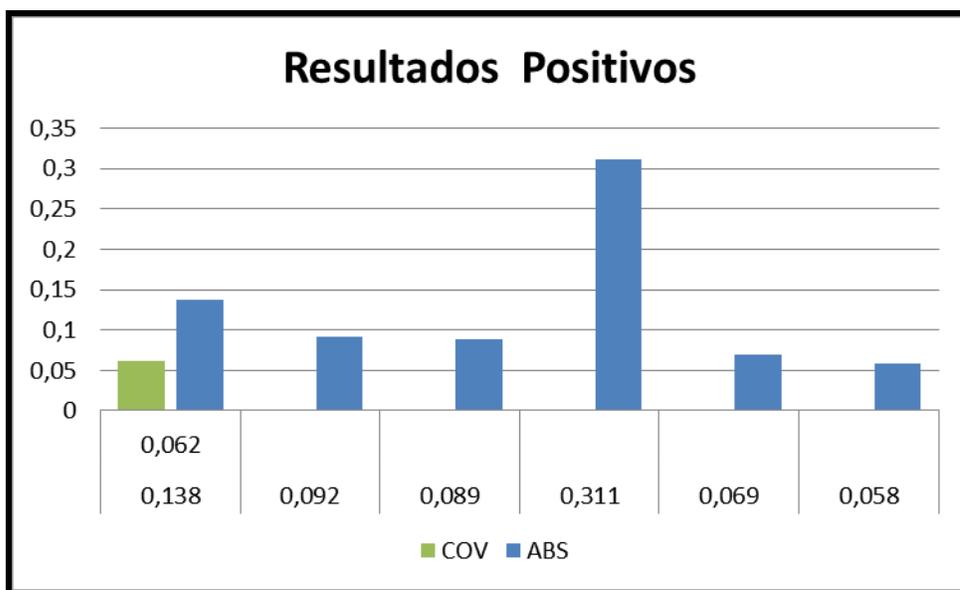
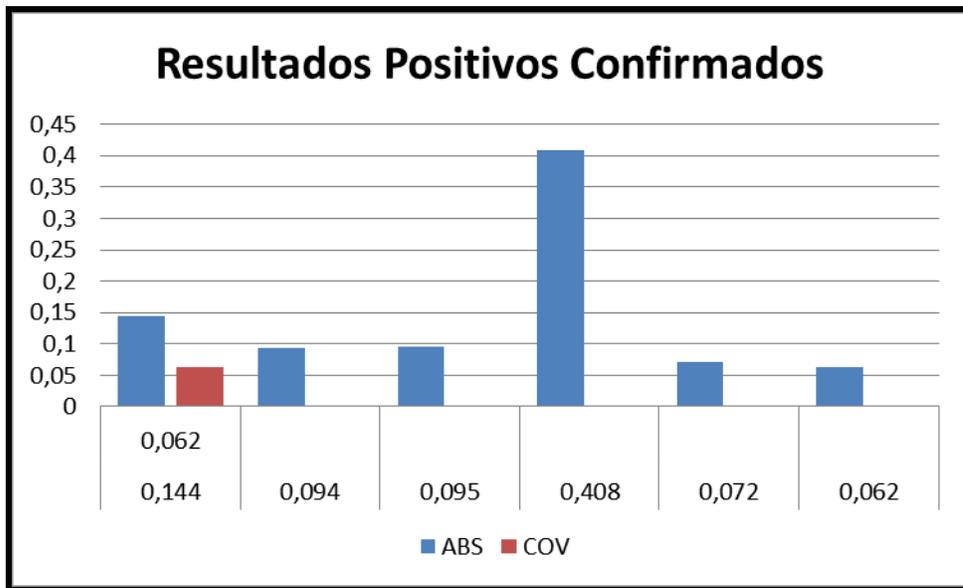


TABLA 6: RESULTADOS POSITIVOS DE LA CORRIDA DE COMPROBACION

RESULTADOS COMPROBADOS	
MUESTRA	ABS
26	0,144
30	0,094
32	0,095
57	0,408
76	0,072
77	0,062

FIGURA 13: ABSORBANCIAS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS CONFIRMADAS CON RELACION AL PUNTO DE CORTE



3.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los cálculos son válidos si cumplen los siguientes criterios:

- La Media del Control Negativo: $MNC < 0.100$
- La media de la prueba realizada es de 0.037 que se encuentra menor a 0.100 por lo que el valor es aceptable.
- La Media del Control Positivo: $MPC > 0.600$
- El valor de las absorbancias de los controles positivos esta en 0.92 que es mayor a 0.600 el valor es correcto para realizar la prueba
- $MPC - MNC \leq 0.500$. Nota: Si la diferencia es menor, una técnica inadecuada pudo ser la razón. La prueba debe ser repetida. Si la diferencia es consistentemente menor a 0.500, deterioro de los reactivos se sospecharía.
- La diferencia de MPC y MNC es de 0.883 esta es mayor que 0.500, la técnica utilizada fue adecuada, no debe ser repetida la prueba, y los reactivos están en buen estado.

Valores en los individual de NC deben estar entre $0.5 \times MNC$ y $2 \times MNC$. Si un valor esta fuera de este rango, descarte este valor y recalculé la MNC. Si dos valores están fuera de rango la prueba debe ser repetida.

TABLA 5: Verificación de los Criterios de Resultados

$NC = 0.5 \times MNC < MNC < 2 \times MNC$
$NC = 0.5 \times (0.037) < 0.037 < 2 \times (0.037)$
$NC = 0.018 < 0.037 < 0.074$

Por lo tanto podemos decir que los controles negativos se encuentra en el rango indicado por lo tanto se puede utilizar este valor para la realización y cálculo del cut-off.

3.5.1 INTERPRETACION DE LOS CALCULOS

Positivo: muestras con valores de absorbancias iguales o mayores que el valor de cut-off son consideradas reactivas al AgBs por el criterio de la prueba. Si la prueba es reactiva al repetir se considera positiva.

Negativa: Muestras con valores de absorbancias menores que el valor de cut-off son consideradas negativas a AgBs (No reactivas).

Dudosa: Muestras con valores de absorbancias entre +- 10% del valor de cut-off deben ser reprobadas para confirmar la lectura original.

3.5.2 INTERPRETACION DE RESULTADOS

DATOS ESTADISTICOS DE LOS ANALISIS DE AgBs EN LAS MUESTRAS DE SANGRE QUE INGRESARON AL LABORATORIO DEL CENTRO DE SALUD N° 1 GUANO-PENIPE EN ENERO A JUNIO 2012

TABLA 6: Porcentaje de AgBs Positivos y Negativos

PRUEBAS	Ni	%
RESULTADOS POSITIVOS	6	6,6%
RESULTADOS NEGATIVOS	85	93,4%
TOTAL	91	100,0%

FIGURA 14: RELACIÓN PORCENTUAL DE MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS



De acuerdo al análisis realizado en el Equipo de ELISA y siguiendo todos los procedimientos adecuados en las 91| muestras de sangre se determinó que el 7% son pacientes positivos o reactivas que deberán ser sometidas a exámenes adicionales y confirmatorios ya que esta prueba es de Screening; mientras que el 93% indican resultados negativos.

3.6 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Gracias a la investigación se pudo comprobar la hipótesis, del test estadístico unilateral, mediante la prueba del AgBs de Elisa si ayuda al Diagnóstico de la Hepatitis B en las trabajadoras sexuales que acudieron al Centro de Salud #1 Guano- Penipe en Enero a Junio 2012.

CAPITULO IV

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- ✓ Al realizar esta investigación se ha logrado conocer la anatomía, fisiología del hígado, y la manera en la que este órgano es afectado por la enfermedad de la Hepatitis B (estudio de la patología).
- ✓ Mediante la prueba de ELISA determinamos los antígenos de superficie de la Hepatitis B en las trabajadoras sexuales que acudieron al Centro de Salud N° 1 Guano-Penipe
- ✓ Se dedujo que los resultados son más específicos ya que es un método sensible a comparación del método inmunocromatográfico a pesar de que las dos pruebas son de screening se obtienen menos falso negativos.
- ✓ Se realizaron 91 muestras de sangre, estableciéndose que el 93% de las muestras representa resultados negativos para la Hepatitis B; en tanto el 7% indican resultados positivos para la misma, de acuerdo con los datos estadísticos en la investigación cuyas absorbancias son: 0.144, 0.094, 0.095, 0.072, 0.408, 0.062.
- ✓ Se determinó que existe incidencia de la enfermedad en las trabajadoras sexuales y que el porcentaje de un 7% lo cual indica el peligro de propagación de esta enfermedad mortal.

4.2 RECOMENDACIONES

- ✓ Las pruebas deben realizarse tomando en cuenta las normas de bioseguridad propias ya que se está trabajando con muestras bio contagiosas.
- ✓ Las pacientes se realicen constantemente este tipo de pruebas ya que ellas son consideradas un grupo de alto riesgo tanto de contagio como de transmisión de Hepatitis B.
- ✓ Se debe realizar a las pacientes que tienen resultados positivos pruebas confirmatorias de la prueba.
- ✓ Durante el proceso de lavado y secado de los micro pocillos antes de poner el sustrato reactivos ya que podemos dar un falso negativo o positivo dependiendo del caso debido al detergente que contiene la sustancia de lavado..
- ✓ Es necesario seguir la guía que describe el protocolo adecuado para la cuantificación de las absorbancias de la Hepatitis B mediante el equipo de Elisa, cumpliendo así con cada paso detallado en la misma y con la finalidad de evitar errores durante el proceso.
- ✓ Para la colocación de la muestra, conjugado, sustrato y solución de parada deben pipetear sin ninguna burbuja para evitar errores.

BIBLIOGRAFIA.

- ✓ Diccionario de Medicina Océano Mosby, Editorial MMIII océano, Barcelona-España.
- ✓ MEJIA Gilberto: Diccionario de Laboratorio Aplicado a la Clínica, Editorial Panamericana, Bogotá- Colombia, 2005
- ✓ SUARDÍAZ Jorge, CRUZ Celso, COLINA Ariel: Laboratorio Clínico, Editorial Ciencias Médicas, La Habana - Cuba, 2004.
- ✓ Gestión de Calidad en el Laboratorio Clínico, C. Fernández, Editorial Panamericana, España 2005.

LINKOGRAFIA

- ✓ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001154.htm>
- ✓ <http://www.monografias.com/trabajos10/hepa/hepa.shtml>
- ✓ <http://www.dmedicina.com/enfermedades/infecciosas/hepatitis-a>
- ✓ <http://www.mapfre.com/salud/es/cinformativo/biopsia-hepatica.shtml>
- ✓ <http://www.xerion.com.co/HBsAg%20%20CASSETTE.pdf>
- ✓ http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0253-29482006000200008&script=sci_arttext
- ✓ <http://abderainmunologia.wetpaint.com/page/Ant%C3%ADgeno+y+anticuerpo>
- ✓ <http://es.wikipedia.org/wiki/Ant%C3%ADgeno>
- ✓ <http://abderainmunologia.wetpaint.com/page/Ant%C3%ADgeno+y+anticuerpo>
- ✓ <http://medicinafarmacologia.blogspot.com/2009/12/celulas-de-kupffer.html>
- ✓ <http://www.facmed.unam.mx/deptos/anatomia/computo/higado/index2.html>

ANEXOS

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

FIGURA 15: REGISTRO DE LA PACIENTE



FIGURA 16: TOMA DE MUESTRA



FIGURA 17: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



FIGURA 18: SEPARACIÓN DE SUERO PARA ALMACENARLO EN REFRIGERACIÓN -4°C

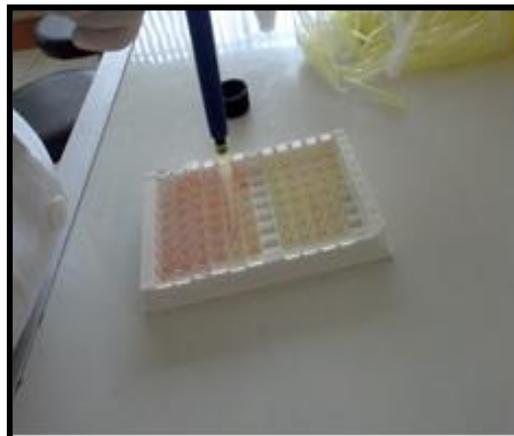


FIGURA 19: DETERMINACION DE HEPATITIS B CON ELISA

A



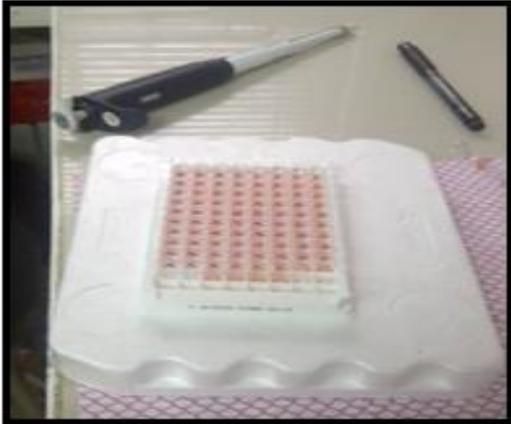
B



A: Preparación de los materiales para la realización de la corrida de las muestras

B: Pipeteo de la muestra y del conjugado

C



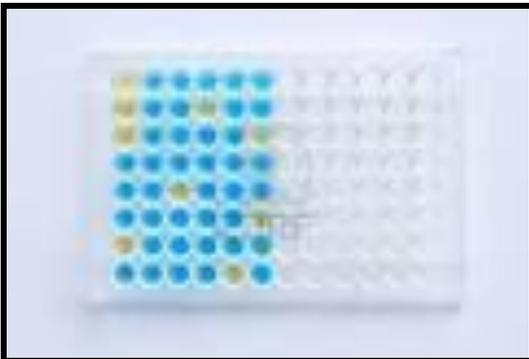
D



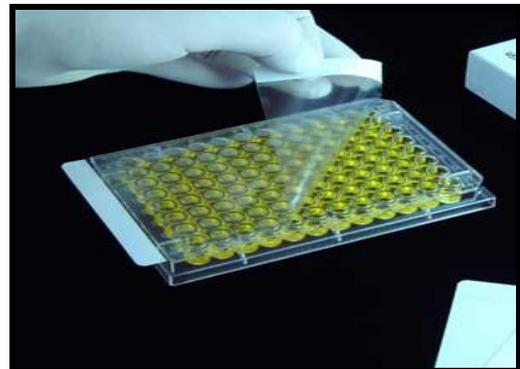
C: Esperar los 120 min con el conjugado protegido de la luz y cubierto por una cinta adhesivo

D: Lavado manual del micro-pocillos por 3 veces

E



F



E: Añadimos el sustrato y esperamos 15 min protegidos por la luz y con cinta adhesiva.

F: Ponemos la solución de parada y leemos inmediatamente o hasta una hora después de puesta la solución de parada

G



H



G: Colocación de los micro pocillos en el equipo

H: Lectura de los micro pocillos con las muestras en el equipo de micro ELISA

ANEXO

FIGURA 20: PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS

PROTOCOLO DE TRABAJO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS				
HBsAg				
Casa Comercial	Human	Preparado por:	Posita Lema - Ma José Marchán	
Nombre tech:		Fecha de inicio: aa/mm/dd	17 Julio 2012	No. de muestras a correrse: 10
N Lote:	51048	Fecha de finalización:	17 Julio 2012	Fecha de expiración:
Fuente de las muestras:				
No.	Descripción	Visto	Observaciones	Materiales
	PREPARACIÓN DE REACTIVOS			
Lugar: Mesa de Laboratorio Serología				
1	Sacar el reactivo Kits conservado a temperatura de 2 a 8 °C	✓	Esperar 15 minutos para que se ponga a temperatura ambiente. Constatar que todas las placas estén en buenas condiciones. Que corresponda el nombre del Kit -Lote y fecha de caducidad.	KIT HBsAg Human
4	Tiras Microelisa	✓	Buenas condiciones: cerciorarnos que no haya condensación en las tiras.	Los soportes. Las tiras de microelisa. Guantes
2	Controles Negativo.- No Reactivo a HBsAg.	✓	Que este completo, sin derrames. Mezclar. Listos para el uso. Que corresponda al Kit y al lote	Control Negativos
3	Control Positivo.- (1)Suero bovino en solución de cloruro sódico con AgHBs subtipo ad producido por una línea celular humana	✓	Que este completo, sin derrames. Mezclar. Listos para el uso. Que corresponda al Kit y al lote	Control Positivo
3	Solución de lavado WASH Tampón Fosfato concentrado	✓	Diluir 1+19 con agua destilada. Ejemplo: 1 mL de tampón con 19 mL de agua destilada. No utilizar el tampón cristalizado disolver a 37 °C. Mezclar. Estable 2 semanas de 2 a 8 °C. Se Necesita aprox. 3mL por pocillo.	Agua destilada. Probeta, balones aforados o Erlenmeyer. Frascos ámbar en caso de guardar la solución de lavado.
5	SOLUCIÓN DE SUSTRATO B SB 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina DMSO	✓	Incoloro. - Si hay cambio de color desechar.	Tubos tapa roja nuevos. O Lavados con agua destilada. Frascos de SB. Pipetas y puntas.
6	SOLUCIÓN DE SUSTRATO A SA Peróxido de hidrogeno, Buffer ácido cítrico.	✓	Incoloro, azulado. - Cambio de color desechar. - Combinar con la anterior en partes iguales según número de pocillos (100 uL para cada pocillo)	Tubos tapa roja nuevos. O Lavados con agua destilada. Frascos de SB. Pipetas y puntas.
8	SOLUCIÓN DE STOP Ácido Sulfúrico. 1 mol /L.	✓	Siempre se deberá añadir el ácido SOBRE el agua lentamente mientras se remueve. Produce una reacción exotérmica. Es cáustico, corrosivo, cuidado con la piel.	Lentes protectores, mascarilla, hielo, peras de seguridad, pipetas serológicas, frascos ámbar.
MUESTRA				
9	Suero, plasma citrado o heparinizado (EDTA)	✓	No se requiere ayunas. - No preparación especial al paciente. Punción venosa normal, el uso de otro tipo de anticoagulante puede alterar los resultados. Las muestras pueden ser conservadas de 2 a 8 °C por 1 semana. Si desea guardar más tiempo almacenar en alícuotas a -30 °C. No contaminación microbiana.	Suero o plasma. Viales para obtener la muestra.
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA				
Lugar: Mesa de Laboratorio Serología				
10	Realizar una lista o mapa de las muestras a correr	✓	Orden. Letra clara. Sin tachones	Hojas de registros. Esferos gráficos.
11	Preparar la placa con la cantidad de pocillos necesarios. Incluir controles positivos, negativos y control interno	✓	Soporte adecuado. Enumerar las placas. Verificar que las esferas de conjugado estén en el fondo antes de quitar el precinto.	Tiras microelisa. Soporte. Marcador. Guantes
12	Pipetear 50 uL de muestra a cada pocillo comparando con el mapa	✓	Para evitar contaminación no tocar con los dedos ni con las puntas de las pipetas la parte superior o inferior de la esfera del conjugado. Lista para el uso. Pipetear suavemente, en los pocillos asignados incluir 2 controles negativos, un positivo y un control interno. Los controles pipetear al último.	Pipetas. Puntas. Muestras y controles

12	Pipetear conjugado CON En cada pocillo		Pipetear 50 uL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco A1. Pipetear suavemente, en los pocillos asignados.	Pipetas . Puntas. Muestras y controles
11	Mescla, cubra e incube Incubar las tiras a 37 °C por 80 minutos.		Cubrir con cinta adhesiva del Kit o maskin para evitar evaporación. Respetar el tiempo de incubación, para obtener mayor sensibilidad para la detección de la seroconversión.	Cinta Adhesiva del Kit o maskin. Incubador Automático, Instructivo para utilización del Incubador automático. Cronómetro.
7	SOLUCIÓN DE TRABAJO SUB Mientras se incuba. Preparar el sustrato SUB .		Preparar el Sustrato de SUB 20 minutos antes de que se termine de lavar. Mezclar reactivo de sustrato SA y SB en partes iguales según el número de pocillos (100 uL por pocillo). Mezclar suavemente. Proteger de la luz.	Tubos tapa roja nuevos. O Lavados con agua destilada.
13	LAVAR - WASH 8 veces con tampón fosfato WASH y secar con papel absorbente.		El lavado incompleto afecta negativamente. Lavar e inundar cada pocillo 8 veces con 350 uL de WASH dejando reposar 30 segundos luego de cada lavada. Secar el resto de líquido con papel absorbente completamente.	Lavador automático. Papel absorbente. Cronómetro. Ver instructivo de lavado automático para HBsAg.
15	Pipetear 100 uL de sustrato SUB a cada pocillo		Mezcle cuidadosamente	Pipetas, puntas, sustrato preparado
16	Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.		Dejar en obscuridad	Cronómetro
17	STOP Añadir solución de STOP como solución de parada.		Pipetear 100 uL., manteniendo la misma secuencia de pipeteado, para parar la reacción	Acido sulfúrico preparado, pipetas, puntas.
18	LECTURA Leer la absorbancia de la solución de cada pocillo de 620 - 690 nm.		Verificar lámpara y filtros. Leer antes de los 30 minutos.	Lector automático. Instructivo de Lector Automático. Impresora matricial.

ANEXO

FIGURA 21: TECNICA DE HUMAN

HBsAg

ELISA para la detección del antígeno de HBs en suero y plasma humanos

Presentación del estuche
[REF] 51048 96 Determinaciones Estuche completo
[IVD]

Uso previsto

La hepatitis viral es una enfermedad infecciosa que lo más frecuentemente es causada por el virus de la hepatitis B (VHB) el cual afecta alrededor de un 5% de la población mundial con algunas variaciones regionales. La enfermedad puede manifestarse sin síntomas, aguda (con casos fulminantes y mortales), o hepatitis crónica con posible degeneración en cirrosis y/o carcinoma hepatocelular y muerte.

La enfermedad usualmente se transmite por intercambio de fluidos corporales entre individuos sanos e infectados. La patología de la transmisión es a través de vía parenteral (suero infectado, hemoderivados, transfusiones sanguíneas, etc.) o no-parenteral (saliva, lágrimas, sudor, orina, semen, heridas en la piel, etc.).

El monitoreo básico para evaluar la infección de HBV se hace determinando la presencia del antígeno de superficie del VHB (HBsAg) en suero. La presencia del HBsAg da una indicación de ser un portador del VHB y la posibilidad de ser infeccioso. La determinación final del estado infeccioso de una persona infectada es posible cuando se realiza la prueba de HBsAg en conjunto con los otros marcadores del VHB como lo son el HBeAg/anti-HBe, el anti-HBc y el anti-HBs.

Principio

La prueba HBsAg se basa en la técnica ELISA directa para la detección de anticuerpos empleando micropocillos recubiertas de un anticuerpo monoclonal (mab, ratón) hacia el HBsAg.

La muestra reacciona simultáneamente con los mab inmovilizados y con los anticuerpos policlonales anti-HBs (cobayo) conjugados con peroxidasa del rábano. Si HBsAg está presente en la muestra, el complejo conteniendo peroxidasa es capturado en la superficie de los micropocillos (etapa 1). Tras la incubación, el conjugado enzimático no ligado se elimina por lavado. Se agrega solución de sustrato (etapa 2) y en el curso de la incubación posterior, se forma un color azul. Después de parar la reacción con solución ácida, el color cambia a amarillo. La intensidad de ese color es proporcional a la cantidad de HBsAg en la muestra.

La absorbancia de los controles y muestras se determina haciendo uso de un lector de micropocillos ELISA o sistemas completamente automatizadas (p.ej. instrumentos de las líneas HumaReader o ELISYS de HUMAN). Los resultados de los pacientes se obtienen por comparación con el valor de punto de corte.

Reactivos y contenidos

[MIC]	12	Tiras de Micropocillos Tiras (desprendibles) de 8 pocillos recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-HBs (ratón)	
[NC]	2,0 ml	HBsAg Control negativo (tapa amarilla) listo para usar, suero humano	
[PC]	1,5 ml	HBsAg Control positivo (tapa roja) listo para usar, suero humano	
[CON]	8,0 ml	Conjugado enzimático anti-HBsAg pH 8,1 ± 0,2 (tapa negra) Conjugado de anti-HBs (cobayo) y peroxidasa del rábano, coloreado rojo Buffer Tris / HCl 0,1 mol/l	
[WS]	58 ml	Solución de lavado (20x) (tapa negra) pH 6,5 ± 0,2 Concentrado para aprox. 1000 ml Buffer salino fosfato 1 mol/l Tween-20 0,2 %	
[SA]	12 ml	Reactivo sustrato A (tapa blanca) pH 5,1 ± 0,2 Peróxido de hidrógeno 0,03 % Buffer ácido cítrico 0,06 mol/l	
[SB]	12 ml	Reactivo sustrato B (tapa negra) 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 0,6 mg/ml DMSO 0,7 mol/l	
[STOP]	12 ml	Solución de parada (tapa blanca) Acido sulfúrico, listo para usar (R36/38), X, irritante 1,0 mol/l	
	1	Portatira Cintas adhesivas	

Agentes preservantes: Concentración total < 0,1%

++++ [1] +++++ Nuevo: [SUB] Estabilidad mejorada +++++

Notas de seguridad

No ingiera los reactivos. Evite el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y controles deberán ser manipulados como posibles agentes infecciosos. El control positivo ha sido inactivado por calor. El control negativo ha sido encontrado negativo para marcadores de la hepatitis B. Ambas controles han sido encontrados negativos para anticuerpos hacia el VHC y VIH 1 + 2. Use ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o controles deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

[STOP], [NC], [SA] y [SB] irritan los ojos, la piel y las membranas mucosas. En caso de contacto, lave intensamente con abundante agua y consulte un médico.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de caducidad en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abierto los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de un mes (ver también "Nota").

[WS] (20x) debe almacenarse a temperatura ambiente para evitar cualquier cristalización.

[MIC]

- Están envasadas en bolsas de aluminio selladas con un desecante
- ¡Deben estar a temperatura ambiente antes de abrir!
- No utilizadas: devuelva en el envase con cierre y almacenar de 2...8°C.
- No toque el borde superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (15...25°C) antes del uso.

Los reactivos que no están en uso deben siempre estar almacenados a 2...8°C.

Solución de lavado de trabajo [WASH]

- Cristales dentro de [WS] deben resolverse por calentamiento a 35...37°C
- Diluya [WS] 1 + 19 con agua destilada o desionizada fresca y estéril, p.ej. 50 ml de [WS] + 950 ml = 1000 ml.
- Se necesita aprox. 3 ml de [WASH] por pocillo
- Prepare sólo la cantidad que se necesita para la corrida en curso.
- Estabilidad: 1 semana de 2...8°C.

Solución de trabajo de sustrato [SUB] (ver también esquema de pipeteo alternativo A 2)

- Antes del uso, prepare la cantidad necesaria mezclando porciones iguales de [SA] y de [SB] en un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua desionizada.
- [SA] debe ser incoloro a azulado, de lo contrario debe ser eliminado.
- ¡Manipule [SUB] cuidadosamente y evite la contaminación! ¡No utilice, si es de color azul!
- Almacene protegido de la luz intensa.
- Estabilidad: 6 horas a temperatura ambiente (15...25°C)

Muestras

Suero y plasma con los anticoagulantes citrato, heparina o EDTA.

No use muestras altamente hemolíticas.

Las muestras no diluidas pueden almacenarse para 8 horas a 15...25°C, para 5 días a 2...8°C, o para 3 meses a -20°C. Congele solamente una vez. Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Elimine el material particulado por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Siga el procedimiento exactamente como se describe.

Notas de uso

- U1: No mezcle o use componentes de diferentes números de lote. No mezcle tapas de envases (riesgo de contaminación). No use reactivos después de sus fechas de caducidad.
- U2: No use reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.
- U3: Note el reparto de las muestras y de los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.
- U4: [MIC] - coloque el número requerido firmemente en el portatiras.

U5: Analice el control positivo o negativo en duplicado o triplicado respectivamente. Pipetee los controles y las muestras en el fondo de los micropocillos.

U6: Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos. Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 5 minutos. De lo contrario pipetee los controles en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de 1 placa, repita los controles para cada placa.

U7: Evite/remueva burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.

U8: [SUB] – incuba en la oscuridad. [SUB] inicia y [STOP] termina la reacción enzimática.

Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remueva las tiras adhesivas, aspire el contenido (en un envase con solución de hipoclorito de sodio al 5%), agregue [WASH], aspire después de un tiempo de remojo de 30 seg. y repita el lavado 7 veces.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben llenar y enjuagar con [WASH]. Después lave los pocillos 8 veces. Asegúrese que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 seg. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, remueva el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

Esquema de pipeteo

Siga el procedimiento exactamente como se describe. ¡Preste particular atención al procedimiento de lavado!

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.

Etapa 1	Pocillo [µl]			
	A1 Blanco	B1-D1 [NC]	E1/F1 [PC]	G1... Muestr.
[NC] por triplicado	--	50	--	--
[PC] por duplicado	--	--	50	--
Muestras	--	--	--	50
[CON]	--	50	50	50

Mezcle cuidadosamente
Cubra [MIC] con cintas adhesivas
Incuba por 80 min. a 37°C
Lave 8 veces como se describe (ver L1 - L3)

Etapa 2	A1	B1-D1	E1/F1	G1...
[WASH]	350	350	350	350
[SUB]	100	100	100	100

Mezcle cuidadosamente
Incuba por 30 min. a 15...25°C (ver U8)
[STOP] 100 100 100 100

Mezcle cuidadosamente
Utilice el blanco en A1 para blanquear el fotómetro.
Mida la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 30 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 620-690 nm (si está disponible).

Procedimientos alternativos para analizadores ELISA automatizados:

A 2:
(Etapa 2) Primero dispense 50 µl de [SA], y después 50 µl de [SB] en cada pocillo incluyendo A1; mezcle bien y proceda como se describe

Cálculo de los valores de control, punto de corte e índice de punto de corte

Los valores medios de absorbancia de [NC] en los pocillos B1, C1 y D1 (MNC) y de [PC] en los pocillos E1 y F1 (MPC) se calculan usando la fórmula siguiente:

$$MNC = \frac{A_{450}(B1) + A_{450}(C1) + A_{450}(D1)}{3} \quad MPC = \frac{A_{450}(E1) + A_{450}(F1)}{2}$$

Punto de corte (Cut-off) COV = MNC + 0,025

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

1. Blanco A1 < 0,100
Debería ser incoloro o ligeramente amarillo, si no la prueba está inválida y debe repetirse.
2. MNC < 0,100
3. MPC ≥ 0,600
4. MPC – MNC ≥ 0,50.

Interpretación de resultados

Resultado	Interpretación
A450 (muestra) < COV	negativo para HBsAg no reactivo
A450 (muestra) ≥ COV	positivo para HBsAg inicialmente reactivo: reanalizar
Reanalizar en duplicado:	HBsAg
A450 (muestra) ≥ COV	repetidamente reactivo: proceder a análisis de confirmación

Características de la ejecución

Sensibilidad y especificidad

El HBsAg ELISA de HUMAN ha sido analizado con 400 muestras positivas y 5714 muestras negativas no seleccionadas contra pruebas ELISA comerciales. Sensibilidad: 100%; Especificidad: 99,6%.

La sensibilidad de seroconversión del HBsAg ELISA de HUMAN ha sido evaluado usando 30 paneles de seroconversión verificando los resultados con relación a un ensayo comercial con marca CE. La sensibilidad de seroconversión se mostró equivalente.

La sensibilidad frente a mutantes de HBsAg ha sido evaluada usando un panel de mutantes pre-core de hepatitis B (de Teragenis, EEUU) y 21 muestras mutantes diferentes. Todas las 9 muestras del panel y 17 muestras mutantes se encontraron reactivas, mientras que el estuche de referencia con marca CE daba un resultado reactivo en 14 muestras mutantes únicamente. Las mutantes R122I, I222RA123, C124R y P142L/G145R se encontraron no reactivos con la prueba HBsAg ELISA de HUMAN.

Las características de la ejecución de esta prueba pueden consultarse en el informe de verificación, accesible vía:

www.human.de/data/gb/vr/el-hbsag.pdf

www.human-de.com/data/gb/vr/el-hbsag.pdf

Nota

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(*Esto incluye: Coloque la tapa debida en el frasco y ciérralo firmemente / Saque de los frascos de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)

Literatura

1. Magnus L.O. et al., J. Am. Med. Assoc. **231**, 356-359 (1975)
2. Rubin E., Federation Proceedings **38**, 2665-2673 (1979)
3. Aach R.D. et al., Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A. **68**, 1056 (1971)
4. Kim C.Y., Tilles J.G., J. Clin. Invest. **52**, 1176-1186 (1973)
5. Caldwell C.W., Barret J.T., Clin. Chim. Acta **81**, 305 (1977)
6. Wolters G. et al., J. Infect. Dis. **136**, 311 (1977)
7. Darrell L. et al., J. Biol. Chem. **257**, 10414-10420 (1982)
8. Hoofnagle J.H., Di Bisceglie AM, Semin Liver Dis. **11**, 73-83 (1991)

EL-HBSAG INF 5104801 E 12-2011-20



Human

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de

ANEXO

FIGURA 22: PROCEDIMIENTO PARA LA CORRIDA DE MUESTRAS

QUICK GUIDE – HBsAg ELISA

REF 51048

1 PREPARATION WORKING REAGENTS

WASH = WS + H₂O deionised

1 part 19 parts

SUB = SA + SB

1 part 1 part

> Stability: 1 week 2...8°C 6 hours 15...25°C

2 DISTRIBUTION OF CONTROLS, SAMPLES

> pipette

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	⊗												A
NC	→												B
50µl													C
													D
PC	→												E
50µl													F
													G
samples	→												H
50µl													

3 DISTRIBUTION OF CONJUGATE

- > pipette
- > mix carefully
- > cover with adhesive strip
- > incubate **80 min**, **37 °C**
- > wash **8 x 350 µl**

CON
50µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	⊗												A
													B
													C
													D
													E
													F
													G
													H

4 DISTRIBUTION OF SUBSTRATE

- > pipette
- > mix carefully
- > incubate **30 min**, **15...25 °C**

SUB
100µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
													A
													B
													C
													D
													E
													F
													G
													H

5 TERMINATION

- > pipette
- > mix carefully

STOP
100µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
													A
													B
													C
													D
													E
													F
													G
													H

6 READING

- > measure the absorbance at **450 nm**
as soon as possible or **within 30 minutes**

Human
Diagnostics Worldwide

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
 Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
 Tel. +49 6122-9988-0 · Fax +49 6122-9988-100 · e-mail: human@human.de · www.human.de

ANEXO

FIGURA 23: HOJA DE ABSORVANCIAS DE LAS MUESTRAS.

HUMAN ELISA												
HBsAg REF 51048			USER: UNTERSUCHER: USUARIO: USAGER:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANCO 0.031	0.021	0.040	0.047	0.045	0.049	0.024	0.047	0.033	0.033	0.033	0.035
B	CN1 0.035	0.027	0.029	0.047	0.035	0.032	0.034	0.028	0.036	0.025	0.072	0.1108
C	CN2 0.036	0.048	0.024	0.027	0.027	0.022	0.037	0.032	0.030	0.049	0.061	0.029
D	CN3 0.039	0.026	0.080	0.044	0.094	0.031	0.042	0.037	0.037	0.029	0.029	0.034
E	CP1 0.084	0.027	0.046	0.024	0.039	0.047	0.030	0.036	0.070	0.030	0.024	0.037
F	CP2 0.073	0.028	0.028	0.025	0.045	0.033	0.040	0.029	0.027	0.041	0.028	0.034
G	0.004	0.032	0.033	0.021	0.046	0.031	0.032	0.1108	0.022	0.028	0.027	0.029
H	0.039	0.039	0.047	0.144	0.060	0.032	0.035	0.045	0.035	0.033	0.023	0.046

Date:	Negative control:
Datum:	Negativkontrolle:
Dato:	Control negativo:
Date:	Contrôle négatif:
Lot:	Positive control:
Ch.-B.:	Positivkontrolle:
Lote:	Control positif:
Lot:	Contrôle positif:
Expiry date:	Cut-off value:
Verfallsdatum:	Grenzwert:
Fecha de expiración:	Valor límite:
Date d'expiration:	Valeur Cut-off:

ELISA
 INF 5104802
 10-2011-5

HUMAN Gesellschaft für Biochemie und Diagnostica mbH
 Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
 TEL. +49 6122-9988-0 · FAX +49 6122-9988-100 · E-mail: human@human.de · www.human.de

ANEXO

FIGURA 24: PRUEBAS CONFIRMATORIAS

Esquema actual de vacunación

Edad	Dosis
Recién nacidos	Dosis cero
2, 4 y 6 meses	Pentavalente
Escolares	HB infantil
Grupos de riesgo	HB adultos

Con más de mil millones de dosis aplicadas, los estudios médicos y científicos han demostrado que la vacuna contra la hepatitis B es una de las más seguras

Interpretación de exámenes para hepatitis B

Test	Resultados	Interpretación
HbsAg Anti-Hbc Anti-HBs	Negativo Negativo Negativo	Susceptible
HbsAg Anti-Hbc Anti-HBs	Negativo Negativo Positivo (> 10 ml U/mL)	Inmune debido a la vacuna
HBsAg Anti-Hbc Anti-HBs	Negativo Positivo Positivo	Inmune debido a la infección natural
HBsAg Anti-Hbc IgM anti-HBc Anti-HBs	Positivo Positivo Positivo Negativo	Infección aguda
HBsAg Anti-Hbc IgM anti-HBc Anti-HBs	Positivo Positivo Negativo Negativo	Infección crónica

Ministerio de Salud Pública

Organización Panamericana de la Salud
Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud