

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

2a.

Serología de las hepatitis
víricas

2 0 0 4

Coordinador: Alberto Delgado-Iribarren García-Campero

Autores: Alberto Delgado-Iribarren García-Campero

José Manuel Echevarría Mayo

Pilar León Rega



ISBN: 84-609-2288-Y

ÍNDICE

DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción
2. Consideraciones clínicas
 - 2.1 Hepatitis A
 - 2.2 Hepatitis B
 - 2.3 Hepatitis D (delta)
 - 2.4 Hepatitis C
 - 2.5 Hepatitis E
 - 2.6 Hepatitis G
 - 2.7 Virus TT
3. Recogida, transporte y conservación de la muestra. Manejo en su recepción en el Laboratorio de Microbiología
4. Selección de ensayos serológicos
 - 4.1 Hepatitis A
 - 4.1.1 VHA-IgM
 - 4.1.2 VHA-IgG
 - 4.1.3 Detección del VHA
 - 4.2 Hepatitis B
 - 4.2.1 HBsAg (antígeno de superficie)
 - 4.2.2 Confirmatorio HBsAg
 - 4.2.3 Anti-HBs (anticuerpo frente al antígeno de superficie)
 - 4.2.4 Anti-HBc (anticuerpo frente al antígeno del *core*)
 - 4.2.5 Sistema "e": HBeAg-anti-Hbe
 - 4.2.6 ADN VHB
 - 4.2.7 Genotipificación y detección de mutantes resistentes al tratamiento antivírico
 - 4.3 Hepatitis D ó delta
 - 4.3.1 Antígeno delta (VHDAg)
 - 4.3.2 Anti-VHD IgM
 - 4.3.3 Anti-VHD total
 - 4.3.4 ARN-VHD
 - 4.4 Hepatitis C
 - 4.4.1 Anti -VHC
 - 4.4.2 Anti -VHC: pruebas confirmatorias
 - 4.4.3 Anti-VHC: avidéz de IgG
 - 4.4.4 ARN-VHC
 - 4.4.5 HCcAg (Antígeno *core* del VHC)
 - 4.4.6 Genotipificación
 - 4.4.7 Serotipificación
 - 4.5 Hepatitis E
5. Criterios para interpretación de resultados
 - 5.1 Diagnóstico de hepatitis aguda
 - 5.1.1 Marcadores de rutina
 - 5.1.2 Criterios generales de interpretación
 - 5.1.3 Criterios de interpretación en pacientes usuarios de drogas por vía parenteral
 - 5.1.4 Marcadores adicionales en la hepatitis aguda no-A, no-B, no-C
 - 5.2 Hepatitis crónica
 - 5.2.1 Marcadores de rutina
 - 5.2.2 Criterios de interpretación
 - 5.3 Marcadores serológicos de replicación en el seguimiento de tratamientos
 - 5.3.1 Muestra basal
 - 5.3.2 Marcadores de respuesta al tratamiento
 - 5.3.2.1 Pacientes infectados por VHC genotipo 1
 - 5.3.2.2 Pacientes infectados por VHC genotipos 2 y 3

- 5.4 Interpretación de patrones atípicos para marcadores de infección por VHB
 - 5.4.1 Reactividad aislada para anti-HBc (ausencia de HBsAg y anti-HBs)
 - 5.4.2 Reactividad confirmada para HBsAg en ausencia de anti-HBc total
 - 5.4.3 Reactividad aislada para anti-HBs en individuos no vacunados
 - 5.4.4 Coexistencia de HBsAg y anti-HBs
- 6. Procedimientos a realizar en situaciones especiales
 - 6.1 Transmisión vertical
 - 6.1.1 Hepatitis B
 - 6.1.2 Hepatitis C
 - 6.2 Convivientes de pacientes con hepatitis
 - 6.2.1 Hepatitis A
 - 6.2.2 Hepatitis B
 - 6.2.3 Hepatitis C
 - 6.3 Donantes de sangre y donantes de órganos
 - 6.4 Grupos de riesgo
 - 6.4.1 Hepatitis A
 - 6.4.2 Hepatitis B
 - 6.4.3 Hepatitis C
 - 6.4.4 Hepatitis B y C
- 7. Información de resultados
- 8. Técnicas rápidas de diagnóstico
- 9. Procedimientos no aceptables
- 10. Esquemas de diagnóstico e interpretación de los diferentes marcadores de las hepatitis víricas en las situaciones más frecuentes
- 11. Bibliografía

DOCUMENTO TÉCNICO

Introducción

- 1. Propósito y alcance
- 2. Fundamento
- 3. Documentos de consulta
- 4. Toma de la muestra
- 5. Reactivos y productos
- 6. Aparatos y material
- 7. Procesamiento
- 8. Obtención y expresión de resultados
- 9. Responsabilidades
- 10. Anotaciones al procedimiento
- 11. Limitaciones del procedimiento
- 12. Bibliografía

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

2a. SEROLOGÍA DE LAS HEPATITIS VÍRICAS. 2004

Coordinador: Alberto Delgado-Iribarren García-Campero

**Autores: Alberto Delgado-Iribarren García-Campero
José Manuel Echevarría Mayo
Pilar León Rega**

1. INTRODUCCIÓN

La serología de las hepatitis víricas supone la principal carga del laboratorio de inmunomicrobiología, con la suficiente entidad para que la SEIMC publicara unos procedimientos hace ya una década. El abecedario de las hepatitis víricas está compuesto por un grupo heterogéneo de virus que tienen en común el tropismo hepático y que ha sufrido importantes modificaciones en los últimos tiempos, aunque muchas de las recomendaciones emitidas hace años mantienen aún su validez. Habitualmente, se agrupan para su estudio en función de su modo de transmisión y su capacidad de producir infección crónica, pero en este documento seguiremos el orden alfabético, salvo para el virus de la hepatitis D (VHD), íntimamente relacionado con el virus de la hepatitis B (VHB) por ser un virus defectuoso y que requiere la presencia de este último para producir infección. El diagnóstico de infección por estos virus requiere, además de las técnicas serológicas, el conocimiento de la epidemiología de estos virus.

El uso de vacunas eficaces e inocuas para las hepatitis A y B y, por lo tanto, para la hepatitis D, está cambiando la epidemiología de estas infecciones. Por otra parte, las terapias antivíricas para las hepatitis B y C crónicas son ya una realidad de la que se benefician miles de pacientes en nuestro sistema sanitario. Por todo ello, resulta del mayor interés el establecimiento de un diagnóstico exacto del tipo de infección vírica, que precise el estadio de la enfermedad y permita tomar la decisión terapéutica más adecuada en cada caso y establecer las medidas preventivas necesarias en la comunidad. Los avances en este campo, con el mejor conocimiento de los marcadores víricos (productos del virus o anticuerpos específicos), han permitido en los últimos años aproximarse a un diagnóstico más preciso de estas infecciones.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La solicitud de un estudio serológico para estos virus presenta una gran variabilidad que depende de la situación clínica del paciente. Esta situación debe comunicarse al laboratorio de Microbiología para la elección del perfil diagnóstico adecuado. La más frecuente son las alteraciones de los parámetros bioquímicos hepáticos, principalmente las transaminasas. Aunque la hepatitis aguda es en la actualidad minoritaria, mantiene una relevancia clínica de primer orden. Además es enfermedad de declaración obligatoria, lo que hace imprescindible el diagnóstico serológico. La edad, factores de riesgo y sintomatología clínica del paciente pueden orientar respecto al agente etiológico, pero siempre se requiere una confirmación mediante métodos de laboratorio. El diagnóstico de las hepatopatías crónicas o las alteraciones de la bioquímica hepática son las solicitudes más frecuentemente recibidas y los agentes a estudiar deben reducirse a los que producen infección crónica, básicamente el VHB y el virus de la hepatitis C (VHC). A estos dos agentes también podemos adscribir aquellas solicitudes de

cuadros clínicos extrahepáticos en los que también pueden estar implicados los virus de la hepatitis (crioglobulinemia, síndrome de Schönlein-Henoch, ...). Finalmente, puede haber solicitudes sobre el estado inmunitario de un paciente, que deben estar limitadas a posibles vacunaciones frente al VHA y VHB, y a donación de sangre u órganos en este último y en el VHC. Toda esta complejidad aconseja la elaboración de algoritmos diagnósticos o perfiles serológicos adecuados para cada situación. La tendencia actual de realizar los mismos marcadores a todos los pacientes es poco eficiente, no sólo desde el punto de vista económico, sino también del científico, al variar los valores predictivos del ensayo en función de la población estudiada. A continuación, se exponen brevemente las particularidades clínicas de los virus implicados.

2.1 HEPATITIS A

Este virus produce enfermedad sintomática aguda con mayor frecuencia según aumenta la edad, pero en ningún caso llega a establecer infección crónica y menos del 1% de los infectados desarrollan una forma clínica fulminante. Se encuentra en las heces durante el período de incubación, manteniéndose hasta dos semanas después del inicio de la clínica. Presenta una breve fase de viremia carente de relevancia epidemiológica.

2.2 HEPATITIS B

La evolución clínica de la hepatitis B puede ser muy variable, desde una infección asintomática, anictérica, que ocurre en la mayoría de los casos, hasta una enfermedad aguda, que en algunas ocasiones se complica evolucionando hacia la cronicidad, la cirrosis o a la forma fulminante fatal, también bastante infrecuente (1%). La frecuencia media de cronificación se estima en un 5-10%, siendo menor en los casos que cursan con sintomatología florida. Además, se ha comprobado a través de evidencias epidemiológicas una estrecha relación de esta enfermedad vírica con el carcinoma hepatocelular.

La presencia en suero de ciertas proteínas víricas y de los anticuerpos a que dan lugar se modifica a lo largo del tiempo, en estrecha relación con la evolución biológica de la enfermedad; por ello, su determinación puede servirnos para evaluar la situación actual y el pronóstico futuro de la infección vírica. La apropiada interpretación de los marcadores serológicos permitirá diagnosticar la infección en el enfermo así como realizar un pronóstico fiable.

2.3 HEPATITIS D (DELTA)

Se trata de un virus defectuoso que sólo puede infectar los hepatocitos cuando está presente el VHB. La infección puede suceder a través de un inóculo que contenga ambos virus (co infección) o por la llegada del virus al hígado de un portador crónico de VHB (sobre infección). La primera situación se asocia con cierta frecuencia a cuadros de hepatitis aguda fulminante, pero muy rara vez da lugar a persistencia e infección crónica. La segunda

desemboca, casi invariablemente, en una infección crónica mixta que suele evolucionar con rapidez hacia formas graves de enfermedad hepática. En nuestro medio, la infección por VHD se restringe, casi exclusivamente, a pacientes usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP).

2.4 HEPATITIS C

El VHC es un agente de transmisión parenteral cuya primoinfección es habitualmente asintomática y acaba en persistencia vírica e infección crónica en más de un 75% de los casos. Esta infección crónica es, también, asintomática durante muchos años y suele cursar con una hipertransaminasemia discreta y fluctuante. En pacientes inmunológicamente normales, la evolución de las lesiones hepáticas es lenta y progresiva, alcanzándose el estadio de cirrosis hepática después de más de dos décadas de la infección. En algunos de los pacientes con cirrosis, la dinámica de la infección puede inducir la aparición de carcinoma hepatocelular. Por el contrario, la transmisión vertical del virus es infrecuente (<5%) y no origina enfermedad a corto plazo, aunque sí infección crónica. En nuestro medio, esta infección afecta a un 2-4% de la población general adulta y es, actualmente, la principal causa de trasplante hepático.

2.5 HEPATITIS E

Aún cuando la hepatitis E ha merecido en nuestro medio la consideración de enfermedad importada, el reciente hallazgo de infecciones naturales por el virus de la hepatitis E (VHE) en animales de granja en Europa abre la posibilidad de que pueda tratarse, en realidad, de una zoonosis presente en nuestro país que podría afectar a personas en contacto habitual con cierto tipo de ganado, especialmente el porcino. En España también se han descrito casos de infección en humanos producidos por virus estrechamente relacionados con virus porcinos, por lo que este virus debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de las hepatitis agudas cuando exista este antecedente epidemiológico. Además, esta infección debe considerarse ante cualquier viajero procedente de una región endémica (especialmente, el subcontinente Indio, Méjico y Centroamérica) que desarrolle un cuadro de hepatitis aguda no-A, no-B, no-C en el lugar de origen o dentro de las dos semanas posteriores a su regreso.

2.6 HEPATITIS G

Tras varios años de investigación intensa y multitud de publicaciones sobre el tema, no puede afirmarse con suficiente base que el agente GBV-C, llamado en ocasiones "virus de la hepatitis G" (VHG), produzca algún tipo de enfermedad hepática ni ninguna otra patología en los seres humanos. En consecuencia, la denominación del agente como VHG carece de validez y no debe utilizarse. A tenor de los datos actuales, el estudio de marcadores de infección por el GBV-C en el contexto de cualquier tipo de enfermedad hepática humana no se justifica y

los resultados que puedan obtenerse mediante esas pruebas carecen de significado clínico.

2.7 VIRUS TT

Al igual que ha sucedido con el GBV-C, la infección por el circovirus humano, conocido como virus TT (VTT), no ha podido asociarse significativamente con enfermedad hepática ni con otra patología humana. Además, los datos epidemiológicos indican que se trata de un agente de transmisión fecal-oral predominante, cuya infección tiende a suceder durante la infancia sin producir enfermedad. En consecuencia, su denominación como "virus transmitido por transfusión", además de no corresponderse con el significado original de las siglas TT (que no son sino las iniciales del nombre de un paciente), tampoco se corresponde con su vía principal de transmisión, por lo que dicha denominación no es válida a ningún efecto y no debe utilizarse. Como en el caso del GBV-C, los resultados que puedan obtenerse en las pruebas de detección de marcadores de infección por VTT carecen de significado clínico y no deben utilizarse en ningún caso con fines diagnósticos.

3. RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA. MANEJO EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

La recogida de la muestra es un punto crítico de cualquier diagnóstico microbiológico que no suele ser problemático en el diagnóstico serológico o de técnicas de diagnóstico molecular, para el cual se requiere una muestra de suero o plasma. No obstante, es importante que el transporte se realice lo antes posible al laboratorio para su procesamiento inicial (centrifugado y realización de alícuotas). Los fallos en la identificación de las muestras son una importante fuente de error y pueden generar problemas médico-legales. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, la contaminación cruzada entre muestras, debida principalmente a fallos en la preparación de alícuotas, debe prevenirse adecuadamente. Toda la fase preanalítica debe estar normalizada y supervisada por el laboratorio y reflejada en los protocolos normalizados de trabajo, que se incluyen en la segunda parte de este procedimiento.

La conservación de las muestras también es importante que se realice adecuadamente, mediante refrigeración o congelación, dependiendo del tipo de ensayo y la periodicidad con que se realice. Por último, es importante conservar una seroteca (de todos los sueros o de algunos seleccionados dependiendo de las posibilidades de cada centro), que va a ser reflejo de la situación clínica en ese determinado momento de la vida del paciente, irreplicable y cuyo valor, en principio, desconocemos, pero como mínimo servirá para confirmar posibles resultados atípicos o dudosos.

4. SELECCIÓN DE ENSAYOS SEROLÓGICOS

Se deben seleccionar en función de las características clínicas del paciente, descritas

anteriormente, y, en general, se deben aplicar de un modo secuencial, basándose en algoritmos diagnósticos. Inicialmente, realizaremos un estudio descriptivo de los marcadores aplicables a cada virus.

4.1 HEPATITIS A

Los dos marcadores serológicos habitualmente utilizados son:

4.1.1 VHA-IgM. Se utiliza para el diagnóstico de infección aguda, pues siempre es positivo en el inicio de la sintomatología clínica, manteniéndose hasta los 3-6 meses. El antígeno vírico se detecta solamente en el hígado y no se utiliza con fines diagnósticos.

4.1.2 VHA-IgG. Su presencia demuestra contacto previo con el virus y se determina para estudios de prevacunación y seroprevalencia. Se mantiene positivo durante períodos de tiempo muy largos.

4.1.3 Detección del VHA. La detección de virus en heces o en sangre mediante técnicas de microscopía electrónica o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no se realiza rutinariamente y sólo se emplea en estudios de investigación.

4.2 HEPATITIS B

4.2.1 HBsAg (antígeno de superficie). Fue llamado inicialmente antígeno Australia, pues fue el primer marcador descrito por Bloomberg en un aborigen australiano. Se sintetiza en el citoplasma del hepatocito independientemente de los viriones completos y se excreta fuera de la célula en forma de agregados esféricos o filamentosos que se pueden detectar libres en el suero. Aparece muy pronto después de la infección y se detecta en todas las fases de la misma, incluyendo el periodo de incubación. Si la evolución es favorable, desaparecerá paulatinamente. Por el contrario, su persistencia al cabo de 6-8 semanas o la ausencia de una disminución significativa en su título tras el primer mes de la enfermedad son indicadores de mal pronóstico y de evolución a la cronicidad. La positividad de este marcador más allá del sexto mes de la infección define la situación de infección vírica persistente. Con frecuencia, esta persistencia del virus origina una infección crónica y, eventualmente, una enfermedad hepática crónica. Los pacientes en los que se detecta HBsAg en suero que no presentan nunca marcadores de replicación vírica ni signos de lesión hepática se conocen como "portadores sanos" del VHB y constituyen un porcentaje significativo del total de portadores de HBsAg.

4.2.2 Confirmatorio HbsAg. Se realiza mediante procedimientos de neutralización o "bloqueo" con una preparación estandarizada de anticuerpos anti-HBs previa a la realización de la prueba de detección de HBsAg. La detección se realiza en paralelo dentro del mismo ensayo, con la muestra neutralizada y sin neutralizar, comparándose entre sí las lecturas finales. La presencia de HBsAg se considera confirmada cuando se observa una reducción de la lectura en la muestra neutralizada igual o superior a un 50%. La prueba de confirmación debe realizarse siempre ante cualquier resultado positivo para

HBsAg que se observe en una muestra negativa para anti-HBc total y anti-HBc IgM, o en cualquier muestra con bajo nivel de reactividad. Cuando es positiva, debe seguirse de pruebas de detección de HBeAg y ADN VHB. Si es negativa, refleja reacciones inespecíficas que pueden responder a la presencia de anticuerpos frente a inmunoglobulinas de ratón en la muestra, ya que los métodos actuales de detección de HBsAg suelen utilizar anticuerpos monoclonales de ratón en las fases de captura y de reconocimiento.

4.2.3 Anti-HBs (anticuerpo frente al antígeno de superficie). Es el indicador de recuperación de la enfermedad, último marcador en aparecer, haciéndolo generalmente a los tres meses de evolución de la enfermedad aguda. Persiste durante muchos años y es capaz de neutralizar el virus y de conferir protección frente a la reinfección. En los individuos vacunados con respuesta inmunológica es el único marcador presente.

4.2.4 Anti-HBc (anticuerpo frente al antígeno del core). Se suele detectar mediante dos tipos de ensayos, uno total (IgG/IgM) y otro específico para IgM, que es el primer anticuerpo que aparece tras la infección, siendo ya detectable con los primeros síntomas de la enfermedad aguda. Acompaña siempre al anti-HBs tras la recuperación, así como al HBsAg durante la persistencia y su hallazgo en solitario puede reflejar, igualmente, una infección pasada y resuelta, dada la larga persistencia de estos anticuerpos en el suero. Sin embargo, dicho hallazgo no asegura la protección frente a la reinfección, ya que el anti-HBc no posee capacidad neutralizante.

La positividad del anti-HBc IgM es un indicador de infección aguda reciente, pero no sólo se detecta durante la fase aguda, sino que también puede detectarse, ocasionalmente, en los casos de enfermedad crónica con replicación activa del virus y lesión hepática, aunque su concentración suele ser menor. En esos casos, las concentraciones parecen fluctuar en relación con el grado de la lesión hepática. Algunas pruebas comerciales tienen recortada deliberadamente la sensibilidad para que únicamente originen reacciones positivas en los casos de infección aguda. La persistencia del anti-HBc IgM es variable, pudiéndose prolongar hasta 12-18 meses, con títulos decrecientes, en los casos de enfermedad aguda autolimitada.

4.2.5 Sistema "e": HBeAg-anti-Hbe. El HBeAg se excreta en forma libre por los hepatocitos infectados y se detecta en el suero de la mayoría de los enfermos que se encuentran en la fase aguda, así como en algunas formas de enfermedad crónica en las que, histológicamente, suele corresponderse con patrones de hepatitis crónica activa. El valor diagnóstico de la detección de este antígeno se basa en su excelente correlación con la presencia de replicación del virus y viremia. La sangre de los enfermos positivos para HBeAg debe considerarse siempre como de alto nivel de infectividad. Su estudio es obligado en todos los portadores de HBsAg, presentando la mayoría de los pacientes

positivos para HBeAg viremias entre 10^5 y 10^8 equivalentes de genoma por mililitro de suero.

La desaparición del HBeAg en la evolución de una hepatitis aguda o crónica suele indicar un buen pronóstico y con frecuencia el inicio de una fase de erradicación del virus que conduce a la resolución total de la infección. En no pocas ocasiones, la ausencia de HBeAg en el suero de un portador crónico de HBsAg coexiste con una replicación viral persistente, lo que supone un peor pronóstico de la enfermedad (variantes pre-core defectuosas). La detección del ADN-VHB es imprescindible para caracterizar estos casos.

La aparición de anti-HBe en el curso de una infección aguda indica, generalmente, buena evolución y una baja infectividad del paciente. En la mayoría de los casos se detecta poco antes de que desaparezca el HBsAg, pudiendo mantenerse positivo durante varios años después de la infección. En los casos de hepatitis crónica en los que coexiste con HBsAg suele indicar escasa actividad replicativa de la enfermedad vírica, coincidiendo casi siempre con diagnósticos histológicos de hígado "normal" (portador asintomático) o de hallazgos histológicos hepáticos compatibles con hepatitis crónica con bajos índices de lesión hepática (índice de Scheuer o Metavir, antes índice de Knodell). En las infecciones crónicas por variantes pre-core defectuosas (ver más arriba), la seroconversión para anti-HBe no supone una mejoría ni clínica ni histológica y se asocia con mucha frecuencia a cuadros histológicos de hepatitis crónica activa y/o cirrosis.

4.2.6 ADN VHB. La detección de ADN vírico en el suero constituye el marcador de elección para detectar la viremia y refleja la replicación del virus en los hepatocitos. El ADN VHB es positivo en un elevado número de pacientes HBeAg positivos y su positividad se suele correlacionar muy directamente con el HBcAg intrahepático, con la ventaja de que su determinación no precisa biopsia. En la actualidad, existen métodos comerciales muy sensibles, rápidos y sencillos que permiten detectar y cuantificar la viremia mediante este marcador. La hibridación molecular y la PCR son las técnicas más utilizadas, y en un futuro cercano lo será la PCR en tiempo real.

4.2.7 Genotipificación y detección de mutantes resistentes al tratamiento antivírico. El creciente uso de compuestos antivíricos para el tratamiento de la hepatitis B crónica ha llevado al desarrollo de pruebas capaces de determinar el genotipo de virus involucrado en la infección y de detectar la aparición de mutantes potencialmente resistentes al tratamiento (variantes pre-core defectuosas y mutantes resistentes a antivíricos). Estas pruebas se realizan mediante amplificación genómica por PCR seguida de hibridación reversa en tira de nitrocelulosa (Line Probe Assay, LiPA) o por técnicas de secuenciación a partir del producto obtenido en una amplificación previa. Actualmente, existen pruebas comerciales de LiPA para la identificación de los genotipos A-G del VHB y para la detección de

variantes pre-core defectuosas, y pruebas de LiPA y de secuenciación para la detección de mutaciones asociadas a resistencia al tratamiento con lamivudina (motivo YMDD del ORF de la Polimerasa) y con famciclovir. La PCR en tiempo real también se puede aplicar con este fin y en breve estarán disponibles métodos comerciales.

4.3. HEPATITIS D Ó DELTA

4.3.1 Antígeno delta (VHDag). Aparece fugazmente en sangre en la primoinfección, por lo que su utilidad clínica es muy limitada. En la forma crónica, la antigenemia es intermitente.

4.3.2 Anti-VHD IgM. Después de la aparición del VHD Ag surge el anticuerpo IgM, que se mantiene positivo a bajos títulos durante un tiempo limitado en el caso de evolución favorable, persistiendo su positividad a títulos altos en los casos que evolucionan hacia la cronicidad.

4.3.3 Anti-VHD total. La aparición de los anticuerpos de clase IgG frente al VHD suele coincidir en el tiempo con los de clase IgM y se mantienen positivos durante largos períodos de tiempo, por lo que su detección indica solamente contacto previo con el virus. No obstante, la presencia de IgG anti-VHD en un paciente portador de HBsAg refleja, casi invariablemente, infección crónica por ambos virus, lo que elimina la necesidad de estudiar ningún otro marcador específico de infección por este virus. En general, se utilizan métodos que detectan anticuerpos totales (IgG e IgM) anti-VHD.

4.3.4 ARN VHD. La positividad por técnicas de hibridación o PCR indica presencia del virus.

4.4 HEPATITIS C

4.4.1 Anti -VHC. En 1989 surgieron los primeros ensayos capaces de detectar anticuerpos frente al VHC. Desde entonces han evolucionado a lo largo de tres generaciones, mejorando progresivamente su sensibilidad y especificidad. Actualmente, suelen utilizar antígenos sintéticos o recombinantes, dado que el virus no ha podido ser aún cultivado a altos títulos. Su aparición se retrasa entre 4 y 6 semanas, aunque puede retrasarse más en casos puntuales. Durante ese período de "ventana serológica", la detección de anti-VHC será negativa, por lo que la negatividad de esta prueba en una muestra única no descarta la infección. La presencia de anti-VHC en suero indica contacto previo con el virus, pero no es, en sí misma, suficiente para establecer el diagnóstico de infección crónica. Además, en pacientes con inmunodeficiencias en la respuesta humoral y en pacientes en hemodiálisis, la negatividad para anti-VHC no excluye totalmente la infección.

4.4.2 Anti -VHC: pruebas confirmatorias. Se han de considerar como pruebas confirmatorias de la presencia de anticuerpos y no necesariamente de infección activa. Se realizan mediante sistemas de inmunoblot que emplean diferentes antígenos adsorbidos sobre tiras de nitrocelulosa pudiendo variar su interpretación dependiendo de la prueba y de los antígenos empleados. Con carácter general, la presencia de reactividad frente a dos ó más

antígenos derivados de regiones diferentes del genoma vírico confirma la presencia de anticuerpos frente al virus, en tanto que la ausencia total de reactividad en la prueba la descarta. La reactividad frente a antígenos derivados de una única región del genoma del virus no permite confirmar ni descartar la presencia de anticuerpos (resultados indeterminados). La reactividad detectada frente a los distintos antígenos no presenta un valor pronóstico. Durante el período de ventana serológica, se pueden observar algunos de estos patrones indeterminados en presencia de viremia detectable (ver más adelante), lo que indica el inicio de la respuesta inmune humoral.

En la actualidad no se recomienda su uso rutinario por ser ensayos de alto coste que no aportan información de utilidad clínica cuando se comparan con la detección directa de virus. No obstante, sólo estas pruebas pueden establecer la presencia o la ausencia de anticuerpos frente al VHC en las muestras que son reactivas en los ensayos de cribado y negativas en los de detección directa del virus, por lo que deben utilizarse siempre que sea necesario comunicar a esos pacientes la presencia de anti-VHC en su suero, como es el caso de donantes de sangre y órganos.

4.4.3 Anti-VHC: avidez de IgG. Como el resto de los ensayos de avidez, se basa en el principio general de la maduración progresiva de la respuesta inmune humoral tras la primoinfección y se realiza mediante el uso controlado de agentes disociantes (generalmente urea 6M) en las pruebas convencionales de enzoinmunoanálisis (EIA) para detección de anticuerpos. En pacientes con presencia de anti-VHC confirmada mediante inmunoblot, así como en los que presenten resultados indeterminados en estos ensayos confirmatorios y en las pruebas de detección de viremia positivas (ver a continuación), la detección de IgG anti-VHC de baja avidez indica infección primaria aguda reciente, en general no más allá de 6 meses antes de la toma de la muestra. No existe aún ninguna prueba comercial estandarizada al efecto, por lo que no suele aplicarse de rutina, aunque se ha descrito un protocolo, basado en un ensayo comercial, ya estandarizado y validado.

4.4.4 ARN-VHC. La detección del ARN del virus se realiza mediante pruebas de amplificación genómica (RT-PCR u otras). Su positividad indica presencia de virus circulante y confirma infección en curso, aguda o crónica. Su negatividad en una muestra puntual no descarta la infección crónica, ya que la viremia es, en ocasiones, intermitente. Se han desarrollado algunos sistemas que permiten realizar una cuantificación aproximada de la viremia (carga vírica) y existe un estándar internacional de ARN VHC, cuantificado en Unidades Internacionales (UI), que actualmente ha unificado los criterios de expresión de resultados entre los diferentes sistemas. Durante el período ventana, estas u otras pruebas de detección directa de virus proporcionan el diagnóstico de la infección cuando las pruebas de detección de anticuerpos son aún negativas o arrojan resultados indeterminados.

Estas técnicas acortan este periodo en varias semanas ya que el ARN VHC se detecta transcurridas 1 a 2 semanas desde la exposición al virus. Por lo tanto la utilización de estos métodos se considera hoy en día indispensable para el diagnóstico precoz de la hepatitis C aguda.

El futuro inmediato es la aplicación de las técnicas de PCR en tiempo real, que además de generar resultados más rápidos permiten cuantificar la carga vírica y la detección de mutaciones. La cuantificación por este sistema en una muestra presenta un rango de detección superior al de otras tecnologías, y existen sistemas automatizados para la amplificación y detección simultánea (TaqMan y Light Cyclers de Roche, ABI Prism 7700 de Applied Biosystems). El punto crítico sigue siendo la adecuada extracción de los ácidos nucleicos, para lo cual también existen ya sistemas automatizados en los cuales se minimiza el riesgo de la contaminación entre muestras (Magna Pure LC system, Ampliprep).

4.4.5 HCcAg (Antígeno del core del VHC). Es un EIA de captura por anticuerpos monoclonales, semejante a los desarrollados para la detección del HBsAg, que permite detectar y cuantificar la viremia a través de la detección y cuantificación de la proteína del nucleóide del virión, una vez lograda su liberación de las partículas y en condiciones que previenen su acomplejamiento por los anticuerpos específicos que pueda contener la muestra. La interpretación de su positividad o negatividad es idéntica a la de las pruebas de detección de ARN VHC y la expresión cuantitativa de resultados se realiza, en este caso, en pg/ml. Se estima que su sensibilidad clínica se acerca a las de las pruebas de detección de ARN vírico, con correlaciones superiores al 90% en la gran mayoría de los estudios, con la ventaja de presentar menor riesgo de contaminación cruzada que la mayoría de las pruebas de detección de ARN VHC y la posibilidad de ofrecer una cuantificación más precisa y más reproducible de la viremia. Por el contrario, no puede ofrecer información acerca del genotipo de virus involucrado en la infección.

4.4.6 Genotipificación. La generalización de los tratamientos antivirales en la hepatitis C crónica y la demostrada influencia del genotipo del virus en la respuesta al tratamiento han introducido el uso rutinario de pruebas de genotipificación de VHC en la práctica clínica. Al igual que para el VHB, estas pruebas se basan en la amplificación del genoma vírico mediante PCR seguida de hibridación reversa en tira (LiPA) o de secuenciación del amplicón. Mediante estas pruebas también se puede llegar a la discriminación del genosubtipo. En un futuro próximo también se aplicará la tecnología de PCR en tiempo real.

4.4.7 Serotipificación. La ausencia persistente de viremia detectable en un paciente con positividad confirmada para anti-VHC impide determinar el genotipo vírico que causó la infección, pudiéndose aplicar en estos casos las técnicas de EIA competitivo que utilizan como antígenos ciertas colecciones de péptidos sintéticos específicos para

serotificación. Otra aplicación práctica posible de estos métodos es la confirmación de infecciones mixtas en muestras que originan patrones múltiples en las pruebas de genotipificación aunque la validez de estos métodos ha sido cuestionada. De igual manera, la prueba sería también útil para los laboratorios que opten por la detección de HCcAg como prueba de detección directa de virus y no dispongan de la posibilidad de realizar pruebas de amplificación genómica.

Sin embargo, la única prueba de serotificación de anti-HCV comercializada hasta la fecha utiliza péptidos correspondientes a la proteína NS4, por lo que sólo ofrece resultados interpretables cuando la muestra contiene una concentración suficiente de anticuerpos frente a dicho antígeno, lo que no siempre sucede. La serotificación de anti-VHC no permite, actualmente, discriminar el genosubtipo involucrado en la infección.

4.5 HEPATITIS E

Existen pruebas comerciales de EIA para detección de anticuerpos IgG e IgM frente al VHE, si bien parecen presentar una alta frecuencia de reacciones inespecíficas que originan resultados débilmente positivos en ausencia de anticuerpos específicos, principalmente en zonas no endémicas en las cuales se ha demostrado que estos anticuerpos no son protectores. Con los conocimientos epidemiológicos actuales, puede considerarse que cualquier paciente con hepatitis aguda no-A no-B no-C (NANBNC) que presente una reactividad alta para IgG ó IgM en una de estas pruebas sufre, con mucha probabilidad, una hepatitis E aguda, especialmente si existe antecedente reciente de viaje a una región endémica o de contacto con animales de granja (cerdos). En ausencia de sistemas que permitan confirmar las reactividades obtenidas para anti-VHE, la confirmación del diagnóstico sólo puede realizarse mediante la detección directa del virus en suero o en heces por técnicas de amplificación genómica. En la actualidad, no existe ningún procedimiento disponible comercialmente destinado a ese efecto.

5. CRITERIOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Es importante recordar que, aunque la sensibilidad y especificidad absolutas son parámetros que debemos considerar en cualquier técnica, los valores predictivos positivo y negativo, que variarán en función de la población estudiada, son los más importantes en la práctica clínica. Esto quiere decir que se ha de aplicar siempre el ensayo adecuado a la población que lo requiera (por ejemplo, virus delta a pacientes con HBsAg positivo). De ahí que este punto se exponga unido a los marcadores recomendados en cada situación.

Es también importante mencionar que el laboratorio de inmunomicrobiología no debe ser un mero emisor de datos validados, sino que ha de emitir un informe que interprete el conjunto de los resultados obtenidos en el estudio de cada muestra.

Por todo ello, se han de escoger los marcadores adecuados en función del cuadro clínico del paciente y, en ocasiones, aplicar algoritmos diagnósticos, aplicando los ensayos de un modo secuencial.

5.1 DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS AGUDA

5.1.1 Marcadores de rutina:

VHA: IgM anti-VHA

VHB: HBsAg y anti-HBc IgM

VHC: anti-VHC y ARN VHC o HCcAg

VHD: anti-VHD IgM (en pacientes UDVP)

5.1.2 Criterios generales de interpretación:

La presencia de IgM anti-VHA asociada a hepatitis aguda es diagnóstica de infección aguda por VHA.

La presencia de HBsAg y anti-HBc IgM asociada a hepatitis aguda es diagnóstica de infección aguda por VHB. Dado que anti-HBc IgM puede estar presente a bajo nivel en pacientes crónicamente infectados por el VHB, el criterio puede conducir a error cuando se trata de pacientes en alto riesgo de infección por agentes de transmisión parenteral. En ese caso, el diagnóstico de la enfermedad aguda o crónica dependerá del tiempo de evolución de la enfermedad.

La presencia simultánea de anti-VHD IgM y anti-HBc IgM asociada a hepatitis aguda se considera diagnóstica de coinfección aguda por VHB y VHD. La presencia de anti-VHD IgM y HBsAg en ausencia de anti-HBc IgM debe tomarse como indicativa de sobreinfección por VHD en un portador crónico de VHB. Excepcionalmente, puede ocurrir que dicha sobreinfección haga disminuir transitoriamente la concentración de HBsAg en suero a niveles no detectables, originando un patrón de reactividad aislada para anti-VHD IgM. En estos casos, se recomienda determinar VHDAg en suero y anti-HBc total, así como realizar seguimiento para HBsAg y anti-VHD total. En cualquier caso y dada la situación epidemiológica en nuestro país, no parece recomendable la búsqueda rutinaria de la infección por VHD, salvo en pacientes UDVP.

La seroconversión para anti-VHC constituye el criterio más fiable para establecer un diagnóstico de infección aguda reciente por VHC. Dicha seroconversión suele retrasarse unas 6-8 semanas respecto del comienzo de los síntomas, por lo que se requiere el estudio de muestras de seguimiento, al menos hasta el tercer mes. La detección de ARN VHC o HCcAg adelanta sensiblemente el diagnóstico, por lo que debe realizarse siempre que los antecedentes hagan sospechar una hepatitis C aguda. Con todo, el diagnóstico de seguridad se alcanzará durante el seguimiento, una vez se haya puesto de manifiesto la seroconversión. Cuando el paciente sea ya positivo para anti-VHC al inicio del estudio, el hallazgo de anti-VHC IgG de baja avidéz permite establecer el diagnóstico de infección aguda reciente por VHC, siendo esta prueba la única que puede orientar el caso en ese momento. Si en esa muestra se realizase, no obstante, una prueba de confirmación de anti-VHC y esta rindiese un patrón indeterminado, la seroconversión frente a otros

antígenos durante el seguimiento confirmaría el diagnóstico. En pacientes con inmunodeficiencias de tipo humoral y en algunos pacientes en hemodiálisis, la seroconversión puede retrasarse por más tiempo o, incluso, no llegar a producirse nunca, presentando patrones indeterminados en las pruebas de confirmación. Todo ello dificulta especialmente el diagnóstico de la hepatitis C aguda en este tipo de pacientes, en los que es imprescindible la realización de pruebas de detección directa del virus.

5.1.3 Criterios de interpretación en pacientes UDVP.

Las tasas de seropositividad para VHB (anti-HBc total) y VHC (anti-VHC) en individuos UDVP no seleccionados superan, en nuestro país, el 80%. Entre los individuos UDVP crónicamente infectados por VHB (positivos para HBsAg), la seropositividad para VHD (anti-VHD total) se aproxima, asimismo, a dicho porcentaje. Así, es frecuente que estos pacientes se hallen crónicamente infectados por uno o más de dichos agentes en el momento de sufrir un episodio de hepatitis aguda, resultando imposible en la práctica precisar su etiología. En la mayoría de los casos, sólo un conocimiento preciso del estado inmunitario del paciente para estos agentes previo a la presentación del episodio de hepatitis aguda puede permitir una interpretación de la serología ajustada a la realidad, de acuerdo a los criterios generales de interpretación antes expuestos. Por lo demás, no parece que la coinfección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) modifique, en general y significativamente, la dinámica de aparición de marcadores de infección por virus causantes de hepatitis, por lo que no se suelen encontrar dificultades especiales por esta causa.

5.1.4 Marcadores adicionales en la hepatitis aguda no-A, no-B, no-C.

Una vez descartados los agentes anteriormente expuestos, se recomienda investigar la posibilidad de que el episodio de hepatitis aguda responda a infección primaria por citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB) o *Coxiella burnetii*, determinando los siguientes marcadores en suero: anti-CMV IgM (diagnóstico de primoinfección por CMV); IgM frente al antígeno de la cápside del VEB (anti-VCA IgM, diagnóstico de primoinfección por VEB); IgM frente al antígeno fase II de *Coxiella burnetii* o titulación de anticuerpos frente a dicho antígeno por fijación del complemento (títulos 1:128 indican infección aguda). El perfil bioquímico hepático de la hepatitis aguda por estos agentes también suele ser diferente al de los virus de la hepatitis.

En pacientes con antecedentes recientes de viaje a una región de alta endemia para el VHE, se deberá estudiar la presencia de anti-VHE IgM o IgG en dos muestras de suero tomadas en el momento del ingreso y dos semanas después, buscando presencia de IgM específica y, especialmente, de seroconversión para anti-VHE IgG. En función de los datos que puedan ir generándose en el futuro respecto de la presencia del VHE en animales de granja en España, la investigación de estos marcadores habrá o no de ampliarse a otros casos seleccionados de hepatitis aguda no-A, no-B, no-C. En la tabla 1 se presenta un esquema para el diagnóstico etiológico de la hepatitis aguda.

5.2 Hepatitis crónica.

En la tabla 2 se presenta un esquema para el diagnóstico etiológico de la hepatitis crónica.

Tabla 1. Diagnóstico etiológico de la hepatitis aguda

Anti-VHA IgM	Anti-VHE IgG*	HBsAg	Anti-HBc IgM	Anti-VHD IgM**	Anti-VHC	ARN VHCó HCcAg	Avidéz IgG anti-VHC***	Hepatitis aguda por
+	-	-/+	-	-				VHA
	+	-/+	-	-				VHE
-	-	+	+	-	-/+	-/+	Alta	VHB
		+	+	+				VHB+VHD
		+	-	+				VHD
		+	-	-				(1)
		-/+	-	-	-	+		VHC(2)
		-/+	-	-	+	+	Baja	VHC
		-/+	-	-	-/+	-	Alta	No ABCDE

* Sólo se debe estudiar en casos con antecedente epidemiológico que lo justifique.

** Sólo se debe estudiar en pacientes UDVP positivos para HBsAg.

*** Sólo puede estudiarse en casos positivos para anti-VHC.

(1): Se confirmará o descartará la infección aguda por VHB mediante detección de HBeAg y/o ADN VHB y comprobando seroconversión para anti-VHD IgM y/o total en el seguimiento.

(2): Como criterio general, se confirmará infección aguda por VHC comprobando seroconversión para anti-VHC en el seguimiento. Dada la elevada viremia que es característica del periodo de ventana de la infección aguda por VHC, los métodos de detección de ARN VHC y HCcAg pueden utilizarse recíprocamente para confirmar el resultado en la muestra inicial.

Tabla 2. Diagnóstico etiológico de la hepatitis crónica y de la hipertransaminasemia persistente

HBsAg	Anti-HBc	Anti-VHD total*	Anti-VHC	Hepatitis crónica por
+	+	-	-	VHB
		+	-	VHB+VHD
		+	+	VHB+VHD+VHC
		-	+	VHB+VHC
-	-	-/+	-	(1)
			+	VHC (1)
	+	-/+	-	(2)
			+	VHC (2)
-	-		+	VHC
			-	Hepatitis No ABCDE

* Estudiar sólo en pacientes UDVP positivos para HBsAg.

(1): Estudiar HBeAg y ADN VHB. Si ambos son positivos, indica infección crónica por VHB en presencia de inmunotolerancia extrema a la infección. Si son negativos, proceder según esquema de confirmación, estudio e interpretación de casos con HBsAg aislado.

(2): Estudiar anti-HBs. Si positivo, indica infección pasada y resuelta, descartando la infección crónica por VHB. Si es negativo, proceder según esquema de estudio e interpretación de casos con anti-HBc aislado.

5.2.1 Marcadores de rutina

VHB: HBsAg y anti-HBc total.

VHD: anti-VHD total (en pacientes UDVP positivos para HBsAg o pacientes con una evolución de la infección crónica por VHB peor de lo esperable).

VHC: anti-VHC y ARN-VHC o HCcAg.

5.2.2 Criterios de interpretación:

La presencia de HBsAg y anti-HBc total asociada a hepatitis crónica es diagnóstica de hepatitis B crónica, y se completará el estudio con el sistema "e": HBeAg-anti HBe. La presencia adicional de anti-VHD total indica infección crónica doble por VHB y VHD (en la tabla 3 se presenta un esquema para la cualificación de la hepatitis B crónica).

La presencia de anti-VHC asociada a hepatitis crónica es altamente indicativa de hepatitis C crónica, aunque no permite establecer, en términos estrictos, un diagnóstico seguro. La detección de ARN VHC o HCcAg ayuda a establecer el diagnóstico y confirma infección en curso, aunque un resultado negativo aislado no lo descarta, ya que la viremia es intermitente en ocasiones. Dado el alto coste de los métodos de confirmación de anti-VHC y vistos los altos porcentajes de confirmación que se obtienen en los pacientes con hepatitis crónica que resultan reactivos para anti-VHC en las pruebas de cribado, se considera que es suficiente una confirmación mediante un segundo método de cribado que utilice antígenos obtenidos por una tecnología diferente para establecer la presencia de anti-VHC en pacientes con hepatitis crónica demostrada, e incluso no sería necesario realizar la confirmación en grupos con alta prevalencia de infección por el VHC. Si el estudio de anti-VHC se realiza en un paciente en el que sólo se ha documentado una alteración puntual de la analítica hepática, sin evidencia de hipertransaminasemia persistente ni prácticas de riesgo, se deberá acudir al uso de métodos de confirmación, principalmente de detección del virus, antes de informar un resultado positivo para anti-VHC (en la tabla 4 se presenta un

esquema para la cualificación de la hepatitis C crónica).

5.3 MARCADORES SEROLÓGICOS DE RESPUESTA A TRATAMIENTOS

5.3.1 Muestra basal:

VHB: HBeAg, anti-HBe, ADN VHB (prueba cuantitativa).

VHD: ADN VHD y anti-VHD total

VHC: ARN VHC cualitativo o cuantitativo o HCcAg y genotipificación de la cepa.

En el caso del VHC, la conveniencia o necesidad de realizar pruebas cuantitativas en la muestra basal ha sido una cuestión controvertida, no sólo por el elevado coste de las pruebas de cuantificación de ARN, sino también por su limitada precisión y reproducibilidad. Si se utiliza alguna de estas últimas, se recomienda que los resultados se expresen como un mero orden de magnitud, sin precisar la cifra concreta obtenida. En el caso de realizar detección de HCcAg, aún no es posible precisar ninguna recomendación bien fundamentada al respecto. No obstante, algunos estudios sugieren que la discriminación entre alta y baja carga vírica con vistas al diseño de la pauta terapéutica se correspondería con concentraciones de HCcAg mayores o menores que 25 pg/ml, por lo que, quizá, podría considerarse expresar los resultados respecto de dicho valor de corte. Los nuevos métodos de PCR en tiempo real mejorarán sustancialmente el problema, aunque en la actualidad se acepta mayoritariamente la realización de pruebas cualitativas de detección de ARN VHC ó HCcAg, acompañadas de la genotipificación de la cepa como una actitud adecuada con vistas a la instauración de la terapia y a su seguimiento posterior.

5.3.2 Marcadores de respuesta al tratamiento

VHB: Aclaramiento de HBeAg y HBsAg, seroconversión para anti-HBe y anti-HBs, cuantificación de ADN VHB (en función de los resultados iniciales) y detección de resistencias en ausencia de respuesta al tratamiento.

Tabla 3. Cualificación de la hepatitis B crónica [más de 6 meses con HBsAg (+) y anti-HBc (+)]

PERFIL DE CUALIFICACIÓN VHB	HBeAg	Anti-HBe	ADN VHB	INTERPRETACIÓN
	+	-	+	Replicación viral
	+	-	-	Ausencia de replicación viral Posible seroconversión a anti-HBe en poco tiempo
	-	+	+	Replicación viral Infección por variante pre-core defectiva Probabilidad alta de resistencia al tratamiento con interferón
-	+/-	-	Portador asintomático	
PERFIL DE CUALIFICACIÓN VHD**	Anti-VHD total			INTERPRETACIÓN
	+			Infección crónica por VHD
	-			Ausencia de infección por VHD

* En algunos pacientes, el nivel bajo de viremia sólo permite detectar el ADN VHB mediante técnicas de amplificación (concentraciones de ADN VHB inferiores a 1 pg/ml).

** Sólo recomendado en pacientes UDVP.

Tabla 4. Cualificación de la hepatitis crónica con anti-VHC (+)

Confirmación de anti-VHC*	ARN VHC ó HCcAg	Genotipificación	INTERPRETACIÓN
Positiva o indeterminada**	+	Genotipos 1 ó 4 (cualquier genosubtipo)	Hepatitis C crónica Probabilidad alta de resistencia al tratamiento
		Genotipos 5 ó 6	Hepatitis C crónica Probabilidad moderada de resistencia al tratamiento
		Genotipos 2 ó 3	Hepatitis C crónica Probabilidad baja de resistencia al tratamiento
Negativa	-		Seguimiento ***
Indeterminada	-		Hepatitis NANBNC
			Seguimiento ***

* En la actualidad no se considera necesario salvo circunstancias excepcionales

** Algunos pacientes muy concretos, en especial los pacientes con inmunodeficiencias humorales o los que están en hemodiálisis, pueden desarrollar respuestas parciales de anticuerpos que se traducen en patrones indeterminados (anti-NS3 ó anti-core) que persisten en el tiempo. En algunos casos, el anti-VHC puede revertir a negativo o serlo ya desde el inicio del estudio.

*** Si las pruebas de detección de viremia persisten negativas durante un seguimiento de un año, el caso quedaría etiquetado como hepatitis No-A No-B No-C (NANBNC).

VHD: Aclaramiento de VHD-RNA.

VHC: Aclaramiento total de la viremia (ARN VHC ó HCcAg) o disminución de la misma en 2 o más órdenes de magnitud logarítmica (ARN VHC), pero cabe distinguir actuaciones en función del genotipo infectante y la coinfección por el VIH.

5.3.2.1 Pacientes infectados por VHC genotipo 1

Si los pacientes no están infectados por el VIH, se debe determinar el ARN VHC basal y a las 12 semanas del tratamiento mediante la misma técnica. La respuesta virológica precoz se define por la caída en magnitud de la viremia al menos en 2 log₁₀ o por la ausencia de viremia a las 12 semanas y si no se consigue se debe suspender el tratamiento. Los pacientes con viremia negativa a las 12 semanas

deben completar 48 semanas de tratamiento. En caso de no negativizar la viremia pero sí presentar una caída en la magnitud de la viremia, al menos en 2 log₁₀, se debe determinar la viremia de nuevo a las 24 semanas y si fuera positiva suspender el tratamiento. En caso contrario deben completar 48 semanas de tratamiento.

En pacientes infectados por el VIH la “regla de las 12 semanas” no está lo suficientemente validada, por lo que se debe determinar la viremia a las 24 semanas y si es positiva se debe suspender el tratamiento. En caso contrario se debe completar 48 semanas de tratamiento.

5.3.2.2 Pacientes infectados por VHC genotipos 2 y 3. En pacientes no infectados por el VIH se suele

mantener el tratamiento durante 24 semanas y al ser esperable una buena respuesta no existe necesidad de determinar la viremia a las 12 semanas. Si los pacientes están infectados por el VIH es conveniente determinar la viremia a las 24 semanas, y si es positiva se debe suspender el tratamiento. En caso contrario se debe completar 48 semanas de tratamiento.

En caso de respuesta virológica sostenida, independientemente del genotipo implicado, se debe confirmar que tienen viremia negativa a las 24 semanas de haber suspendido el tratamiento. Posteriormente no es necesario determinar la viremia salvo que vuelvan a elevarse las transaminasas o exista una nueva exposición al VHC.

5.4 INTERPRETACIÓN DE PATRONES ATÍPICOS PARA MARCADORES DE INFECCIÓN POR VHB

5.4.1 Reactividad aislada para anti-HBc (ausencia de HBsAg y anti-HBs). Es un patrón frecuente al estudiar individuos con prácticas de riesgo (10-25%). Este patrón puede responder a reacciones inespecíficas ligadas a componentes séricos no identificados sensibles a agentes reductores o, más frecuentemente, a respuesta inmune incompleta frente a una infección previa por VHB. Excepcionalmente, puede ser reflejo de una infección crónica con muy baja o nula expresión de HBsAg, lo que podría ponerse de manifiesto o descartarse investigando la presencia del ADN VHB por técnicas de amplificación genómica cuando el caso lo justifique. La confirmación de especificidad se puede basar en el estudio de anti-HBe y valorando las características epidemiológicas y el riesgo a la infección por VHB del individuo estudiado. Aún así, la positividad aislada de anti-HBc no garantiza inmunidad a la reinfección, por lo que no se debe tomar como criterio de exclusión para la vacunación.

5.4.2 Reactividad confirmada para HBsAg en ausencia de anti-HBc total. Este patrón es poco frecuente, en ocasiones de débil reactividad y sólo detectable si se utilizan métodos de detección de HBsAg de sensibilidad inferior a 0,3 ng/ml (0,03 UPE/ml). Puede responder a los siguientes motivos:

- Momentos muy tempranos de la infección aguda por VHB. Suele acompañarse de HBeAg, anti-HBc IgM y ADN VHB y se sigue de seroconversión para anti-HBc total. Excepcionalmente, el anti-HBc IgM puede ser también negativo, apareciendo más tarde. Sólo en casos muy raros, el HBeAg y el ADN VHB serán también negativos.
- Inmunotolerancia extrema a una infección por una cepa salvaje de VHB, que determina la ausencia de respuesta inmune humoral. Se acompaña siempre de presencia de HBeAg y ADN VHB. Ocurre con cierta frecuencia en individuos infectados "intra útero", especialmente por cepas de los genotipos B y C, así como en pacientes con inmunodepresión extrema.
- Infección crónica por cepas del VHB defectuosas en la expresión del transactivador de transcripción (proteína X, HBxAg). La reactividad

es débil (puede no detectarse en ocasiones), persiste en el tiempo y se acompaña de niveles bajos de ADN VHB, detectables únicamente mediante PCR. Hasta la fecha, sólo se han descrito algunos casos asociados a un brote de hipertransaminasemia en un grupo de pacientes en hemodiálisis.

- Infección por una hipotética variante del VHB, conocida como VHB tipo 2 (VHB2), que no presentaría protección cruzada con las cepas salvajes del VHB. La reactividad es débil (sólo detectable, en general, por métodos de sensibilidad inferior a 0,4 ng/ml) y de carácter transitorio, desapareciendo habitualmente a las 2-3 semanas de seguimiento, sin originar seroconversión para anti-HBc total ni anti-HBs. El HBeAg es negativo y, excepcionalmente, puede detectarse ADN VHB a baja concentración. El fenómeno no es infrecuente y los pacientes suelen permanecer asintomáticos. Muchos de estos hallazgos proceden del cribado rutinario de donantes de sangre y de mujeres embarazadas sanas, acumulándose, a veces, en el espacio y en el tiempo a modo de brotes autolimitados.
- Contaminación de la muestra con pequeñas cantidades del suero de un portador, circunstancia que, salvo excepciones, no podrá nunca diferenciarse de la anterior sobre la base de datos objetivos. Si la muestra contaminante es virémica, el fenómeno puede acompañarse de detección de niveles bajos de HBeAg y/o ADN VHB.
- Vacunación frente al VHB dentro de las 3 semanas anteriores al momento de la toma de la muestra. El patrón de presencia y evolución de marcadores es idéntico al que se observa en los dos supuestos anteriores, aunque el antecedente de vacunación reciente es fácil de obtener e identifica los casos.

5.4.3 Reactividad aislada para anti-HBs en individuos no vacunados. Es un patrón poco frecuente (0,1-0,5%), que no se asocia a ninguna población definida. Responde en muchos casos a reacciones inespecíficas, mediadas por una IgM capaz de unirse al HBsAg. Alternativamente, podría responder a inmunización por VHB defectuoso (partículas HBsAg), a infección antigua con pérdida de anti-HBc o a respuesta inmune incompleta frente a la infección. Se ha documentado la existencia de infecciones agudas por VHB en individuos que presentaban este patrón serológico, por lo que no debe tomarse como base para predecir la inmunidad a la reinfección.

5.4.4 Coexistencia de HBsAg y anti-HBs. Es un patrón relativamente frecuente en pacientes con hepatitis crónica y en individuos asintomáticos de alto riesgo, en especial UDVP. La especificidad se confirma mediante los correspondientes ensayos de neutralización para ambos marcadores. En pacientes con hepatitis crónica, las reactividades son fuertes y persistentes, pueden responder a infecciones sucesivas por cepas de VHB de distinto subtipo,

mediadas por tolerancia inmunológica o debidas a infección por variantes defectuosas en la expresión del determinante común "a" del HBsAg. En algunos pacientes en tratamiento antiviral, puede producirse seroconversión para anti-HBs sin que se aclare totalmente el HBsAg. En pacientes sin signos de enfermedad hepática, la reactividad para HBsAg suele ser débil y transitoria y podría corresponder al fenómeno "VHB2" en pacientes previamente positivos para anti-HBs. Por último, en pacientes inmunodeprimidos con marcadores de inmunidad puede observarse la reaparición del HBsAg con o sin aclaramiento del anti-HBs, lo que se considera como una reactivación de la infección. Esta interpretación supone, sin embargo, asumir la existencia de un fenómeno de latencia que, en el VHB, no ha sido aún bien caracterizado, aunque estos casos sugieran que exista.

6. PROCEDIMIENTOS A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

6.1 TRANSMISIÓN VERTICAL

6.1.1 Hepatitis B. La transmisión vertical del VHB de madre portadora de HBsAg a su hijo recién nacido tiene lugar en más del 80% de los casos cuando la madre es HBeAg positiva, y en el 20% cuando la madre es anti-HBe positiva. Los hijos que adquieran la infección de un modo perinatal presentan un alto riesgo de desarrollar una infección crónica (>85%). La infección intrauterina es rara (<5%), si bien parece más frecuente cuando la madre está infectada por cepas de los genotipos B y C, como es usual en el Extremo Oriente. En nuestro medio, la transmisión vertical del VHB es esencialmente perinatal o neonatal. La profilaxis mediante vacuna e inmunoglobulina posee una eficacia superior al 90% en la prevención de la infección neonatal y su fracaso sugiere la existencia de variantes defectuosas en la expresión del determinante "a" del HBsAg en la madre o bien una infección "intra útero". La secuenciación directa de fragmentos de amplificación obtenidos de la región S del virus detectado en el suero del niño revela fácilmente su presencia, pero la participación de esas variantes en la población viral presente en el suero de la madre puede ser muy baja, por lo que su detección suele requerir la clonación de los fragmentos y la secuenciación independiente de los clones.

Existen unas recomendaciones generales de control de las infecciones en la embarazada que, entre otros temas, tratan del control de la hepatitis B. Por tanto, se recomienda el seguimiento de dichas recomendaciones, que se basan en la determinación de HBsAg. Si al niño se le ha realizado la profilaxis anti-VHB en las primeras 24 horas después del nacimiento, aunque es preferible hacerlo en las primeras 12 horas, la protección conseguida es suficiente en la práctica totalidad de los casos. El retraso en la realización de la profilaxis aumenta la probabilidad de infección neonatal. En esos casos, debe realizarse un control serológico en el niño tres meses después del nacimiento, determinando los

niveles de anti-HBs. Si el resultado es negativo, se debe realizar la determinación de HBsAg.

6.1.2 Hepatitis C. La transmisión vertical del VHC es muy infrecuente pero aumenta de forma significativa cuando la madre portadora sufre una infección por el VIH no tratada. Considerando, además, que no pueden aplicarse medidas profilácticas eficaces, no se recomienda la investigación sistemática de anti-VHC en las embarazadas sanas. Cuando la infección por VHC en la mujer embarazada haya sido ya diagnosticada por otras vías, sí parece conveniente realizar un seguimiento serológico del recién nacido. El diagnóstico de la infección se realiza, en ese momento, mediante métodos de detección directa de virus (ARN VHC o HcAg). La exclusión definitiva de la infección neonatal requiere comprobar la ausencia de viremia y la pérdida de anticuerpos de anti-VHC maternos en el niño.

6.2 CONVIVIENTES DE PACIENTES CON HEPATITIS

6.2.1 Hepatitis A. Actualmente no parece necesario un control especial de los mayores de 40 años que convivan con pacientes diagnosticados de hepatitis A, ya que los estudios seroepidemiológicos muestran una prevalencia de anticuerpos anti-VHA superior al 90% en este grupo de edad. Sin embargo, en la actualidad está cambiando el patrón epidemiológico de infección por este virus en nuestro país y es de esperar en un futuro cercano la posible afectación de estos grupos de edad. Sólo en los convivientes que presentasen manifestaciones clínicas sugerentes de hepatitis se sospecharía una hepatitis A, siguiéndose en ellos el protocolo general de diagnóstico de las hepatitis víricas agudas.

6.2.2 Hepatitis B. Los convivientes de individuos infectados por el VHB constituyen un grupo de alto riesgo para la infección por este agente. Por ello, es conveniente investigar la existencia de portadores de HBsAg y, en función de los resultados, continuar con el protocolo general de diagnóstico de la hepatitis B que implica la vacunación de los seronegativos.

6.2.3 Hepatitis C. Todo indica que la transmisión intrafamiliar del VHC es muy infrecuente, por lo que no se considera necesario realizar estudios sistemáticos entre los convivientes de los portadores de este agente.

6.3 DONANTES DE SANGRE Y DONANTES DE ÓRGANOS

Existen protocolos bien establecidos para donantes de sangre u órganos en los aspectos referidos a las hepatitis víricas que se escapan a los objetivos de estos procedimientos, en los cuales siempre están incluidos el VHC y el VHB. Las pruebas a realizar serán HBsAg, anticuerpos anti-VHC y una prueba de detección directa de VHC (ARN VHC o HcAg). La positividad en alguna de estas pruebas obligará a la aplicación del protocolo general de las hepatitis víricas antes de poder considerar diagnosticada la infección, independientemente de lo que las normas específicas establezcan en cuanto a la retirada de

los productos sanguíneos procedentes de la donación y a la exclusión del donante como tal. En el caso de que se decida el transplante de un órgano procedente de un paciente HBsAg positivo a un receptor HBsAg positivo, es necesario, además, determinar previamente en el donante la presencia de anticuerpos anti-VHD.

6.4 GRUPOS DE RIESGO

Además de las personas pertenecientes a grupos sociales con elevada prevalencia de hepatitis víricas o procedentes de zonas con alta endemicidad (turistas, emigrantes, viajeros, etc.), en las que se realizarían las pruebas correspondientes a la hepatitis vírica prevalente, determinadas profesiones, enfermedades y hábitos o prácticas de vida involucran un riesgo de infección por alguno o varios de los virus de las hepatitis superior al de la población general.

6.4.1 Hepatitis A. Existen grupos de riesgo que se han de incluir en programas de vacunación como manipuladores de alimentos, viajeros a zonas de alta endemia y cuidadores de centros infantiles, particularmente aquellas personas recién incorporadas al centro que no la hayan sufrido previamente. Existen fórmulas para calcular la rentabilidad del estudio de prevacunación (VHA-IgG) que dependen del nivel de endemia local, aplicándose en nuestro país la edad de unos 40 años para realizar dicho estudio. No se recomienda control postvacunación por la buena respuesta a la vacuna.

6.4.2 Hepatitis B. Existen grupos de riesgo bien conocidos que deben incluirse en los programas de vacunación. Las personas con riesgo ocupacional, como personal sanitario, cuidadores de centros para disminuidos psíquicos y personal de centros penitenciarios, que hayan sufrido un accidente de riesgo y que no estuvieran vacunados, deberán realizarse un control serológico de hepatitis B (HBsAg), procediéndose a la realización de la profilaxis específica sin esperar el resultado de las pruebas serológicas. Si la persona que sufrió el accidente de riesgo resultara ser HBsAg positiva, se incluiría dentro del protocolo general de diagnóstico de la hepatitis B. Si, por el contrario, resultara ser HBsAg negativa, se realizará el control serológico post-vacunal conforme al protocolo de control de la vacunación. Si el accidente de riesgo hubiese tenido lugar en una persona vacunada, se recomienda un control cuantitativo anti-HBs, siempre que dicho estudio no se hubiera realizado en el último año, o si el nivel de anti-HBs detectado en el último control hubiera sido inferior a 100 UI/L. Existe una normativa sobre prevención de riesgos laborales en la que se indica que cada institución debe tener protocolos de actuación para estos accidentes.

Con las vacunas utilizadas actualmente se obtiene un alto porcentaje de respuesta inmunológica, especialmente en pacientes jóvenes, por lo que tan solo se aconseja la realización de controles de vacunación en individuos de alto riesgo, en los que la infección por alguno de estos agentes pudiera

ocasionar un problema grave añadido a su situación particular, tales como pacientes en hemodiálisis, receptores de hemoderivados y personal sanitario. Se considera que un individuo está protegido contra la infección por VHB mientras mantenga niveles de anti-HBs en suero iguales o superiores a 10 UI/L.

En las situaciones particulares de especial riesgo, como lo es la hemodiálisis, la realización de controles anuales de anti-HBs y/o la administración de nuevas dosis de vacuna si los niveles de anti-HBs son inferiores a 100 UI/L puede ser una medida a valorar en cada caso. En la población general, convivientes de portadores crónicos y personas pertenecientes a grupos con prácticas de riesgo, no se recomienda la realización de controles serológicos de ningún tipo, ni se consideran necesarias dosis de refuerzo en aquellos que hayan respondido a la vacuna.

6.4.3 Hepatitis C. El riesgo de transmisión de la hepatitis C por accidente de riesgo es bajo, con porcentajes de seroconversión entre un 2 y un 5%. Por ello, es conveniente determinar la presencia de anti-VHC y realizar pruebas de detección directa de virus (ARN VHC o HCcAg) en los controles que se realicen inmediatamente después del accidente, así como al mes y a los tres meses si el primer control resultó negativo para anti-VHC. El seguimiento a los seis meses puede realizarse solo con anti-VHC.

6.4.4 Hepatitis B y C. En pacientes sometidos a hemodiálisis o receptores habituales de sangre o hemoderivados se aconseja el estudio sistemático y periódico (trimestral) de HBsAg en los pacientes no vacunados o malos respondedores a vacuna, así como de anti-VHC y ARN VHC o HCcAg en los caracterizados previamente como seronegativos.

Cualquier grupo de pacientes con prácticas asociadas a un mayor riesgo de infección por agentes de transmisión parenteral presentará una elevada prevalencia de infección por VHD y VHC, en particular los UDVP y reclusos, lo que aconseja la realización periódica de pruebas de detección de HBsAg y anti-VHC, y, aún más importante, la inclusión de los mismos en programas de vacunación para el VHB. En el caso del VHB, el riesgo elevado de infección se extiende también a los varones homosexuales y a las personas sexualmente promiscuas, para las que cabe aplicar las mismas recomendaciones en lo que atañe a dicho agente.

7. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

El laboratorio de inmunomicrobiología no ha de ser un mero emisor de datos cuali ó cuantitativos de los ensayos realizados, sino que ha de emitir un informe que interprete el conjunto de los mismos, sobre todo cuando los resultados sean dudosos o atípicos. Para ello, se ha de conocer la situación clínica del paciente y escoger la explicación más plausible a la misma. Por ejemplo, un anti-HBc aislado en un niño que ha sido estudiado para ser o no vacunado frente al VHB es muy probable que responda a una reactividad inespecífica, mientras que en un UDVP será, muy probablemente, la expresión de una respuesta inmune incompleta

frente a la infección. Otros resultados de más fácil interpretación, como una hepatitis B pasada o una infección aguda, se pueden informar de un modo sencillo mediante respuestas codificadas, o bien automáticamente mediante procesos informáticos codificados en función de los resultados.

8. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

En la actualidad se dispone de autoanalizadores u otros aparatos con un grado de automatización que garantiza obtener resultados en apenas unas horas desde que se recibe la muestra. Por lo tanto no es necesario aplicar otro tipo de ensayos de diagnóstico rápido.

9. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

No se deben aplicar para diagnóstico ensayos "caseros" que no garanticen la adecuada calidad de los resultados. Se seguirán las instrucciones del fabricante en los ensayos comerciales y, en caso contrario, se especificarán los cambios en el procedimiento normalizado de trabajo y se articulará un control de calidad adecuado. Tampoco son aceptables los informes que no sean inteligibles para el clínico o no reflejen claramente el ensayo que se ha realizado y, a ser posible, la interpretación del mismo.

10. ESQUEMAS DE DIAGNÓSTICO E INTERPRETACION DE LOS DIFERENTES MARCADORES DE LAS HEPATITIS VÍRICAS EN LAS SITUACIONES MÁS FRECUENTES

Los esquemas de diagnóstico e interpretación de los diferentes marcadores de las hepatitis víricas en las situaciones más frecuentes quedan recogidos en las tablas 1, 2, 3 y 4.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36:211-218.
2. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36:S145-S151.
3. Fuertes A, León P, Orduña A, Jiménez de Anta T. Procedimientos en Microbiología Clínica, Serología de las hepatitis víricas. 1993. Coordinador, JJ Picazo, Ed. JJ Picazo. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
4. Jardí R, Rodríguez F, Butí M, Costa X, Cotrina M, Valdés A, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Viral Hepat.* 2001;8:465-471.
5. León P, López JA, de Ory F, Elola C, Echevarría JM. Detección de anticuerpos IgG de baja avididad en el diagnóstico de la infección primaria aguda por virus de la hepatitis C. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1997; 15:14-18.
6. Lok, A. Chronic hepatitis B. *N Eng J Med* 2002; 346:1682-1683.
7. Martell M, Gómez J, Esteban JI, Saulea S, Quer J, Cabot B, et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.*1999;37:327-332.
8. Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002; 25:S3-S12 .
9. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl. 1):S3-S20.
10. Panteva M, Korkaya H, Jameel S. Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy? *Virus Res.* 2003;92:131-40.
11. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36 (Suppl. 1):S65-S73.
12. Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol.* 2000; 33:826-833.
13. Seeff LB, Hoofnagle JH. Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002. *Clin Liver Dis* 2003; 7:261-287.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este documento es exponer lo que puede ser un procedimiento normalizado de trabajo (PNT) de los métodos utilizados para el diagnóstico de hepatitis víricas expuestos en el documento científico, aunque también puede ser aplicable al resto de los ensayos empleados en el laboratorio de serología. Si bien cada ensayo debe tener su procedimiento, no es posible detallar todos y cada uno de los descritos en el documento científico, por lo que expondremos un procedimiento genérico aplicable a todos ellos. Cada laboratorio deberá posteriormente realizar sus modificaciones para que el PNT se adapte a su práctica habitual, desde la extracción de la muestra realizada por el equipo de enfermería que atiende al paciente hasta la emisión de los resultados. Se ha de prestar especial atención a la adecuada identificación de las muestras, pues es una fuente de error no modificable por la calidad de los ensayos que se apliquen. Actualmente, se considera imprescindible el uso de etiquetas con código de barras que disminuyen considerablemente las posibilidades de error de identificación del paciente y optimizan su empleo en autoanalizadores y demás equipos para el análisis serológico.

Los documentos de los diferentes ensayos serológicos o de diagnóstico y caracterización molecular se numerarán sucesivamente, relacionándolos con la sección de la cual dependan, habitualmente la de serología. El/los facultativo/s responsables del laboratorio elaborarán el procedimiento. Los técnicos de la sección, bajo la dirección del facultativo responsable, colaborarán en esta tarea. Posteriormente, éste será revisado por el Jefe de Sección/Servicio. Cada documento se ha de revisar periódicamente, constanding por escrito las modificaciones que se realicen. A continuación, se expone un modelo genérico que puede servir de guía para la elaboración de los procedimientos relacionados con la serología de las hepatitis víricas.

Servicio de Microbiología	Serología de las hepatitis víricas	Fecha: PNT-SHV-01	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Se expondrá el objetivo del ensayo, normalmente la detección de antígenos, ácidos nucleicos o anticuerpos frente a un determinado virus. Aunque el alcance del documento puede referirse a todas las fases del proceso diagnóstico, se puede limitar al ensayo en cuestión, reflejándose en otro procedimiento normalizado de trabajo (PNT) los procedimientos de la fase preanalítica.

2. FUNDAMENTO

Se describirá el fundamento científico en el que se basa el ensayo en concreto y la tecnología que se aplica. Habitualmente, se comienza describiendo brevemente la posible patología que puede causar el microorganismo o bien las indicaciones del ensayo en función de la clínica. A continuación, se expone el tipo de ensayo que se realiza –aglutinación, enzimoimmunoanálisis, reacción en cadena de la polimerasa...- y la tecnología instrumental que se utiliza. Finalmente, se explicará el significado de los posibles resultados que se puedan obtener.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad, imprescindibles para el procesamiento de estas muestras, que se han de considerar siempre como de alto riesgo, independientemente de los datos clínicos disponibles del paciente. En nuestro país, la actuación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos está regulada por el Real Decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la Orden de 25 de marzo de 1998. La formación es el punto clave de los programas de seguridad y debe ser facilitada a todas las personas que están expuestas a los riesgos del laboratorio. Existe un procedimiento de la SEIMC dedicado íntegramente a este tema.

- Normas o libro de procesamiento de muestras del laboratorio de serología, incluyendo la fase preanalítica, conservación de muestras y elaboración de listas de trabajo.

- Manuales de instrucciones de las técnicas aplicadas.

4. TOMA DE LA MUESTRA

Lo más frecuente es trabajar con muestras de suero o plasma. Deberá exponerse en el procedimiento correspondiente el modo de realizar la extracción de sangre para la solicitud de ensayos serológicos y/o de diagnóstico y caracterización molecular con aplicación al diagnóstico o al seguimiento de las enfermedades infecciosas, su identificación, transporte al laboratorio y su conservación hasta realizar el estudio solicitado. En cada ensayo, se especificará el tipo de muestra, el volumen necesario y su conservación, siendo lo más frecuente suero, unos 100 µl y conservación a -20°C. No se aceptará suero hemolítico ni hiperlipémico. Tampoco se han de procesar muestras que no hayan sido identificadas correctamente o existan dudas

sobre el correcto procesamiento de las mismas. Siempre se ha de solicitar una cantidad mayor de muestra que la estrictamente necesaria para posibles repeticiones y ensayos de confirmación así como para la seroteca, cuya importancia ha sido ya expuesta.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

En la actualidad, prácticamente la totalidad de los ensayos utilizados en el diagnóstico de las hepatitis víricas son de origen comercial, por lo que el manejo y la conservación de los reactivos se ajustarán a las instrucciones del fabricante. Cualquier modificación respecto de aquellas deberá constar en el correspondiente PNT.

6. APARATOS Y MATERIAL

Se hará constar los que sean necesarios para realizar el ensayo, tanto los utilizados comúnmente - pipetas, puntas, tubos, gradillas..-, como los específicos del ensayo.

7. PROCESAMIENTO

Se describirán detalladamente los pasos a seguir para realizar el ensayo, desde la descongelación de los sueros y el atemperamiento de los reactivos, las diluciones a realizar, si procede, el modo de dispensar e identificar las muestras y las sucesivas fases del ensayo propiamente dicho. Estas últimas, así como los controles a incluir, suelen depender de las instrucciones del fabricante y, de nuevo, se hará constar en el documento cualquier modificación a las mismas.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para la aceptación de los resultados, es imprescindible la validación del ensayo en función del resultado de los controles, bien por métodos más o menos automatizados, como suele ocurrir en los enzimoimmunoensayos, bien por métodos manuales, como en las aglutinaciones, la inmunofluorescencia o el inmunoblot. En este punto, es aconsejable incluir los criterios de validación técnica y facultativa y definir el procedimiento a seguir ante resultados dudosos.

Una vez validado un ensayo, se genera un resultado que se ha de informar de un modo interpretado, frecuentemente por la integración con otros resultados generados por diferentes ensayos. El valor añadido que ha de dar el especialista al conjunto de la información generada por los distintos ensayos es de gran importancia, dada la multiplicidad de resultados que se pueden dar y que han sido expuestos en el documento científico. Si la validación de un ensayo es un punto crítico para realizar el diagnóstico, no lo es menos su integración con el resto de los ensayos realizados, en ocasiones debido al propio resultado, así como su interpretación respecto de los datos clínicos del paciente. También se deben incluir sugerencias sobre posibles actuaciones en el paciente que puedan influir sobre la calidad del diagnóstico, como es el seguimiento en un determinado periodo de tiempo. La tendencia actual

Servicio de Microbiología	Serología de las hepatitis víricas	Fecha: PNT-SHV-01	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 4 de 4

de integrar los ensayos serológicos en plataformas que realizan múltiples ensayos y con sistemas de validación automatizados con fines puramente economicistas puede conducir a un detrimento de la calidad de los servicios que ofrece el laboratorio, sin olvidar además la importancia en Salud Pública de muchas de estas infecciones.

9. RESPONSABILIDADES

Se describirá el personal con responsabilidad en el ensayo, normalmente los técnicos y los facultativos del laboratorio de serología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Se ha de incluir en este apartado aquella información que sea demasiado extensa para incluirla en el fundamento, describiendo las posibles causas de error y justificando las precauciones que se recomienden. También se pueden incorporar sugerencias para prevenir los fallos más frecuentes o las situaciones clínicas que pueden influir en la validez de los resultados, como las que se han descrito en el documento científico, los procedimientos alternativos aceptables y las diferencias esperables. Si las pruebas se realizan con carácter urgente se ha de indicar el tiempo de entrega aceptable y las medidas a tomar si esto no se cumple.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se deberán incluir en este apartado las posibles interferencias que pueden tener los procedimientos, como por ejemplo: hemólisis, suero lipémico, etc. o el rango de linealidad de la técnica.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Loza E, Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica, Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica, 2000. Coordinadora: Elena Loza, Ed. JJ Picazo. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Elaboración de Procedimientos Normalizados de Trabajo. http://www.msc.es/agemed/frmcpea/formnacional/pn_pn.pdf.