

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF THE HEPATITIS B VIRUS

Zaida García^{1*}, Lorena Torres¹

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consiste en resaltar el diagnóstico serológico de un agente viral de gran interés en Salud Pública, como lo es el Virus de la Hepatitis B por su capacidad de inducir hepatitis crónica, su evolución a cirrosis y carcinoma hepático. Se consideran los diferentes marcadores serológicos virales empleados en el laboratorio clínico, según los estadios de la infección y el posible pronóstico, los cuales son de gran utilidad en los programas de control y prevención que han permitido disminuir la morbilidad y mortalidad de la hepatitis B. Además, se discuten algunos aspectos tales como inmunización por la vacuna y la ubicación geográfica de los laboratorios para el diagnóstico serológico en la Caja Costarricense de Seguro Social.

PALABRAS CLAVE: Marcadores Serológicos VHB, VHB, Hepatitis Viral.

ABSTRACT

The objective of this overview is to highlight the serological diagnosis of the hepatitis B virus, agent of great importance for Public Health due to its capacity to induce chronic hepatitis,

cirrhosis and hepatic carcinoma. It consider different viral serologic markers used in clinical laboratories according to the phase of the infection and the probable prognostic, wich are very useful in the prevention and control programs that have allowed reduced morbidity and mortality from hepatitis B. Moreover, are discussed in this document some aspects such as immunization with the vaccine and the geographical location of laboratories of the Caja Costarricense de Seguro Social, for the diagnosis of the virus.

KEY WORDS: Serology markers VHB, VHB, Viral Hepatitis B.

INTRODUCCIÓN

Se estima que alrededor de 400 millones de personas están infectadas en el mundo con el Virus de la Hepatitis B (VHB), que pertenece a la familia Hepadnaviridae, lo que representa un problema de salud pública. (1)

El VHB tiene un genoma de ADN parcialmente de doble banda de 3,2 kb, el cual consiste en una hebra negativa completa y una positiva incompleta. (2,3) Posee una envoltura lipídica rica en una proteína viral llamada

1. Subárea Laboratorios Clínicos. Caja Costarricense de Seguro Social. Teléfono 2295-2917.

* Correspondencia.

antígeno de superficie o proteína S (HBsAg), de 40 a 42 nm de diámetro y una nucleocápside, constituida por una proteína denominada como "core" (HBcAg), con simetría icosaédrica de 27 nm de diámetro.

Este virus en los individuos infectados puede producir hepatitis aguda y crónica. Aproximadamente el 90% de las hepatitis B agudas son clínicamente silenciosas, especialmente cuando la infección es adquirida en etapas tempranas de la vida. La probabilidad de la progresión a la cronicidad depende de la edad del paciente, del sexo y del estado inmunológico del individuo infectado. (2,4)

Sus vías de transmisión son: parenteral por el uso de jeringas infectadas al inyectarse drogas, por un pinchazo accidental con aguja contaminada, relación sexual, perinatal, por transfusión, trasplante renal, hemodiálisis, por contacto intrafamiliar y a través de utensilios contaminados con sangre (peines, cuchillas de afeitar, toallas y otras fuentes de infección, como esperma, saliva, sangre, secreciones cervicales y vaginales, orina y leche materna. (5,6)

El VHB se distribuye a nivel mundial y su prevalencia se relaciona geográfica y epidemiológicamente. Las zonas de alto riesgo son aquellas donde la prevalencia de HBsAg supera el 8%, las de riesgo intermedio cuando está entre un 2% y un 8% y de bajo riesgo cuando la prevalencia es menor al 2%. (7,8,9)

Estudios seroepidemiológicos realizados en Costa Rica en las

áreas de San Carlos, Pérez Zeledón, San Vito de Coto Brus, San Ramón, Palmares y en donantes de sangre en todo el territorio (para el año 2005 una seropositividad de 0,1% del HBsAg) han demostrado que Costa Rica se clasifica como región de baja endemicidad, sin embargo, la zona de Pérez Zeledón se clasifica como de prevalencia intermedia. (10,11)

Las consecuencias de la infección por el VHB van desde una leve incapacidad de la persona infectada, hasta la incapacidad permanente y consecuente muerte por hepatitis fulminante, cirrosis hepática o hepatocarcinoma celular primario (HCCP). (5,12,13)

Pruebas de laboratorio para el diagnóstico

En un primer contacto con el virus surgen los síntomas asociados y se producen antígeno y anticuerpos únicos, que hacen posible el diagnóstico del tipo de hepatitis y determinan el estado de infección y el posible pronóstico. (5)

El diagnóstico de laboratorio 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. (14)

Además, el advenimiento global en el desarrollo de sistemas automatizados ha permitido el seguimiento de la trazabilidad total de las muestras, disminuyendo sustancialmente el consumo de recursos en término de costos y cargas de trabajo. (15,16)

La Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) cuenta con una red de 98 laboratorios; 29 de ellos están ubicados en centros hospitalarios, de los cuales 17 están equipados con autoanalizadores para la realización de exámenes serológicos en el diagnóstico de la hepatitis por virus B, que funcionan como red de referencia y contrarreferencia.

La distribución geográfica de los laboratorios que realizan serología por VHB, se presenta por regiones programáticas (17) en el Cuadro 1 y la Figura 1.

Es importante indicar que los laboratorios que realizan las pruebas serológicas para el diagnóstico del VHB, participan además en Programas de Control de Calidad Externo del Colegio Americano de Patólogos (CAP), que constituye el más grande de los programas de evaluación del desempeño y acreditación en el mundo, ubicado en los Estados Unidos. Este programa permite a los laboratorios ser evaluados regularmente en su desempeño, brindando garantía de que el resultado que se entrega es verdadero. Estos son evaluados con

muestras incógnitas, a las cuales se les deben realizar las pruebas de diagnóstico en laboratorio, el participante las cuantifica y remite los resultados al CAP para ser evaluados estadísticamente. Cada laboratorio recibe el reporte con su desempeño y resumen de todos los participantes en el programa.

Desde el año 2000 hasta el 2006, la CCSS invirtió en el diagnóstico de la infección por el VHB \$1.905.423,38 millones para la cuantificación de las siguientes pruebas: HBsAg, Anti HBs, IgM core, Anti core total, HBe Ag, anti HBe, dando cobertura en todo el territorio nacional. (18)

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. (19)

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. (5,20)

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. (21)

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. (20,22)

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. (20,22)

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 o

3) por inmunización al recibir la vacuna con HBsAg. (20)

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 (23), 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. (24,25)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) han aceptado que un nivel de estos anticuerpos de 10 mU/ml tiene carácter protector. (26)

La vacunación junto con las pruebas de los diferentes marcadores virológicos en el tamizaje de los hemoderivados y la inmunoprofilaxis materno-fetal mediante inmunoglobulina específica, han contribuido a disminuir la incidencia de la infección. (8,27)

Sin embargo, se han descrito variantes con cambios de aminoácidos en el HBsAg que pueden escapar a la protección de la vacuna, en las posiciones 120 (Pro120Ser/Glu),

126 (Thr/Ile126Asn/Ser/Ala), 129 (Gln129His/Arg), 133 (Met133Leu), 141 (Lys141Glu), 142 (Pro142Ser), 144 (Asp144Ala) y 145 (Gly145Arg/Ala). Algunas de esas sustituciones en las posiciones 114, 118, 120, 121, 123, 124, 126, 129-131, 133, 134, 137, 139-142 y 144-147 condicionan una resistencia a la inmunoterapia específica para prevenir la infección en neonatos de madres infectadas. Además, los virus con determinadas mutaciones en el determinante "a", podrían no ser detectables en el tamizaje de los hemoderivados debido a falsos negativos en la detección de HBsAg. (1,22)

Aunque la infección aguda es preocupante en lo que concierne a la enfermedad fulminante y a las pérdidas económicas debidas a ella, la mayor preocupación acerca de la hepatitis B es la infección persistente como resultado del estado de portador del HBsAg, que se asocia con hepatitis crónica y sus secuelas. En el 10% de los pacientes nunca hay seroconversión, no se detecta anti-HBs y se mantiene el HBsAg durante más de seis meses, estableciéndose un estado de persistencia crónica del VHB.

Los varios marcadores de infecciones a HBV están presentes en diferentes momentos y varían las combinaciones a través del curso de infección. En la Figura 2 se ilustra un caso típico, en el que la secuencia serológica ocurre en el 75 – 85% de los pacientes con hepatitis aguda tipo B.

Infección crónica por HBV

La hepatitis crónica por VHB se define como la persistencia del HBsAg,

detectado en sangre, por un período mayor de 6 meses (1,13), producto de una incapacidad del individuo para eliminar el virus; este puede persistir por el resto de la vida del paciente o, en algunos casos, ser eliminado de forma espontánea. Aunque el 90-95% de los adultos con VHB se recuperan completamente, el virus puede dañar severamente el hígado y causar la muerte. (28)

El riesgo de desarrollar cronicidad por VHB depende en gran medida de la edad en que se infecta la persona. Cuando la infección ocurre por vía vertical o perinatal, el riesgo de cronicidad llega a valores hasta de un 90%. (6,27)

Estos niños se convierten en replicadores activos del virus y, por consiguiente, en diseminadores de la infección en poblaciones infantiles; además que también poseen un elevado riesgo de padecer afecciones del hígado y morir cuando llegan a ser adultos - jóvenes. Los niños que no se infectaron por vía perinatal tienen un riesgo que va de un 30 a 60% de infectarse y convertirse en portadores crónicos del VHB en los primeros cinco años de vida, por el contacto estrecho y continuo con las personas infectadas. (29) En niños de madres que son HBsAg y HBeAg positivos, el riesgo de transmisión perinatal es de 70 a 90%, pero disminuye a 5 a 20% en niños de madres anti HBe positivo. Entre un 5 y un 10% de los individuos que se infectan después de los 5 años de edad no logran resolver la infección y quedan como portadores del virus. (6,29) En la infección crónica el antígeno HBsAg persiste durante años

o décadas. El título puede disminuir un poco a medida que pasan los años, pero se mantiene durante toda la vida. Se pueden detectar el antígeno HBeAg, anti HBe y el ADN del HBV en el suero de individuos infectados. Los pacientes con mutaciones en la proteína viral pre core /core mostrarán presencia de anti HBe y de viremia. (1,20,30,31)

El ADN del HBV puede eventualmente integrarse al ADN del hepatocito, lo cual puede ser importante en la aparición de carcinoma hepatocelular primario, la complicación más grave de esta enfermedad. (31) El anticuerpo anti-HBc (una IgG) está invariablemente presente en el suero de los portadores; hay muy poca IgM presente. Los anticuerpos anti-HBc totales pueden detectarse tanto en infección aguda como crónica, así como en aquellos que ha resuelto una hepatitis B. (20,28) En la Figura 3 se ilustra una evolución serológica típica de una infección crónica por VHB y en la Figura 4 se describen los marcadores serológicos en diferentes patrones de infección.

Control de un paciente con hepatitis B

Una vez que una infección por HBV ha sido confirmada por pruebas serológicas, es importante determinar el estado de la infección y el pronóstico, con el objeto de realizar el tratamiento apropiado e iniciar las medidas de control entre los contactos íntimos.

Las pruebas para los siguientes marcadores pueden ser utilizadas para controlar el proceso: HBs Ag, Anti HBe y Anti- HBs. (1) El control de la muestra original del paciente para HBeAg y Anti-HBe ayudará a

determinar el estado de infección y que tan infecciosa es la persona. Si la muestra original fue negativa, controlar al paciente aproximadamente un mes después realizando las pruebas para HBs Ag, Anti-HBc IgM, HBeAg y Anti Hbe, con lo cual se llegará a igual fin.

Si HBsAg y HBeAg son positivas, entonces los fluidos del paciente son altamente infecciosos y todavía existe una activa replicación viral. Si Anti-HBeAg y HBsAg son positivas, la replicación viral por lo general ha remitido y la enfermedad ha de resolverse en corto tiempo. En este caso, la desaparición del HBsAg en controles posteriores a intervalos mensuales debería confirmar el pronóstico. Después de la pérdida de niveles detectables de HbsAg, el control mensual del Anti-HBs confirmará la inmunidad y la recuperación clínica.

Por otra parte, la persistencia de HBeAg y HBsAg durante 8 a 10 semanas indica que el paciente probablemente no resolverá de manera rápida la infección viral y podría ocurrir un estado de portador crónico. Estos pacientes pueden ser seguidos cada 3 meses para determinar el estado de la infección y la posible sero-conversión a Anti-HBe. En el último caso, estos individuos en su mayoría no desarrollarán una severa enfermedad hepática.

Cuando un paciente se presenta con síntomas y/o antecedentes que sugieren una hepatitis aguda viral, las primeras pruebas apropiadas para una evaluación son el HBsAg, el Anti-HBc IgM, el Anti-HBc Total. (30) El Cuadro 2 resume los cuadros típicos vistos con estas pruebas y sus interpretaciones clínicas.

Por otra parte, es necesario familiarizarse con los diferentes marcadores usados para el diagnóstico del VHB. En el Cuadro 3 se presenta un glosario de términos y resumen de su significado, así como se muestra un algoritmo para diagnóstico en la Figura 5.

CONCLUSIONES

Actualmente los avances tecnológicos desarrollados por la ciencia han permitido metodologías de diagnóstico

cada vez más sensibles y específicas para el control, valoración y seguimiento de la hepatitis, así como nuevos avances en estrategias novedosas en tratamiento. Los nuevos ensayos con metodologías moleculares y las mejoras en los equipos analíticos que le permitan al profesional de microbiología brindar a los pacientes y a los médicos tratantes una respuesta oportuna y de gran calidad, son los retos futuros.

Cuadro 1. Distribución de los laboratorios con equipos automatizados para el diagnóstico serológico del VHB, según regiones de salud de la CCSS y provincias de Costa Rica

Región	Hospital
Brunca (Provincia de Puntarenas/ Zona Sur)	Hospital Ciudad Nelly Hospital Dr. Escalante Pradilla
Pacífico Central (Provincia de Puntarenas)	Hospital Monseñor Sanabria
Chorotega (Provincia de Guanacaste)	Hospital La Anexión Hospital Dr. Enrique Baltodano Briceño
Huetar Norte (Provincia de Alajuela/ Zona Norte).	Hospital San Carlos
Central Norte (Gran Área Metropolitana/ Provincia de Alajuela y Heredia).	Hospital San Vicente de Paúl Hospital San Rafael de Alajuela
Central Sur (Gran Área Metropolitana/ Provincia de Cartago).	Hospital William Allen Hospital Max Peralta
Huetar Atlántica (Provincia de Limón).	Hospital Dr. Tony Facio Castro Hospital de Guápiles
Provincia de San José (Área Metropolitana)	Hospital Nacional de Niños Hospital Dr. Rafael A. Calderón Guardia Hospital México Hospital San Juan de Dios Banco Nacional de Sangre

Cuadro 2. Marcadores serológicos de la hepatitis B en diferentes fases de la infección

Fase de la infección	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc		HBeAg	Anti-HBe
			IgG	IgM		
Periodo de incubación tardío	+	-	-	-	+/-	-
Hepatitis aguda	+	-	+	+	+	-
Hepatitis aguda HbsAg-negativa	-	-	+	+	-	-
Portador	+	-	+++	-	-	+/-
Hepatitis B crónica activa	+	-	+++	+/-	+	-
Hepatitis crónica pasiva	+	-	+++	-	-	+
Infección HBV pasada reciente	-	++	++	+/-	-	+
Infección VHB pasada distante	-	+/-	+/-	-	-	-
Vacunación reciente	-	++	-	-	-	-

Fuente: Guidelines for the Prevention and Treatment of Viral Hepatitis, 2005.

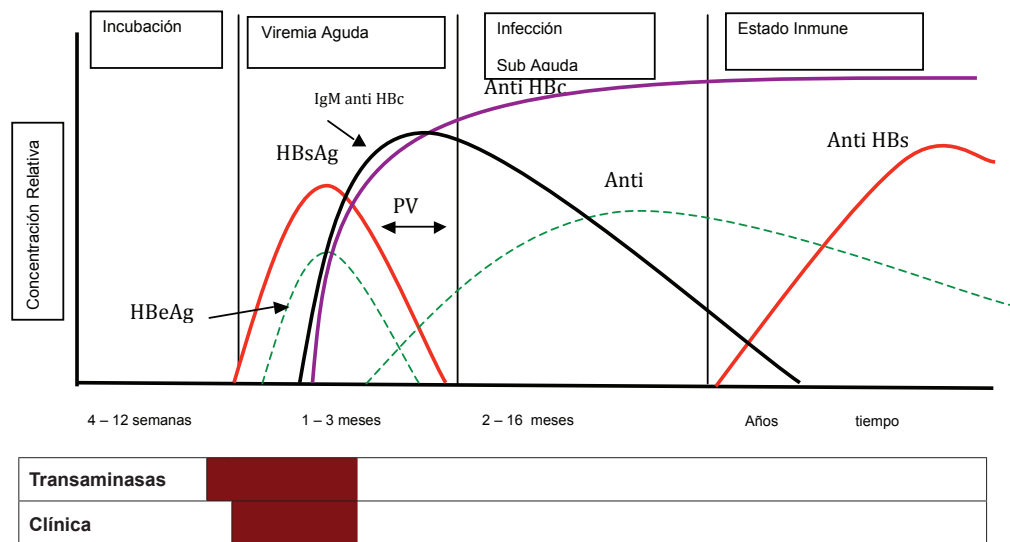
Cuadro 3. Marcadores serológicos de infección VHB (X)

HBsAg	Antígeno de superficie de la hepatitis B indicador temprano de la presencia de la infección aguda. También indica infección crónica.
Anti-HBs	Anticuerpo contra el antígeno de superficie de VHB. Indicador de recuperación clínica y subsiguiente inmunidad a la hepatitis por virus B. La excepción se debe a la transferencia pasiva por transfusión de sangre o inmunización. Aparece entre 1 a 4 meses después del comienzo de los síntomas, pero puede tardar mucho más.
Anti-HBc (IgM, IgG)	Anticuerpo contra el antígeno del núcleo (antígeno core) de la hepatitis B si es de tipo IgM. Es también un indicador temprano de infección aguda. El Anti-HBc Total es un marcador de por vida que representa tanto una infección pasada con una infección activa en el período subagudo. En ausencia del HBsAg y el Anti-HBs, el Anti-HBc IgM es un importante marcador serológico para identificar una infección reciente.
HBeAg	Antígeno "e" de hepatitis B. Indicador de la replicación viral activa aguda, presente en el periodo más infeccioso. Por lo común es de vida corta (de 3 a 6 semanas). La persistencia del antígeno "e" más allá de las 10 semanas es indicador de la progresión hacia un estado de portador crónico y probablemente una enfermedad hepática crónica.
Anti - HBe	Anticuerpo contra el antígeno "e" de VHB. La seroconversión de antígeno "e" a anticuerpo "e" durante el estado agudo es de valor pronóstico para la resolución de la infección. Su presencia junto con Anti-HBc puede también confirmar un reciente estado agudo en ausencia del antígeno HBsAg y Anti-HBs.

(X): Marcadores serológicos no identifican la presencia de enfermedad hepática sino que prueban la presencia de infección e identifican el tipo de virus).

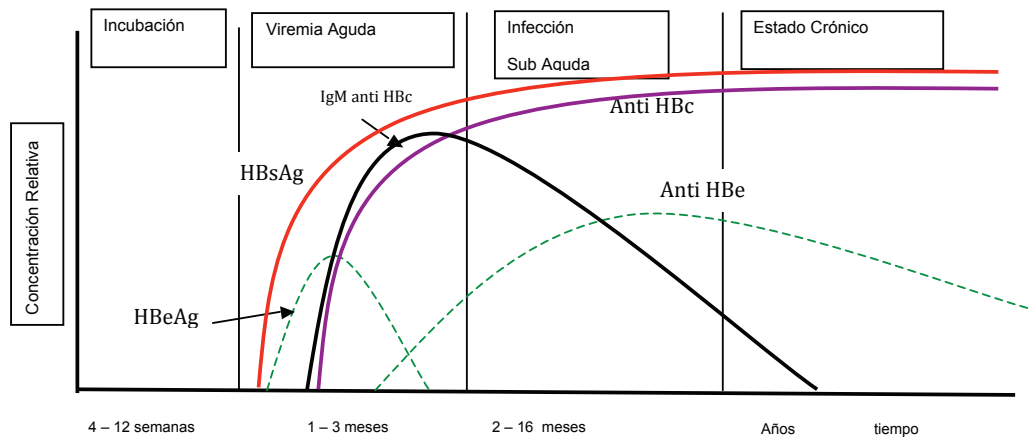


Figura 1. Ubicación de los laboratorios para el diagnóstico serológico del VHB en el territorio nacional. Caja Costarricense de Seguro Social, 2007.



PV: Período de ventana
Fuente: Primaria

Figura 2. Evolución serológica típica de una infección aguda por el VHB con recuperación.



Fuente: primaria

Figura 3. Evolución serológica típica, progresión a infección crónica por el VHB.

Hepatitis Aguda resuelta		Hepatitis Crónica sin replicación (HBeAg negativo)		Hepatitis Crónica con replicación (HBeAg positivo)	
HBsAg	(1)	HBsAg	(1)	HBsAg	(1)
HBeAg	(2)	HBeAg		HBeAg	(2)
ADN viral		ADN viral	(3)	ADN viral	
HBcAc (IgM)		HBcAc (IgM)		HBcAc (IgM)	
HBcAc (total)		HBcAc (total)		HBcAc (total)	
HBsAc		HBsAc		HBsAc	
HBeAc		HBeAc		HBeAc	
0 2 4 28 sem					

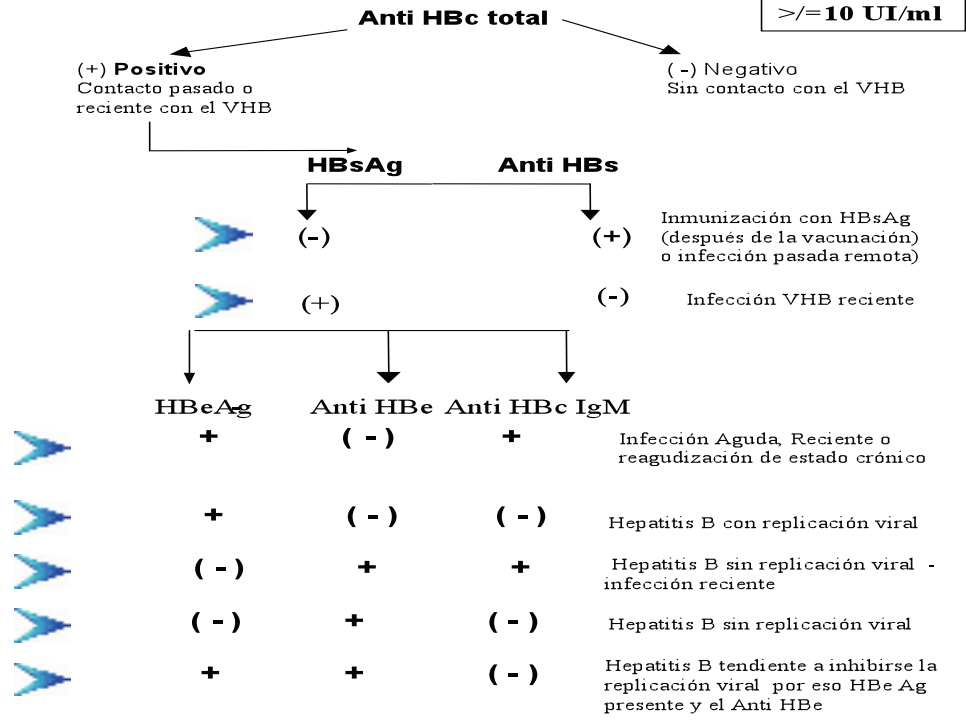
(1) Podría ser negativo en el caso de mutaciones en el determinante "a" del HBsAg. (2) Podría ser negativo en el caso de mutantes pre-core defectivos. (3) Niveles bajos. Fuente: Ortiz de Lejarazu R; Avellón Ana; Eiros JM. 2006.

Figura 4. Cronología de los marcadores virológicos en patrones de infección por VHB.

Figura N° 5

Algoritmo para Serología VHB

Anti HBs:
 $\geq 10 \text{ UI/ml}$



Fuente: El Khouri M; Aparecida dos Santos, 2004.

REFERENCIAS

- Ortiz de Lejarazu R, Avellón A; Eiros JM. Diagnóstico Microbiológico de las Hepatitis Víricas. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:194-204.
- Sanjeev KS, Nitin S, Yogesh C. Study protocol Hepatitis B Virus: Inactive carriers. *J Virol* 2005; 82: 1-5.
- Miller Rh, Kanicko S, Chung Ct, et al. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 2006; 9: 322-327.
- Hernández GR, Espinoza ÁF. Hepatitis Viral Aguda. *Rev Cubana Med Gen Integ* 1998; 14: 484-93.
- Codoñer FP. Hepatitis B. El virus, técnicas de diagnóstico, epidemiología, enfermedad y sus posibilidades evolutivas. *An Pediatr* 2003; 58:478-81.
- Shapiro CN. Epidemiología de la hepatitis B. *J Pediatr Infect Dis* 1994; 2: 174-177.
- Zunino E. Epidemiología de la hepatitis B en Chile y esquemas de vacunación en Latinoamérica. *Rev Chil infectol* 2002; 19 (3): 140-155.
- Jinlin H, Zhihua L, Fan G. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection Review. *Int J Med Sci* 2005; 2: 50-58.
- Aguilera AG, Romero YS, Regueiro BJ. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 264–276.
- Visoná KA, Eduarte CE, Zamora E, Salazar LM. Estudio epidemiológico de las hepatitis virales en San Ramón y Palmares de 1972-1985. *Acta Med Costarric* 1989; 33: 69-77.

11. Caja Costarricense de Seguro Social, Dirección Técnica Servicios de Salud, Sección de Laboratorios. Informe de Bancos de Sangre 2000-2001, 2002-2003-2004 y 2005. San José, Costa Rica; 2005. Serie de Informes Técnicos: 2000-2005.
12. Uchida T. Genetic variations of the Hepatitis B virus and their clinical relevance. *Microbiol inmunol* 1993; 37: 425-439.
13. Buti M. Diagnóstico de la hepatitis crónica. *Gastroenterología y Hepatología* 1994; 17: 67-72.
14. Delgado-Iribarren A, Echevarría JM, León P. Serología de las hepatitis víricas. Segunda edición. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC; 2004.
15. Brezmes MF, Ochoa C, Eiros JM. Cost analysis in a clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 582-8.
16. Salas JL. Informe automatización de laboratorios a Junta Directiva. Caja Costarricense de Seguro Social- Departamento de Regulación y Sistematización, área Laboratorios Clínicos, 2002.
17. Torres AL, García ZM, Araúz P, Taylor ML. Prevalencia de anticuerpos contra el *Tripanosoma cruzi* en Donantes de Sangre de la Seguridad Social, Costa Rica. Septiembre 2003-Mayo 2004. *Rev Costarric Cienc Med* 2004; 25:21-25.
18. Caja Costarricense de Seguro Social. Informes contratos de reactivos químicos y biológicos, Área de Regulación y Sistematización. Subárea de Laboratorios Clínicos; 2000.
19. El Khouri M, Aparecida V. Review Hepatitis B: Epidemiological, Immunological, and Serological considerations emphasizing mutation. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo* 2004; 59(4): 216-224.
20. Koof RS. La Hepatitis B Hoy: Revisión de clínica y diagnóstico. 1994. *J Pediatr Infect Dis* 1994; 2:170-173.
21. Kenneth WL, Kirchner JT. Hepatitis B. *Am Fam Phys* 2004; 69: 75-86.
22. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-366.
23. Rakesh A, Piyush R. Preventing and treating hepatitis B infection. *BMJ* 2004; 329: 1080-1086.
24. Hollinger FB. Chapter 86: Hepatitis B virus in *Fields Virology*, eds. Tercera edición. Lippincott – Raven Publisher, Philadelphia; 1996.
25. Forn X, Ampurdarnés S. Clínica de las hepatitis virales, hepatitis aguda, hepatitis crónica, carcinoma hepatocelular. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 1995;13: 71-83.
26. Guidelines for the prevention and treatment of viral hepatitis. October 2005. Federal Bureau of Prisons - *Clinical Practice Guidelines* 2005; 1-70.
27. Bruguera M, Forn X. Epidemiología actual de las hepatitis virales ¿Quién la padece y quién puede protegerse? *Enf Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 443-447.
28. Khouri M. Hepatitis B Epidemiology, immunology and serology. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 2004; 59: 216-224.
29. Vassiliki P, Christos H. Adherence to the screening program for HBV infection in pregnant women delivering in Greece. *BMC Infectious Diseases* 2006; 6:1-6.
30. Park W, Keefe EB. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B. *Minerva Gastr Enterol Dietol* 2004; 50: 289-303.
31. Chien F, Shih SL; Yung CH, et al. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Inmunol* 2006; 3:97-106.