

Artículo original

Desempeño de estuches comerciales para el diagnóstico serológico de las hepatitis virales B y C en poblaciones yanomami y piaroa del estado Amazonas

Nathalia Elena Cardona^a, Kenia del Valle González^a, Domingo José Garzaro^b, Carmen Luisa Loureiro^b, María Carolina Duarte^a, Daicy Mayila García^a, Milian Coromoto Pacheco^a y Flor Helene Pujol^{b,*}

^aCentro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales, Simón Bolívar (CAICET), Puerto Ayacucho, Venezuela.

^bLaboratorio de Virología Molecular, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela.

Recibido 27 de julio de 2009; aceptado 3 de febrero de 2010

Resumen: Los virus de hepatitis son una causa importante de morbilidad y mortalidad en la cuenca amazónica. El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de estuches serológicos para la determinación de marcadores de VHB y VHC en población indígena. Se determinó la presencia de anti-HBc, agsHB, anti-VHC y de genomas virales en sueros de individuos piaroa y yanomami. Más de 50% de las muestras reactivas por un inmunoensayo comercial no resultaron positivas al usar otros estuches. El marcador serológico para el cual se observó una mayor concordancia entre los estuches comerciales fue el anti-HBc, posiblemente porque se trata de un ensayo de inhibición. La concordancia entre los ensayos para agsHB con la positividad de la PCR fue de pobre a moderada, coincidiendo sólo dos de los ensayos con los resultados de la PCR. No existió concordancia entre los distintos ensayos inmunoenzimáticos, ni con la presencia del ARN viral para VHC. Las discrepancias inesperadas entre distintos estuches comerciales pudieran deberse a características inherentes a estas poblaciones, tales como múltiples coinfecciones, en especial parasitarias. Estos factores pudiesen estar afectando la especificidad de los estuches diagnósticos, situación observada con menor frecuencia en otras poblaciones venezolanas. Estos estudios refuerzan la importancia de la validación de pruebas serológicas en estas poblaciones, con ensayos confirmatorios y moleculares.

Palabras clave: hepatitis, amerindios, diagnóstico, prevalencia

Performance of commercial kits for serologic diagnosis of viral hepatitis B and C in yanomami and piaroa populations from Amazonas State

Abstract: Hepatitis viruses are an important morbidity and mortality cause in the Amazon basin. The goal of this study was to evaluate the performance of commercial serologic kits for determination of HVB and HVC markers in indigenous populations. Presence of anti-HBc, HBags, anti-HVC and viral genomes was determined in sera from piaroa and yanomami individuals. Over 50% of the samples reactive with one of the commercial kits were not positive when using other kits. The serologic marker which showed the highest concordance among the commercial kits was anti-HBc, possibly because it is an inhibition assay. Concordance among assays for HBags and PCR positivity varied between poor and moderate; only two of the tests coincided with the PCR results. There was no concordance among the various immunoenzymatic assays, nor in viral RNA presence for HVC. The unexpected discrepancies among the various commercial kits could be due to inherent characteristics of these populations such as multiple co-infections, especially parasitic. These factors could be affecting the specificity of the diagnostic kits, situation less frequently observed in other Venezuelan populations. This study emphasizes the importance of validating serologic tests in these populations, through confirmation and molecular assays.

Keywords: hepatitis, Amerindians, diagnosis, prevalence

* Correspondencia:
E-mail: fpujol@ivic.ve

Introducción

Se estima que unos 12,5 millones de personas están infectadas por el virus de hepatitis B (VHB) [1] y unos 13,1

millones por el virus de hepatitis C (VHC) en América [1,2]. Existe un alto grado de variabilidad en las prevalencias del VHB en América, siendo las poblaciones aborígenes las que muestran los mayores niveles de prevalencia [3].

Venezuela presenta un nivel de prevalencia intermedia (1-5%) de infección por el virus de hepatitis B [4], con focos de alta endemicidad asociados a población indígena, donde las prevalencias halladas son mayores a las observadas para el país [5]. En el pueblo yanomami se ha observado una prevalencia de 14,3% para el antígeno de superficie del VHB (agsHB) y 58% del anticuerpo contra el antígeno core del VHB (anti-HBc) en comunidades aisladas del Orinoquito del municipio Alto Orinoco. En población piaroa se ha observado una alta prevalencia de infección y exposición al VHB en comunidades de los municipios Atures y Autana [6].

La hepatitis C representa para Venezuela y el continente americano una enfermedad emergente importante, detectada en Venezuela inicialmente en áreas urbanas [7-9]. Estudios realizados en las poblaciones indígenas bari y yukpa de la región noroccidental de Venezuela han mostrado ausencia de infección por el VHC [10]; sin embargo, se ha descrito una seroprevalencia de infección por el VHC relativamente alta en amerindios yanomami [11].

Se ha sugerido que las reacciones antígeno-anticuerpo inespecíficas se deben a reacciones cruzadas con anticuerpos anti-parasitarios; estos últimos pueden encontrarse sobre todo en pacientes de zonas altamente endémicas para infecciones parasitarias y otras infecciones microbianas, y pueden generar activación policlonal de linfocitos [12,13]. Estos hechos pudieran estar relacionados con la presencia de resultados falsos positivos en los ensayos serológicos para la determinación de marcadores de infección viral.

En el presente estudio se evaluó el comportamiento de nueve estuches serológicos para la determinación de marcadores de VHB y VHC en poblaciones indígenas. Los hallazgos pueden ser usados, en conjunto con la consideración de otros factores, disponibilidad y costo del ensayo, como elementos para seleccionar las pruebas serológicas apropiadas para estudiar estas poblaciones.

Materiales y métodos

Población: Se analizaron muestras de suero de 148 individuos de la comunidad piaroa Babilla de Pintao, eje carretero sur, municipio Atures y de 135 individuos de las comunidades yanomami Yaurawetheri y Hokototheri, comunidades aisladas del Orinoquito del municipio Alto Orinoco, para la evaluación de los ensayos serológicos para Hepatitis B. Se estudiaron 133 muestras de sueros de amerindios yanomami, procedentes de las comunidades Yaurawetheri y Hokototheri y 398 de población piaroa de las comunidades Babilla de Pintao, Caño Tigre, Sabanita de Pintao, eje carretero sur, municipio Atures, y Caño Ceje, Raudal de Ceguera, Laguna de Bagre, Cacera, Laguna Sardinita, municipio Autana, para la presencia de anticuerpos contra el VHC. Se tomaron muestras de sangre, las cuáles fueron procesadas para la obtención de suero y almacenadas a -30°C. El muestreo se realizó entre abril 2002 y marzo 2004, en el marco del proyecto FONACIT G2000001493. Este proyecto fue aprobado por los Comités de Ética del

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y del Centro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales (CAICET).

Ensayos serológicos: Se evaluaron marcadores serológicos para VHB (anti-HBc y agsHB) y para VHC: anticuerpo contra VHC (anti-VHC). El anti-HBc fue determinado mediante 2 ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) comerciales: (B1) ETI-AB-COREK-2 (DiaSorin Ltd.) y (B2) HBcAb (DIMA Diagnostika C.A.). El agsHB fue determinado empleando 2 ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) comerciales: (B3) ETI-MAK-4 (DiaSorin Ltd.) y (B4) agsHB (DIMA Diagnostika C.A.). Una muestra de los sueros de la población piaroa con serología positiva para agsHB (n=39) fue analizada una tercera vez con el ensayo ELISA comercial (B5) Murex HBsAg Versión 3 (ABBOTT Murex).

El anti-VHC fue determinado empleando 4 ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) comerciales: (C1) Umelisa HCV (Tecnosuma), (C2) Innostest HCVAbIV (INNOGENETICS N.V.), (C3) HCVAb (DIMAD Diagnostika C.A.) y (C4) un inmunoensayo enzimático basado en tres péptidos sintéticos de la región del core del VHC [14]. Las muestras reactivas para al menos dos ensayos diagnósticos fueron evaluadas por "radioinmunoblot assay" (RIBA3) de 3a generación (Ortho Diagnostic).

Determinación de genomas virales: Se determinó la presencia del ADN del VHB en 39 sueros de la población piaroa mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada usando iniciadores de la región de la cápside del VHB [15]. Los sueros con serología positiva para anti-VHC fueron analizados para determinar la presencia de ARN del VHC mediante un ensayo de PCR anidada, usando iniciadores de la región 5' no codificante [8,11].

Análisis estadístico: Se analizó la distribución de las densidades ópticas de los diferentes ensayos ELISA comerciales mediante el programa SPSS, versión 10 y el programa Microsoft Excel para Windows. Se empleó el índice kappa de Cohen (κ) para evaluar la concordancia entre los ensayos empleados para la determinación de los marcadores serológicos agsHB y anti-HBc. La máxima concordancia posible corresponde a $\kappa = 1$. El valor $\kappa = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Si la concordancia es mayor que la esperada simplemente a causa del azar, $\kappa > 0$, mientras que si es menor, $\kappa < 0$ [16]. Se considera "Muy Buena" concordancia un valor de kappa de 0,81 a 1; una concordancia "Moderada" de 0,41 a 0,60 y una "Pobre" con un valor de kappa $< 0,20$ [16]. La comparación de prevalencias se realizó mediante el test de Chi cuadrado (X^2) con corrección de Yates, de acuerdo a un programa computarizado (Epi Info™ Version 3.5.1, CDC, Atlanta).

Resultados

Estimación de la infección por el VHB: Se analizaron 148 muestras de suero de la comunidad piaroa de Babilla de Pintao para anti-HBc empleándose el ensayo comercial B1. Resultaron 26 (18%) muestras positivas y 122 (82%) negativas. Las mismas muestras, al ser ensayadas por la prueba comercial B2, resultaron 24 (16%) positivas y 124 (84%) negativas. Las 24 muestras positivas para anti-HBc del ensayo B2 corresponden a las mismas muestras que resultaron positivas en el ensayo B1. Se evidenciaron 24 resultados positivos coincidentes y 2 resultados positivos discordantes, con una concordancia de 98,6% entre ambos ensayos. El índice kappa fue de 0,951, correspondiente a una fuerza de concordancia "Muy Buena".

En el ensayo de 148 muestras de suero de la comunidad Babilla de Pintao para la determinación del agsHB mediante el estuche comercial B3, resultaron 38 (26%) muestras positivas y 110 (74%) muestras negativas. Al ser probadas por el ensayo B4, resultaron 2 (1,4%) positivas y 146 (98,6%) negativas. Las 2 muestras positivas por el ensayo B4 son coincidentes con el ensayo B3; se observaron 36 resultados positivos discordantes y 2 coincidentes, con una concordancia de 75% entre ambos ensayos. El valor kappa obtenido fue inferior a 0,20, correspondiente a una fuerza de concordancia "Pobre".

Se analizaron 126 muestras de las comunidades yanomami para la determinación del agsHB mediante el ensayo B3, resultando 45 (36%) muestras positivas y 81 (64%) muestras negativas. Estas muestras, al ser probadas por el ensayo B4, resultaron 5 (4%) positivas y 121 (96%) negativas. Las 5 muestras positivas por el ensayo B4 resultaron coincidentes con el ensayo B3. La concordancia entre ambos ensayos fue de 68%. El valor kappa obtenido fue inferior a 0,20, correspondiente a una fuerza de concordancia "Pobre".

Del análisis de 39 muestras de suero mediante el ensayo B5, resultaron 2 muestras positivas. Sólo una de las muestras estudiadas resultó positiva para los 3 ensayos comerciales (Tabla 1). Se obtuvo una concordancia de 5,1% entre el ensayo B3 y el B5. El índice kappa fue inferior a 0,20, correspondiente a una fuerza de concordancia "Pobre". La concordancia entre el ensayo B4 y el B5 fue del 95,9%, con un índice kappa de 0,473, correspondiente a una fuerza de concordancia "Moderada".

Se evaluó el ADN del VHB mediante PCR anidada en la región de la cápsida viral a las 39 muestras agsHB positivas según el ensayo B3, 3 de las cuales habían sido positivas al agsHB al menos por dos ensayos diagnósticos. Un total de 12 muestras resultaron positivas, incluyendo las 3 muestras agsHB positivas al menos por dos ensayos diagnósticos. El 69% de las muestras agsHB positivo por B3 resultó negativo para la presencia del ADN VHB, por lo que se consideraron falsos positivos los resultados agsHB reactivos por este solo ensayo.

Al comparar los valores de absorbancia de las muestras agsHB positivas por el estuche B3, 18 (46%) muestras arrojaron una lectura 3 veces por encima del valor de corte

del ensayo; de las 21 restantes, sólo 9 duplicaron el valor del umbral, lo que indica que se trata de una población con una reactividad baja en este ensayo serológico. Lo mismo se observó para el ensayo B4, donde las muestras positivas generaron valores de absorbancia inferiores al doble del valor de corte del ensayo. Las dos muestras positivas por el ensayo B5 resultaron con lecturas de absorbancia 4 y 6 veces por encima del valor de corte del ensayo (datos no mostrados). No se observó relación al comparar los resultados de las lecturas de absorbancia de los ensayos de agsHB y la presencia del ADN viral obtenido mediante la PCR.

Tabla 1. Determinación del agsHB en 148 muestras de suero de individuos piaroa de la comunidad Babilla de Pintao, Municipio Atures, estado Amazonas, según 3 ensayos comerciales. 2002.

Población (n)	Ensayos comerciales		
	B3	B4	B5
1	+	+	+
1	+	+	-
1	+	-	+
36	+	-	-
109	-	-	-

B3: ETI-MAK-4 (DiaSorin Ltd)

B4: AgsHB (DIMA Diagnostika CA)

B5: Murex HBsAg Versión 3 (Abbot Murex)

Los sueros de población yanomami fueron evaluados por los ensayos B3 y B4. Al analizar los valores de absorbancia de las muestras agsHB positivas de las comunidades yanomami estudiadas, por el estuche B3 (n=45), 5 (11%) muestras arrojaron lecturas 50 a 90 veces por encima del valor de corte del ensayo. Estos valores corresponden a las muestras agsHB positivas por el ensayo B4, con absorbancias igualmente altas. De las muestras restantes agsHB positivas por el ensayo B3, 12 de 40 arrojaron lecturas de absorbancia 3 veces por encima del umbral y 28 de 40 mostraron lecturas bajas.

Estimación de la infección por el VHC: Se evaluó un total de 133 sueros de población yanomami para la presencia de anticuerpos contra el VHC mediante 4 estuches comerciales. De éstos, 24% (32/133) resultaron positivos por el ensayo C1, 15% (20/133) por el ensayo C2, 8,3% (11/133) por el ensayo C3 y 6,8% (9/133) por el ensayo C4 (Tabla 2). Ninguna muestra resultó reactiva a todos los estuches diagnósticos evaluados. De la población piaroa, 2% (8/396) resultaron positivos por el ensayo C2 y 2,8% (11/396) por el ensayo C4. Ninguna de las muestras positivas en estos ensayos evaluados resultó coincidente, ni resultó positiva en ensayos confirmatorios (Tabla 2). El índice kappa fue inferior a 0,20 entre todos los ensayos, correspondiente a una fuerza de concordancia "Pobre". Al evaluar molecularmente las muestras reactivas por al menos un ensayo serológico, se encontraron 8 sueros con ARN viral. Estos sueros resultaron

indeterminados por el ensayo confirmatorio RIBA3.

Tabla 2. Evaluación de anticuerpos anti-VHC por cuatro ensayos ELISA en sueros de poblaciones indígenas venezolanas.

Población (n)	Número de muestras positivas por el ensayo serológico (C1 a C4), confirmatorio (RIBA3) o molecular (PCR)			
	C1	C2	C3	C4
Yanomami (133)	32	20	11	9
Sueros positivos en los 4 ensayos Coincidentes: ninguno				
Confirmados (RIBA3 o PCR)	5 (PCR)			
Piaroa (396)	nd	8	nd	11
Sueros positivos en los 2 ensayos Coincidentes: ninguno				
Confirmados (RIBA3 o PCR)	3 (PCR)			

nd: no determinado; RIBA3 (Radioimmunoslot assay-3)

C1: Umelisa HCV (Tecnosuma)

C2: Innostest HCV AbIV (Innogenetics NV)

C3: HCV Ab (DIMA Diagnostika CA)

C4: Inmunoensayo enzimático basado en tres péptidos sintéticos de la región del core del VHC

Discusión

Se emplearon estuches *comerciales* de reconocida eficacia para la determinación de marcadores serológicos de hepatitis B en población indígena venezolana, observándose una fuerza de concordancia “Muy Buena” entre los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) utilizados para el análisis del marcador serológico anti-HBc para Hepatitis B (ETI-AB-COREK-2 DiaSorin Ltd. y HBcAb DIMA Diagnostika C.A.), lo que nos permitió establecer la prevalencia de exposición al VHB en estas comunidades indígenas. La correspondencia observada en la reactividad anti-HBc pudiera deberse al hecho de que se trata de ensayos basados en formato de ELISA de inhibición, lo cual les confiere un alto grado de especificidad para las pruebas. A pesar de la aparente alta especificidad de los ensayos para determinación de anticuerpos anticore, no existió correlación entre la presencia de estos anticuerpos y la presencia del ADN del VHB. La presencia de anticuerpos anticore en ausencia del ADN del VHB es de esperar, dado que muchas de las reactividades al anticore reflejan exposición pasada al VHB con remisión de la infección activa. Sin embargo, adicionalmente se encontraron también muestras de ADN para el VHB positivas sin presencia de este marcador. Esto último es sugestivo de infección oculta por el VHB en esa población, lo cual dificulta aún más el diagnóstico de la misma.

La concordancia entre el ensayo ETI-MAK-4 (DiaSorin Ltd.) y los ensayos agsHB (DIMA Diagnostika C.A.) y Murex

HBsAg Versión 3 (ABBOTT Murex) para la determinación serológica del antígeno de superficie del VHB, fue “Pobre”, de acuerdo a los resultados del cálculo del índice kappa. La fuerza de concordancia entre el ensayo DIMA Diagnostika C.A. y el ensayo ABBOTT Murex resultó “Moderada”. El 69% de las muestras agsHB positivo por ETI-MAK-4 (DiaSorin Ltd.) resultó negativo para la presencia del ADN del VHB. En base a la pobre concordancia entre los ensayos serológicos y la ausencia de ADN viral en esas muestras, se consideraron falsos positivos los resultados agsHB reactivos por este solo ensayo. Las muestras agsHB positivo por los ensayos comerciales DIMA Diagnostika C.A. y ABBOTT Murex coincidieron en su positividad con el ensayo de PCR.

Los estuches diagnósticos para la determinación de anticuerpos contra el VHC presentan por lo general una alta sensibilidad y especificidad [8]. Sin embargo, el desempeño de estos estuches podría ser variable en función de la población analizada. En este estudio, se observó una alta prevalencia de anticuerpos anti-VHC, en particular al utilizar ciertos estuches comerciales. Sin embargo, no existió concordancia entre los distintos ensayos inmunoenzimáticos, ni con la presencia del ARN viral. Estos resultados sugieren la presencia de falsos positivos en las muestras. Por lo general, todos los valores de absorbancia observados en estos sueros fueron bajos.

No se puede descartar una eventual infección muy remota con remisión, donde se haya mantenido un bajo nivel de anticuerpos, sin conllevar a positividad en el ensayo de RIBA, aunque esto parece poco probable. Tomando la positividad del PCR para el ARN viral como marcador de infección activa por el VHC, la prevalencia de infección encontrada en población yanomami fue de 3,8%, significativamente mayor ($p=0,027$ por prueba de X^2) a la encontrada en población piaroa (0,75%).

Las reactividades serológicas observadas en estos sueros pueden deberse a factores presentes en los mismos que conlleven a una elevada frecuencia de falsos positivos [9]. Sin embargo, algunas de estas reactividades serológicas, no confirmadas por RIBA3, sí estuvieron acompañadas de viremia, lo que sugiere una infección activa por VHC, que de alguna forma no indujo una respuesta de anticuerpos lo suficientemente vigorosa como para ser detectada por todos los ensayos serológicos y en particular por el ensayo confirmatorio. Este punto debe ser estudiado con más detalle con el fin de determinar si el contexto inmunogenético o las condiciones sanitarias de estas poblaciones están incidiendo en una respuesta inmunitaria alterada hacia el VHC.

Independientemente de estos casos aislados, los resultados obtenidos apuntan hacia una baja frecuencia de infección por VHC en las comunidades piaroa. Estos resultados coinciden con la hipótesis de que el VHC no es autóctono en nuestra región [9,10], a diferencia del VHB que sí es altamente endémico en nuestras poblaciones amerindias [5], como se confirmó en este trabajo. Sin embargo, la prevalencia de infección por VHC podría ser mayor en población yanomami. Estudios anteriores han descrito igualmente una

alta prevalencia de anticuerpos contra el VHC en algunas comunidades yanomami del Amazonas. En una de estas poblaciones, situada en la Serranía de Unturán del estado Amazonas, la prevalencia de hepatitis C confirmada por la prueba de RIBA de 2da generación fue 12% (Botto C, comunicación personal). Se ha encontrado igualmente una alta prevalencia de anticuerpos en población yanomami del Río Padamo, aunque en este caso la serología no pudo ser validada por ensayos confirmatorios [9]. Se podría pensar que la asistencia médica brindada a estas poblaciones (campañas de vacunación, tratamientos odontológicos, transfusiones) haya favorecido la introducción de este virus en algunas de estas comunidades. Ciertas costumbres más agresivas de los yanomami, en comparación con las de los piaroa, como por ejemplo las guerras entre comunidades, también pudieran haber favorecido la diseminación de esta infección. Se ha descrito y demostrado molecularmente, la transmisión del VHC por pelea [17]. Una vez introducido el virus, algunas prácticas y ritos socio-culturales propios de estos grupos pueden haber favorecido su diseminación. Si esto fuese cierto y tomando en cuenta que la transmisión sexual no parece ser una vía muy efectiva para el VHC [2], esta situación alerta sobre el riesgo al que están expuestas estas comunidades de adquirir otras enfermedades foráneas para las cuales la transmisión sexual es más efectiva, en particular el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

La discordancia con la especificidad y/o sensibilidad de los ensayos comerciales reportada en países industrializados ha sido evidenciada en el análisis de agsHB y anticuerpos anti-VHC en sueros de individuos africanos de Zimbabwe [18] y en la detección de anticuerpos anti-VHC en población amerindia venezolana [9]. Estos hallazgos apoyan la teoría de posibles reacciones antígeno-anticuerpo inespecíficas. Asimismo, la presencia de complejos inmunológicos circulantes pueden enmascarar la detección de agsHB libre por los métodos serológicos, especialmente si la concentración de agsHB circulante es baja [19].

En conclusión, se observó que el desempeño de los estuches comerciales para la determinación de antígenos y anticuerpos contra virus de hepatitis, generalmente aceptados como de alta sensibilidad y especificidad, no fueron tan satisfactorios como lo previsto, en particular debido a la presencia de un número inesperado de falsos positivos en muchas de las pruebas realizadas. Estos estudios recalcan la importancia de prestar atención a la validación de pruebas diagnósticas en poblaciones particulares, ya que los resultados de otros grupos poblacionales diferentes, no son forzosamente extrapolables. Estos resultados refuerzan la importancia de la validación de pruebas serológicas en estas poblaciones, con ensayos confirmatorios y moleculares (PCR).

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Proyecto de Grupo G-2000001493 de FONACIT, Venezuela. Se agradece a DIMA Diagnostika C.A, Venezuela por la donación de los estuches serológicos.

Referencias

1. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol.* 2004; 38: S158-68.
2. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 2006; 3: 41-6.
3. Parana R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin America. *J Clin Virol.* 2005; 34: S130-S3.
4. Silveira TR, da Fonseca JC, Rivera L, Fay OH, Tapia R, Santos JI, Urdeneta E, Clemens SA. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. *Rev Panam Salud Publica.* 1999; 6: 378-83.
5. Gutierrez C, Leon G, Loureiro CL, Uzcategui N, Liprandi F, Pujol FH. Bajo impacto de la infección silente por el virus de Hepatitis B en la incidencia de la hepatitis post-transfusional en Venezuela. *Rev Panam Salud Publ.* 2001; 10: 382-7.
6. Duarte MC, Cardona N, Poblete F, González K, García M, Pacheco M, Botto C, Pujol FH, Williams JR. A comparative epidemiological study of hepatitis B and hepatitis D virus infections in Yanomami and Piaroa Amerindians of Amazonas State, Venezuela. *Trop Med Internat Health.* 2010. (En prensa).
7. Muller G, Zabaleta M, Caldera L, Bianco N, Machado I. Hepatitis C en Venezuela. Comunicación preliminar. *Rev Soc Ven Gastroenterol.* 1990; 44: 336-42.
8. Pujol FH, Loureiro CL, Devesa M, Blitz L, Parra K, Beker S, Liprandi F. Determination of genotypes of hepatitis C virus from Venezuelan isolates by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1870-2.
9. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 2461-6.
10. Blitz L, Monsalve F, Atencio R, Porto L, Monzon M, Favorov M, Fields H, Pujol F, Echeverria J. Serological survey of markers of infection with viral hepatitis among the yukpas amerindians from western Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996; 90: 655-7.
11. Aguilar MS, Cosson C, Loureiro CL, Devesa M, Martínez J, Villegas L, Flores J, Ludert JE, Alarcón de Noya B, Noya O, Liprandi F, Pujol FH. Prevalence of infection with hepatitis C virus in Venezuela, as assessed with an immuno-assay based on synthetic peptides. *Ann Trop Med Parasitol.* 2001; 95: 187-95.
12. Banic DM, Viana-Martins FS, De Souza JM, Peixoto TD, Daniel-Ribeiro C. Polyclonal B-lymphocyte stimulation in human malaria and its association with ongoing parasitemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 44: 571-7.
13. Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today.* 2000; 16: 62-7.
14. Devesa M, de Saez A, León G, Sirit F, Cosson C, Bermúdez H, Liprandi F, Noya O, Pujol FH. Restricted isotypic antibody reactivity to hepatitis C virus synthetic peptides in immunocompromised patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 279-81.
15. Gutierrez C, Leon G, Loureiro CL, Uzcategui N, Liprandi F, Pujol FH. Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 768-70.
16. López de Ullibarri G. Medidas de concordancia: el índice Kappa. 2001. Disponible en: <http://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa.htm>. Acceso: 27 de enero de 2010.

17. Abel S, Cesaire R, Cales-Quist D, Bera O, Sobesky G, Cabié A. Occupational transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus after a punch. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1494-5
18. Mvere D, Constantine NT, Katsawde E, Tobaiwa O, Dambire S, Corcoran P. Rapid and simple hepatitis assays: encouraging results from a blood donor population in Zimbabwe. *Bull World Health Organ.* 1996; 74: 19-24.
19. Ackerman Z, Wands JR, Gazitt Y, Brechot C, Kew MC, Shouval D. Enhancement of HBsAg detection in serum of patients with chronic liver disease following removal of circulating immune complexes. *J Hepatol.* 1994; 20: 398-404.