



Desarrollo de un ensayo casero para la detección de IgG contra el core del virus de la Hepatitis B

(Development a homemade assay for IgG anti hepatitis B core detection)

Yismelvy Márquez-Toro ¹, Miguel Alejandro Bastidas-Azuaje ¹, Guillermo Teran-Angel ¹, Nubia Silva-Gutiérrez ¹, Melisa Colmenares ², Martha Marquez-Miranda ³, Ana Victoria Bellorin ³, Ingrid Volcanes ¹, Yanett Guzman-Escalona ¹, Ali Calderón ¹, Astrid Cantor-García ^{1,4}, Siham Salmen ¹ ✉

¹ Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ² Centro de Microscopía Electrónica, Vicerrectorado Académico, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ³ Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ⁴ Departamento de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Recibido: 01 de Octubre de 2016.

Aceptado: 18 de Noviembre de 2016.

Publicado online: 29 de Noviembre de 2016.

[COMUNICACIÓN CORTA]

Resumen (español)

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) está ampliamente distribuida a nivel mundial, en especial en zonas de América Latina. Las pruebas serológicas destinadas para su detección son herramientas fundamentales para su diagnóstico y tratamiento. Aunque existen muchas pruebas diagnósticas en formato de ELISA, en nuestro país se ha hecho difícil su adquisición debido a sus elevados costos, lo que ha limitado su acceso. Así, el objetivo de estudio fue desarrollar una prueba de ELISA casera para la detección de IgG anti core del VHB (IgG anti-HBc) como una herramienta asequible para nuestra población. Para ello se analizaron 112 muestras, 20 individuos no expuestos, 43 individuos expuestos y 49 provenientes de poblaciones indígenas asentadas en el Estado Mérida. La exposición al VHB se determinó con la prueba Murex anti-HBc (total)(DiaSorin, UK) usada como prueba de referencia. El ELISA casero desarrollado muestra una especificidad 100% y sensibilidad del 100 %. La evaluación de la concordancia entre la técnica y los valores conocidos mostraron un índice de concordancia de Kappa de cohen de 1 (IC95%: 0,767-1), asociado a un valor de chi cuadrado estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Asimismo, se evidenció que la prueba puede discriminar entre positivos y negativos en una población indígena de la etnia Wayuu y mestizos, quienes mostraron una prevalencia de 22%. Estos resultados sugieren que la prueba de ELISA casera desarrollada pudiera ser una herramienta útil y de bajo costo para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis B.

Palabras clave (español)

Hepatitis B core, prueba casera, Wayuu, mestizos, virus de la Hepatitis B.

Abstract (english)

✉ **Autor de correspondencia:** Dra. Siham Salmen Halabi, Instituto de Inmunología Clínica, Avenida 16 de Septiembre, Edificio Louis Pasteur, Sector campo de Oro, Mérida 5101, Venezuela. Telefax: +58 2742403187. Email: sihamsa@ula.ve, salmensiham9@gmail.com

Hepatitis B infection affects individuals worldwide, especially in Latin America. Serological assay for HBV antibodies and antigen detection, are critical for HBV diagnostic and treatment. Available commercial ELISA kits are expensive and in our country not always are readily available. The aim of this study was develop a homemade ELISA kit for serological detection IgG anti-HBV core (IgG anti-HBc) accessible for our patients. 114 samples were analyzed: 17 from seronegatives individuals, 48 from seropositives patients and 49 belonging to indigenous population from Mérida State. Exposure to HBV was determined using the Murex anti-HBc test (DiaSorin, UK). Homemade ELISA shows 100% specificity and del 100 % sensitivity, and was in very good agreement with serological status, Kappa= 1 (CI 95%: 0,767-1), X² (p<0,001). In indigenous population (Wayuu and mestizos), overall IgG anti-HBc prevalence was 22%. Taking into account these results, homemade IgG anti-HBc ELISA is efficacious and low cost usefully, for HBV diagnosis.

Keywords (english)

Hepatitis B core, homemade assay, Wayuu, mestizos, Hepatitis B virus.

Introducción

La infección por virus de la hepatitis B (VHB) es considerada como un problema de salud pública, y se estima que 3,6% de la población mundial está crónicamente infectada, aunque su distribución es muy heterogénea (1). La infección crónica puede generar daños irreversibles del tejido hepático, tales como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (HCC) (2), siendo el HCC el causante de 500.000 a 600.000 muertes anuales (3). En América latina se ha reportado una endemicidad heterogénea y variable, según la región y grupos poblacionales. El rango de endemicidad es de baja a elevada y al menos de 7 a 12 millones de personas están infectadas, siendo una de las zonas más afectada la cuenca del Amazona (Brasil, Perú, Venezuela y Colombia) (4). Los grupos indígenas de América del Sur son una de las poblaciones más afectadas por este virus y su distribución varía dependiendo del grupo étnico y la región de asentamiento. Por ejemplo la prevalencia puede variar desde un 64,3% (anti-HBc total), del 9,4% (HBsAg) en la Amazonia Peruana (5), hasta un 15,4-54,5% (anti-HBc total) y del 3,4-9,7% para el HBsAg en la Amazonia Brasileña (6, 7).

El VHB es un virus de doble cadena de ADN de 3.2 kb, que contiene 4 marcos de lectura abierto, que codifican para la polimerasa viral; el core y el antígeno e; la proteína X y para los tres antígenos de superficie denominados: la proteína larga (L) constituida por preS1 +preS2 + S, la mediana (M), conformada por preS2 +S, y la pequeña (S) solo por el antígeno S (8). Dos de las principales herramientas actualmente utilizadas para el diagnóstico inicial y seguimiento de la infección por el VHB, son la detección del antígeno de superficie (HBsAg), y la detección de anticuerpos contra el core (anti-HBc). La detección de HBsAg es una herramienta muy útil sobre todo en las fases

tempranas de la infección, sin embargo cuando se evalúa junto con anti-HBc, se convierte en una herramienta muy poderosa para detectar individuos expuestos al virus (9, 10). En nuestro país en la actualidad existen dificultades para la adquisición de pruebas diagnósticas por su elevado costo, en especial aquellas dirigidas a detectar la infección por el VHB, es por ello que como objetivo nos propusimos desarrollar una prueba de ELISA casera que permita la detección de IgG anti-HBcAg, a fin de ofrecerla como herramienta diagnóstica de producción nacional y más asequible, para utilizarse en conjunto con la detección del HBsAg. Nuestros resultados indican que la prueba casera para la detección de IgG anti-HBc, tiene una especificidad 100% y sensibilidad del 95 % y un índice Kappa de 0,901 (IC95%: 0,767-1), asociado a un valor de chi cuadrado estadísticamente significativo (p<0,001). Estos resultados indican que esta prueba pudiera ser una alternativa de bajo costo y de utilidad diagnóstica en nuestra región.

Materiales y métodos

Sujetos: 112 individuos residentes del estado Mérida fueron reclutados al estudio. Este grupo consistió en 20 individuos sanos seronegativos, 43 individuos infectados crónicos con serología positiva para anti-HBc y 49 individuos de la etnia Wayuu y mestizos residentes del estado Mérida. Este último grupo fue con el fin de aplicar la prueba para el tamizaje de una población. El estado serológico para la infección por el virus de la Hepatitis B se determinó con la prueba Murex anti-HBc (total)(DiaSorin, UK) usada como prueba de referencia. Las poblaciones indígenas se ubicaron en dos comunidades, la primera ubicada en el Municipio Obispo Ramos de Lora del estado Mérida, la Ranchería, a 40 minutos de Guayabones; la comunidad está conformada por una

población mixta (Wayuu y mestizos) estructurada en 116 familias, con una población aproximada de 1000 habitantes. La segunda comunidad es aledaña a la Azulita en el Municipio Andrés Bello del Estado Mérida, sector "El limón", en donde hay gran confluencia de personas provenientes de Colombia (refugiados víctimas del conflicto armado) y de la etnia Wayuu.

Expresión y purificación del core de virus de la hepatitis B: La secuencia del core clonada en el vector pet21d, fue utilizada para transformar mediante shock térmico a la cepas de *E. coli* BL21-R1PL, luego cultivadas en medio líquido LB (0,5% de NaCl, 1% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, pH 7) más glucosa (0,1%), magnesio (1mM) y ampicilina/cloramfenicol (50µg/ml), hasta alcanzar una densidad óptica de 600nm, momento en que se le añadió isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG 100ug/ml). Las células fueron tratadas con buffer de lisis (1% de Tritón X100, 50mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 1 mM de DTT, y 1 µg/ml de Leupeptina, 1 µg/ml de Aprotinina y 500 µg/ml de Lisozima) y el homogenato celular se sometió a sonicación, fue tratado con urea (4M) y finalmente sometido a purificación por cromatografía. Las muestras resultantes de la expresión y purificación, fueron sometidas a electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida al 12%, para evaluar su pureza, y el western blot fue revelado mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL SuperSignal de Pierce, USA, para evaluar su inmunogenicidad.

Ensamblaje de estuche inmunoenzimático (ELISA), validación y ensayos serológicos: Las placas de micro titulación de poliestireno se sensibilizaron con 10 µg/ml del core recombinante puro resuspendido en 50 mM de Buffer Na₂CO₃ (1M, pH 9.6). La incubación se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche. La placa se bloqueó con PBS-BSA al 1,5% a 4°C durante toda la noche. Los sueros se diluyeron 1:20 en solución bloqueante y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Los lavados (5 en total), se realizaron con TBS-TWEEN 20 0,1%. El anticuerpo secundario conjugado a Peroxidasa de Rábano (HRP) dirigido contra la IgG humana diluido 1:2500 en solución bloqueante, se incubó por 45 minutos a 37°C, luego se hicieron 5 lavados y el revelado de la placa se realizó con TMB y la reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄. La densidad óptica se midió con un espectrofotómetro

KAYTORT-2100C empleando una longitud de onda de 450 nm.

Análisis estadístico: Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con los programas SPSS versión 21 (IBM Corporation, New York, US), Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, US) y GraphPad Prism versión 5 & Quickcalcs (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA). La valoración diagnóstica del ensayo inmunoenzimático se realizó determinando los parámetros de validez y seguridad como sensibilidad, especificidad y valores predictivos; para ello se determinó el punto de corte a partir de la evaluación de las curvas operador-receptor (ROC), usando el programa SPSS versión 21, que permitió determinar el área bajo la curva indicador de la capacidad diagnóstica de nuestro test y los múltiples pares sensibilidad, 1-especificidad. Se determinó el punto de corte con el índice de Youden bajo la fórmula $Y = \text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 1$ y se tomó el valor más cercano a 1; se clasificaron los resultados obtenidos con el inmunoensayo para cada una de las muestras según el índice de Youden en positivo y negativo.

Resultados y discusión

Validación de los ensayos serológicos: Como fase inicial del estudio se determinó la validez, especificidad y sensibilidad del ensayo serológico casero a través del análisis de muestras con serología conocida para el core del VHB. Tal y como se muestra en la figura 1, el anti core recombinante expresado en el laboratorio es altamente inmunogénico y logra diferenciar entre los individuos expuestos y no expuestos al VHB (figura 1a). Se evaluó la capacidad diagnóstica de la prueba determinando parámetros de validez y seguridad como sensibilidad, especificidad y valores predictivos; para ello se determinó el punto de corte a través del análisis de discriminación de señales con curvas ROC y del índice de Youden (ver figura 1b), obteniéndose un área bajo la curva de 1,00 y un punto de corte de $DO = 0,317$. Se estimó el área bajo la curva en 1,00 como un indicador adicional de la capacidad diagnóstica de la prueba. La concordancia entre los resultados obtenidos con la prueba diagnóstica y el estado serológico conocido de los individuos, se comparó con el índice Kappa (ver tabla 1) y con la prueba chi cuadrado. La prueba evaluada mostró gran capacidad diagnóstica con niveles de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos de 100%.

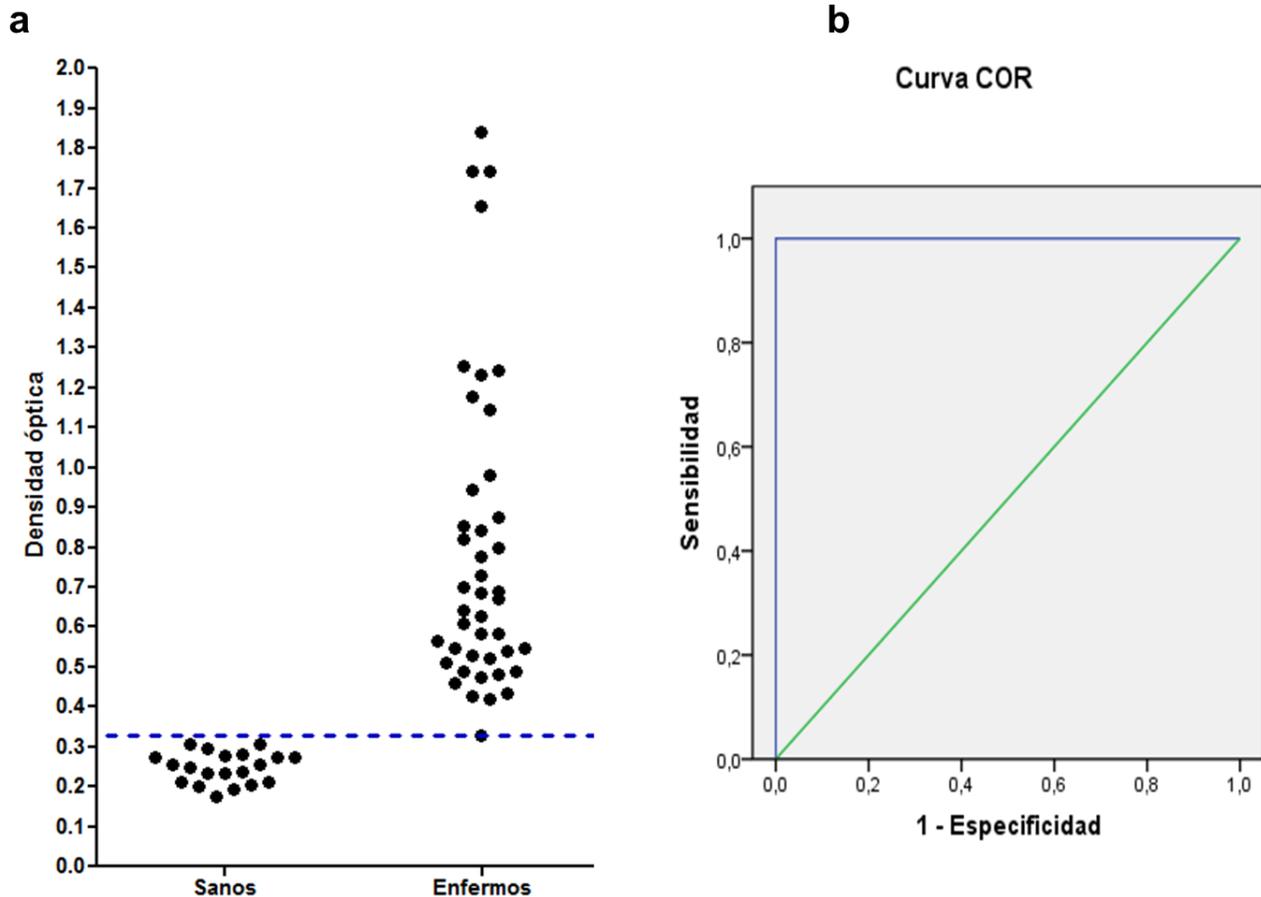


Figura 1. Evaluación de la prueba serológica anti-HBc IgG. 1a. Presencia de anticuerpos específicos contra el core en individuos no expuestos (seronegativos), infectados crónicos (enfermos). 1b. Curva operador-receptor (ROC) para el ensayo serológico de anti-HBc IgG, se obtuvo un área bajo la curva de 1 ($p < 0,001$). La evaluación del índice de Youden permitió establecer un valor cutoff de 0,317.

La infección por VHB clásicamente es diagnosticado por la presencia de antígeno de superficie circulante (HBsAg) y la presencia de anticuerpos contra el core (anti-HBc). El anti-HBc aparece durante la fase aguda y persiste por el resto de la vida, mientras que el HBsAg desaparece asociado a la aparición de anticuerpos anti-HBsAg, conforme el individuo puede eliminar y controlar la infección (11). Así la detección del anti-HBc en combinación con estos marcadores se ha convertido en una herramienta útil de exposición e infección por el VHB (12), de hecho la presencia de anti-HBc en ausencia de HBsAg, permite la identificación de pacientes con infección oculta (13), de ahí la importancia de contar con un ensayo serológico que permita la diferenciación de individuos expuestos versus los no expuestos. La importancia de detectar los títulos de IgG anti-HBc radican en evidencias recientes que indican que los niveles de anticuerpos anti-HBc reflejan la especificidad de la

inmunidad adaptativa y en los individuos infectados crónicos pudiera predecir la respuesta terapéutica (14) y es un fuerte predictor de la seroconversión al HBeAg (15), por lo que se hace necesario contar con ensayos que permitan cuantificar los niveles de anticuerpos y así contar con una herramienta que permita predecir la evolución durante la infección crónica.

Basados en los resultados se procedió al análisis de dos grupos indígenas y mestizos ubicadas en dos poblaciones del estado Mérida asentadas en Guayabones y en la Azulita. En nuestro país, la población indígena está conformada por 724592 personas (según los resultados del censo de población y vivienda realizado en el año 2011) (16) de las cuales 2103 se encuentran en el territorio del estado Mérida, fundamentalmente en la zona de la costa oriental del Lago de Maracaibo; la mayoría (60%) de esta población indígena pertenece a la etnia Wayuu seguida de la Timote/Timotocuica (13%) y 20 etnias minoritarias. En

Tabla 1. Evaluación de los parametros de Validez y Seguridad de la prueba IgG anti-HBc del virus de la hepatitis B

Cuadro de contingencia para la evaluación de la prueba IgG anti-HBc del virus de la hepatitis B				
		Estado serológico (Murex anti-HBc total test)		
		Hepatitis B +	Hepatitis B -	Total
Prueba casera ELISA IgG anti VHB core	Positivo	43	0	43
	Negativo	0	20	20
Total		43	20	63

Validez y Seguridad de la prueba IgG anti-HBc del virus de la hepatitis B	
Parámetro	Valor (IC95%)
Sensibilidad	100% (92-100%)
Especificidad	100% (83-100%)
Valor predictivo positivo	100% (92-100%)
Valor predictivo negativo	100% (83-100%)

IC95%: intervalo de confianza del 95%. La evaluación de la concordancia entre la técnica y los valores conocidos mostró un índice Kappa de 1 asociado a un valor de chi cuadrado estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

este trabajo se determinó la presencia de anticuerpos contra el core en dos comunidades de población indígena, la primera ubicada en el Municipio Obispo Ramos de Lora del estado Mérida, la Ranchería, a 40 minutos de Guayabones; la comunidad está conformada por una población mixta (Wayuu y mestizos) estructurada en 116 familias, con una población aproximada de 1000 habitantes. La segunda comunidad es aledaña a la Azulita en el Municipio Andrés Bello del Estado Mérida, sector “El limón”, en donde hay gran confluencia de personas provenientes de Colombia (refugiados víctimas del conflicto armado)

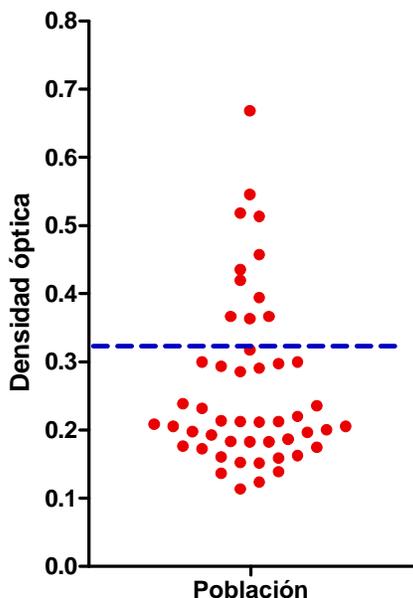


Figura 2. Presencia de anticuerpos específicos contra el core en la población indígena Wayuu y mestizos. Se determinó, en la población estudiada, una prevalencia de seropositividad para IgG anti-HBc de 22% (11/49).

y de la etnia Wayuu.

Una vez estandarizado y validado los ensayo caseros para la detección de IgG anti core se procedió a analizar los sueros de 49 individuos de la etnia Wayuu y mestizos asentadas en el estado Mérida (figura 2). Se muestran las densidades ópticas obtenidas en individuos provenientes de la población indígena discriminados según el punto de corte. Se evidencia una seroprevalencia del 22% de anticuerpos anti-HBc IgG. Estudios previos han reportado alta endemidad por el VHB en grupos indígenas de América del Sur, sin embargo su distribución es diferente según el grupo étnico evaluado. Por ejemplo, en el caso de los indígenas Waorani de Ecuador se evidenció una seroprevalencia del 14 al 54% a través de la determinación del HBsAg (17), mientras que en los indígenas Yanomami del Estado Amazonas, Venezuela, la seroprevalencia es de un 68,4% y del 17,3% en el caso de los Piaroa (18, 19). En el caso de las etnias Yuca y Bari de la Sierra de Perijá, la seroprevalencia se ubica por encima del 60% (20). Y en la comunidad indígena Japreira medido a traves de la detección del anti-HBc fue del se ubicó alrededor del 75%. En el caso de la etnia Wayuu no se encuentran reportes en la literatura sobre la seroprevalencia, y en este caso su comportamiento es muy similar al observado en los residentes de la Amazonia Brasileña (6, 7).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: CDCHTA-ULA M-1049-13-07-A, FONACIT 2013001759 y FONACIT 201500032.

Referencias

- Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015; 386: 1546-55. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Toita R, Kawano T, Kang JH, Murata M. Applications of human hepatitis B virus preS domain in bio- and nanotechnology. *World J Gastroenterol*. 2015; 21: 7400-11. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist*. 2010; 15 (Suppl 4): 5-13. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Epidemiological update of hepatitis B, C and delta in Latin America. *Antivir Ther*. 2013; 18(3 Pt B): 429-33. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Cabezas C, Suárez M, Romero G, Carrillo C, García M, Reátegui J, Vallenar F, Torres L. Hiperendemicidad de hepatitis viral B Delta en pueblos indígenas de la Amazonia peruana. 2006. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2006; 23: 114-22. [[Google Scholar](#)]
- Braga WS, Brasil LM, de Souza RA, Castilho Mda C, da Fonseca JC. The occurrence of hepatitis B and delta virus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian western Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34: 349-55. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Ferreira A, Greca D, Tavares E, Moriya Y, Spelling F, Boeira M, Dos Santos S, de Messias-Reason I. Seroepidemiology of hepatitis B and C in Kaingang Indians in the south of Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2006; 20: 230-5. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Li YW, Yang FC, Lu HQ, Zhang JS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. *World J Gastroenterol*. 2016; 22: 1943-52. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang*. 2004; 86: 83-91. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Olotu AA, Oyelese AO, Salawu L, Audu RA, Okwuraiwe AP, Aboderin AO. Occult Hepatitis B virus infection in previously screened, blood donors in Ile-Ife, Nigeria: implications for blood transfusion and stem cell transplantation. *Virology*. 2016; 13: 76. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, Moyer LA, Bell BP, Alter MJ; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep*. 2005 Dec 23; 54: 1-31. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, Hess G, Hüdig H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol*. 2000; 62: 450-5. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Balderas-Rentería I, Muñoz-Espinosa LE, Déctor-Carrillo MA, Martínez-Martínez FJ, Barrera-Saldaña HA. Detection of hepatitis B virus in seropositive and seronegative patients with chronic liver disease using DNA amplification by PCR. *Arch Med Res*. 2002; 33: 566-71. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Yuan Q, Song LW, Liu CJ, Li Z, Liu PG, Huang CH, Yan Y, Ge SX, Wang YB, Peng CY, Zhang J, Kao JH, Chen DS, Chen PJ, Xia NS. Quantitative hepatitis B core antibody level may help predict treatment response in chronic hepatitis B patients. *Gut*. 2013; 62: 182-4. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Fan R, Sun J, Yuan Q, Xie Q, Bai X, Ning Q, Cheng J, Yu Y, Niu J, Shi G, Wang H, Tan D, Wan M, Chen S, Xu M, Chen X, Tang H, Sheng J, Lu F, Jia J, Zhuang H, Xia N, Hou J; Chronic Hepatitis B Study Consortium. Baseline quantitative hepatitis B core antibody titre alone strongly predicts HBeAg seroconversion across chronic hepatitis B patients treated with peginterferon or nucleos(t)ide analogues. *Gut*. 2016; 65: 313-20. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Instituto Nacional de Estadística de la República Bolivariana de Venezuela. Censo 2011. Caracas; febrero 2012. [[Google Scholar](#)]
- Manock SR, Kelley PM, Hyams KC, Douce R, Smalligan RD, Watts DM, Sharp TW, Casey JL, Gerin JL, Engle R, Alava-Alprecht A, Martínez CM, Bravo NB, Guevara AG, Russell KL, Mendoza W, Vimos C. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 63(3-4): 209-13. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Devesa M, Pujol FH. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. *Virus Res*. 2007; 127: 177-84. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- 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 Int Health*. 2010; 15: 924-33. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- Blitz-Dorfman L, Monsalve F, Atencio R, Porto L, Monzon M, Favorov MO, Fields HA, Pujol FH, Echevarría JM. Serological survey of markers of infection with viral hepatitis among the Yukpa Amerindians from western Venezuela. *Ann Trop Med Parasitol*. 1996; 90: 655-7. [[PubMed](#)]

Como citar este artículo: Márquez-Toro Y, Bastidas-Azuaje MA, Teran-Angel G, Silva-Gutiérrez N, Colmenares M, Marquez-Miranda M, Bellorin AV, Volcanes I, Guzman-Escalona Y, Calderón A, Cantor-García A, Salmen S. Desarrollo de un ensayo casero para la detección de IgG contra el core del virus de la Hepatitis B. *Avan Biomed* 2016; 5: 167-72.