

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
"PEDRO KOURI"
IPK

DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA

*"Desarrollo y aplicación de ensayos
inmunoenzimáticos al diagnóstico y la investigación
en hepatitis A"*

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN DEL GRADO CIENTÍFICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Autor: Dra. Licel de los Angeles Rodríguez Lay

Asesores: Prof. Susana Vázquez Ramudo, Dr C.
Prof. Pedro Más Lago, Dr C.

Ciudad de La Habana
2004

A mi hijo Fernando Javier.

“El deber debe cumplirse sencilla y naturalmente. No a un torneo literario... no a recoger el premio de pasados y presentes dolores...no a hacer destemplada gala de entusiasmo y consecuencias personales, sino a animar con la buena nueva la fe de los creyentes, a exaltar con el seguro raciocinio la vacilante energía de los que dudan, a despertar con voces de amor a los que duermen, a llamar al honor severamente a los que han desertado su bandera. . .”

José Martí

AGRADECIMIENTOS.

La confianza, la tenacidad y los sueños han hecho posible la culminación de este trabajo, comenzado hace 15 años. Muchas personas de una manera u otra permitieron que se desempeñara adecuadamente. Quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido a mi formación profesional, humana e integral. Sin ellas no hubiera sido posible este trabajo, presentado hoy en opción al grado de Doctor en Ciencias Médicas. Muchas gracias a:

- Mis asesores Dres. Susana Vázquez y Pedro Más, ejemplos de honestidad e idoneidad en la investigación científica.
- A la Dra. María G. Guzmán, por ser ejemplo en la investigación científica.
- A los Dres. Mijail Balayan y Yuri Kuzov del Instituto de Poliomiélitis y Encefalitis Virales, por su asesoramiento y la donación de reactivos biológicos.
- A mis compañeros actuales del laboratorio de Hepatitis del IPK: Marité, Cary, Aidonis y Susel y a los pasados: Rosita, Itriam, Dayami, Melkis, Anelle y Raisa, que han sido parte importante en la obtención de los resultados aquí presentados.
- A los Dres. Graciela Delgado, Manuel Díaz y a los médicos responsables del Programa de Hepatitis virales a nivel provincial.
- A los compañeros del Laboratorio de Diagnóstico Viroológico: Angelita, Yahisel, Carina y Deneb, por su participación en la obtención de los resultados.
- A todos los compañeros del Departamento de Virología, profesionales y técnicos que han contribuido a mi formación profesional.
- A los compañeros del Laboratorio de Cultivo de Células, por la ayuda prestada.
- A los compañeros de Docencia y Biblioteca.
- A los compañeros de Epidemiología y Cómputo por la ayuda brindada en el procesamiento de los resultados, especialmente al Lic. Alberto Bali.
- A mis padres Liliana y Misael y a mis hermanos y sobrinos.
- A Edgar J. Guadis Salazar.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido ribonucleico	ARN
Alanina amino transferasas	ALAT
Albumina Bovina Sérica	BSA (del inglés)
American Type Culture Collection	ATCC
Antígeno de superficie de la hepatitis B	HBsAg
Aspartato amino transferasas	ASAT
Células asesinas naturales	NK (del inglés)
Center for Disease Control	CDC
Centro de Inmunoensayo	CIE
Citomegalovirus	CMV
Coefficiente de sedimentación	CS
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC (del inglés)
Densidad óptica	DO
Efecto citopático	ECP
Ensayos inmunoenzimáticos	EIE
Enzyme Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Factor Reumatoideo	FR
Fallo hepático fulminante	FHF
Fijación del complemento	FC
Fosfatasa alcalina	FA
Hemaglutinación por inmunoadherencia	HIA
Hepatitis viral aguda	HVA
Índice Kappa	K
Inmunomicroscopía electrónica	IME
Instituto de Gastroenterología	IGE
Lactato deshidrogenasa	LDH
Línea celular de Riñón de mono verde africano	BGMK
Línea celular de Riñón de mono verde africano	BS-C-1
Línea celular de Riñón de mono verde africano	AGMK
Línea celular Diploide de Pulmón humano	MRC-5
Línea celular de hepatoma humano	PLC/PRF/5
Línea celular de Riñón de mono <i>Rhesus</i> Fetal	FRhK4
Marco abierto de lectura	MAL

Medio Esencial Mínimo + Dulbecco	MEM-D
Microscopía electrónica	ME
Ministerio de Salud Pública	MINSAP
No codificante	NC
Organización Mundial de la Salud	OMS
Ortofenilendiamina	OPD
Radioinmunoanálisis	RIA
Razón de Probabilidad Negativo	RP-
Razón de Probabilidad Positivo	RP+
Reacción en cadena de la polimerasa	RCP
Suero fetal bovino	SFB
Suero humano negativo	SHN
Tampón fosfato-salino + Tween 20	PBS-T
Tampón fosfato-salino.	PBS
Temperatura ambiente	TA
Test:Negative	T:N
Titulo Promedio Geométrico	TPG
Valor predictivo negativo	VPN
Valor predictivo positivo	VPP
Virus de la hepatitis A	VHA
Virus de la hepatitis B	VHB
Virus de la hepatitis C	VHC
Virus de la hepatitis Delta	VHD
Virus de la hepatitis E	VHE
Virus de la hepatitis G	VHG
Virus de la inmunodeficiencia humana	VIH
Virus Epstein Barr	VEB
Virus SEN	SEN-V
Virus transmitido por transfusiones	VTT
World Health Organization	WHO

SÍNTESIS

Se presentan los resultados del desarrollo y la evaluación de ensayos inmunoenzimáticos (EIE) para la detección de marcadores de infección o inmunidad al virus de la hepatitis A (VHA). Los ensayos tipo Captura, Inhibición y Sándwich o de doble anticuerpo, útiles para la determinación de la IgM, IgA sérica, anti-totales y del virus per se, obtuvieron niveles elevados de Sensibilidad, Especificidad y Concordancia, así como, el resto de los parámetros evaluados cuando se compararon con sus respectivos estándares internacionales. Se demostró la utilidad de la muestra de orina en el diagnóstico de brotes epidémicos, en tanto que se confirmó que la IgA secretora no juega un papel preponderante en los mecanismos de inmunidad humoral contra este virus. Se reporta además, la utilidad de la toma de muestra de sangre total adsorbida en papel de filtro para la detección de la IgM. Se destaca la IgM como el marcador universal para el diagnóstico de la infección por este agente, siendo la detección del VHA en heces un marcador poco confiable. El ELISA de Captura de IgM constituyó una herramienta analítica imprescindible en el diagnóstico y la vigilancia de la hepatitis A en nuestro país, permitiendo conocer la etiología de las epidemias de hepatitis viral aguda y el papel de los virus de las hepatitis en el estudio de la mortalidad por fallo hepático fulminante. Los resultados alcanzados permitieron conformar un juego de reactivos para la detección de la IgM anti-VHA en muestras de sueros y la extensión del diagnóstico a otras regiones del país. Nuestros resultados refuerzan la utilidad de los EIE en el diagnóstico, la investigación y la vigilancia de la hepatitis A.

INDICE

	<i>Página</i>
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes.	1
2 Hipótesis de trabajo.	2
3 Objetivos.	2
4 Novedad científica.	3
5 Valor teórico y práctico.	3
6 Publicaciones científicas donde se han presentados los resultados de la tesis.	4
7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis.	4
CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
II.1. Hepatitis viral. Concepto.	6
2. Historia de la hepatitis A.	
6	
3. Agente infeccioso: el VHA.	7
3.1. Clasificación y comparación con otros virus.	7
3.2. Cepas y genotipos.	7
3.3. Morfología y propiedades físico-químicas.	9
3.4. Genoma y proteínas.	9
3.5. Antígenos y estructura antigénica.	11
3.6. Estabilidad.	11
3.7. Replicación viral.	12
3.8. Propagación en cultivos celulares.	13
3.9. Rango de hospederos e infección experimental en humanos.	14
II.4. La enfermedad: hepatitis A.	15
4.1. Patogénesis.	15
4.2. Patología.	16
4.3. Respuesta inmune.	17
4.4. Cuadro clínico.	
19	
4.5. Tratamiento.	20
II.5. Diagnóstico de laboratorio.	21
5.1. Laboratorio clínico.	21
5.2. Laboratorio virológico.	
22	
5.2.1. La orina como muestra útil en el diagnóstico y la investigación.	25
5.2.2. La saliva como muestra útil en el diagnóstico y la investigación.	26
5.2.3. Inmunoensayo ligado a enzimas.	27
5.2.3.1. Generalidades.	27
5.2.3.2. Conceptos para la evaluación de los resultados en los EIE.	29
5.2.3.3. Cuantificación de anticuerpos mediante ELISA.	32
5.2.3.4. Técnicas para la representación y ajuste de los datos experimentales.	32
5.2.4. La Biología Molecular aplicada al estudio del VHA.	
32	

II.6. Epidemiología.	34
6.1. Epidemiología molecular.	35
6.2. Prevención de la infección del VHA.	36
6.3. Vigilancia de la hepatitis A.	38
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	40
III.1. Línea celular, cepas y anticuerpos.	40
1.1. Línea celular.	40
1.2. Virus.	40
1.3. Preparación del antígeno de la hepatitis A para ELISA.	40
1.4. Inmunoglobulinas de recubrimiento.	41
1.5. Preparación de los conjugados	41
III.2. Ensayos tipo ELISA.	42
2.1 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Captura de anticuerpos IgM-VHA	42
2.1.1. Utilizando como antígeno la cepa de referencia HAS-15.	42
2.1.2. Utilizando como antígeno la cepa cubana M2 clon C5.	45
2.1.3. Reducción de los tiempos de incubación del ELISA IgM-VHA.	45
2.1.4. Toma de muestra de sangre absorbida en papel de filtro para la detección de IgM-VHA.	46
2.1.5. Aplicación del ELISA IgM-VHA al diagnóstico y la vigilancia de la hepatitis viral.	48
2.2. Detección de IgM anti-VHA en muestras de orina.	48
2.3. Detección de IgA anti-VHA en muestras de suero (IgA sérica) y en saliva (IgA secretora).	49
2.4. Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Inhibición para la detección de anticuerpos totales contra el VHA.	50
2.5. Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA tipo Sándwich o de doble anticuerpo para la detección del VHA en muestras clínicas y en cultivos celulares.	53
2.6. Conformación de un juego diagnóstico para la detección de IgM-VHA en muestras de suero.	55
2.6.1. Preparación de los reactivos.	55
2.6.2. Descentralización del diagnóstico.	56
III.3. Otras técnicas comerciales utilizadas en el estudio.	56
III.4. Aspectos éticos de la investigación.	56
III.5. Procesamiento estadístico general de los resultados.	57
III.6. Diagrama de flujo.	58
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	59
IV.1 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Captura para la detección de anticuerpos IgM contra el VHA.	59
1.1 Evaluación del ELISA de Captura de IgM utilizando como antígeno	

la cepa de referencia HAS-15.

59

1.2 Evaluación del ELISA de Captura de IgM utilizando como antígeno
la cepa M2 clon C5.

65

1.3 Reducción de los tiempos de incubación del ELISA IgM-VHA (24 horas)	67
1.4 Toma de muestra de sangre adsorbida en papel de filtro para la detección de IgM-VHA.	69
1.5 Aplicación del ELISA IgM-VHA al diagnóstico y la vigilancia de la hepatitis viral.	71
IV.2 Detección de IgM anti-VHA en muestras de orina.	
75	
IV.3 Detección de IgA anti-VHA en suero (IgA sérica) y en saliva (IgA secretora).	83
IV.4 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Inhibición para la detección de anticuerpos totales contra el VHA.	89
IV.5 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA tipo Sándwich o de doble anticuerpo para la detección del VHA en muestras clínicas y en cultivos celulares.	
96	
IV.6 Conformación y evaluación de un juego de reactivos para la detección de IgM anti-VHA en suero. Descentralización del diagnóstico a otras regiones del país.	103
IV.7 Consideraciones generales.	106
<i>CAPITULO V. CONCLUSIONES.</i>	110
<i>CAPITULO VI. RECOMENDACIONES.</i>	111
<i>CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</i>	112

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes.

La hepatitis A es una enfermedad infecciosa aguda de etiología viral, la cual frecuentemente se manifiesta en forma asintomática o subclínica en niños, sin embargo, suele ser más severa en adolescentes y adultos. Es causada por el virus de la hepatitis A (VHA), el cual se identificó en 1979 y se clasificó dentro del grupo de los Picornavirus, género Hepatovirus. No tiene tratamiento específico y las medidas profilácticas están encaminadas al mejoramiento de las medidas higiénico-sanitarias, la administración de inmunoglobulina estándar y la vacunación (Hollinger y Emerson, 2001).

Cuando se produce una infección por el VHA, se producen una serie de eventos bioquímicos, virológicos e inmunológicos que permiten confirmar el diagnóstico de la hepatitis A. Los anticuerpos tipo IgM, IgA e IgG aparecen tempranamente en el curso de la infección. La IgM se eleva al final del periodo de incubación y típicamente desaparece entre tres y seis meses después del comienzo de los síntomas, siendo considerada el estándar de referencia internacional en el diagnóstico específico del VHA. Este anticuerpo esta presente en más del 99 % de los pacientes en el momento en que solicitan atención médica. La IgA se mantiene elevada por un periodo de 2 años, en tanto que la IgG se mantiene elevada por un periodo largo, confiriendo inmunidad de por vida (Duermeier, 1980, Stapleton, 1995, Lemon, 1997, Koff, 1998).

En Cuba, la hepatitis viral constituye la quinta causa de morbilidad por enfermedades transmisibles, de estas, la hepatitis tipo A es la responsable del 80 al 90 % de los casos reportados. A pesar de poseer una baja letalidad, representa un importante problema de salud con un peso adicional por los cuantiosos gastos que ocasiona. Antes de 1990, el diagnóstico de esta entidad se realizaba en base a criterios clínicos, epidemiológicos y de exclusión con la hepatitis B, de la que sí existía confirmación virológica (MINSAP, Departamento de Estadística Nacional, 2002).

En nuestro país, teniendo en cuenta de que se trataba de un problema de salud nacional, era imprescindible contar con el diagnóstico confirmatorio de esta enfermedad, utilizando ensayos inmunoenzimáticos (EIE). La importación de juegos comerciales o de reactivos biológicos de forma independiente, no constituían opciones factibles y prácticas debido a

su alto costo y heterogeneidad de procedimientos y tecnologías. Por tanto, era necesario desarrollar nuestros sistemas diagnósticos y posteriormente evaluarlos frente a estándares internacionales.

La selección de las variantes utilizadas estuvo condicionada por los reportes previos de la literatura en cuanto a sensibilidad, especificidad y ventajas de cada tipo de ensayo, así como la disponibilidad y calidad de materiales y reactivos en nuestro laboratorio. Entre los más utilizados por las ventajas que ofrecen se encuentran: para la detección de anticuerpos las variantes de Captura e Inhibición, en tanto que para la detección de antígeno, se usa el método Sándwich o de doble anticuerpo.

Tomando como base lo planteado anteriormente nos propusimos la siguiente Hipótesis de trabajo.

1.2 Hipótesis de trabajo.

“Los métodos inmunoenzimáticos tipo Captura, Sándwich e Inhibición, incorporados al Programa Nacional de Hepatitis virales, contribuyen al desarrollo del diagnóstico, la investigación y la vigilancia de la hepatitis A en Cuba”.

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.3 Objetivos

General

Contribuir al desarrollo del diagnóstico, la investigación y la vigilancia de la Hepatitis A en Cuba con la introducción de nuevas técnicas.

Específicos

1. Desarrollar, validar y aplicar un ELISA de Captura de IgM anti-VHA.
2. Determinar si la detección de anticuerpos en muestras de orina es útil para el diagnóstico de la hepatitis A.
3. Desarrollar, evaluar y aplicar un ELISA de Captura para la detección de la IgA anti-VHA sérica y secretora.
4. Desarrollar, evaluar y aplicar un ELISA de Inhibición para la detección de anticuerpos totales anti-VHA.
5. Desarrollar, evaluar y aplicar un ELISA tipo Sándwich o de doble anticuerpo para la detección del VHA en muestras clínicas de heces y en cultivos celulares.

6. Conocer si los reactantes que integran el ELISA de Captura de IgM anti-VHA en muestras de sueros mantienen su funcionabilidad en forma de estuche diagnóstico y su utilidad en la descentralización del diagnóstico de la hepatitis A a otras regiones del país.

1.4 Novedad científica.

Por primera vez en nuestro país, se desarrollan y aplican métodos inmunoenzimáticos tipo ELISA (variantes de Captura de IgM, Inhibición y Sándwich o de doble anticuerpo), para el diagnóstico, la vigilancia y la investigación en Hepatitis A. Los reactivos necesarios para la implementación de estas técnicas fueron desarrollados en el laboratorio, utilizando cepas de referencia y aislamientos autóctonos. Se reporta además, la utilidad de las muestras de sangre adsorbidas y conservadas en papel de filtro, y de la saliva y la orina como muestras alternativas en el diagnóstico y la investigación de la hepatitis A.

Se reporta la utilidad de la IgA en suero como marcador diagnóstico y el papel de la IgA secretora en la inmunología de la hepatitis A. Se refuerza la importancia de la IgM en el estudio de brotes de HVA.

Se confirma virológicamente el papel de los virus de las hepatitis en los casos de Fallo Hepático Fulminante recibidas en el laboratorio.

1.5 Valor teórico y práctico.

Estos resultados hicieron posible contar con las herramientas analíticas imprescindibles para el diagnóstico de la hepatitis A. Han posibilitado además, la obtención de un juego de reactivos y la descentralización del diagnóstico a otros lugares del país, con el consiguiente ahorro de divisas.

El uso de EIE han permitido el aislamiento y caracterización de cepas de Hepatitis A autóctonas, que sirvan de base a las pruebas diagnósticas y su posible uso como candidatas a una vacuna inactivada.

Por último, los estudios realizados aportan nuevos conocimientos científicos del comportamiento del virus de la hepatitis A en Cuba, lo cual contribuye a una mejor comprensión y control de la enfermedad.

Los resultados presentados aquí han sido objeto de reconocimientos y premios, se destacan tres *Resultados Relevantes del IPK* (1990, 1997 y 2002), además, *Premio Relevante*

XV Forum Municipal de Ciencia y Técnica y Premio Destacado XV Forum Provincial de Ciencia y Técnica, 2003.

Estos resultados han sido objeto de 6 publicaciones nacionales e internacionales y el capítulo 63 *Hepatitis virales* del libro *Microbiología y Parasitología y Médicas* (Premio de la Crítica Científica-Técnica 2001, Premio Anual de la salud 2002 y Ponencia Relevante del XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica 2003). Además, han sido presentados en 8 eventos científicos nacionales e internacionales.

Los diferentes estudios realizados formaron parte de tres tesis: *Diploma, 1996 y 1997 y Maestría en Virología, 1996*. Además, formaron parte de dos proyectos de investigación "Aislamiento y caracterización de cepas de hepatitis A útiles para la obtención de un candidato vacunal" y *Descentralización del diagnóstico de la hepatitis A a otras regiones del país*, ambos financiados por el MINSAP.

La introducción de nuevas técnicas y herramientas analíticas, ha permitido al Laboratorio de Referencia Nacional de Hepatitis Virales contar con métodos robustos de diagnóstico e investigación que han servido de base para ampliar el conocimiento de la enfermedad.

1.6 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis.

- *Desarrollo y evaluación de un ELISA para la detección de anticuerpos de la clase IgM contra el VHA. Rev Cubana Med Trop 46(2):86-89, 1994. Rodríguez L, Más P, Balmaseda A, Comellas M, Delgado G, Palomera R.*
- *Detección de IgA en suero y saliva en pacientes con Hepatitis A. Rev Cubana Med Trop 46(1):16-19, 1994. Más P, Balmaseda A, Galván E, Rodríguez L, Castillo A.*
- *Toma de muestra en papel de filtro para la detección de IgM antiviral de la Hepatitis A. Rev Cubana Med Trop, 50(1):42-47, 1998. Rodríguez L, Ribas M, Quintero A, Díaz B, Aragón U, Rodríguez C.*
- *Estudio clínico, epidemiológico y virológico de un brote de hepatitis viral. Vaccimonitor, 2:10-13, 2002. Martínez R, Rodríguez L, Díaz B, Ribas MA, Rodríguez C.*
- *Anti-Hepatitis A Virus Immunoglobulin M in Urine Samples for Rapid Diagnosis of Outbreaks. Clin Diag Lab Immunol; 10(3):492-494; 2003. Rodríguez L, Larralde O, Martínez R, Gutiérrez A.*

1.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis.

- *III Congreso Nacional de Higiene y Epidemiología. Cuba, Octubre, 1990. Diagnóstico virológico de la hepatitis A. **Rodríguez L**, Más P, Delgado G.*
- *Seminario Latinoamericano de Infectología. Cuba, Junio, 1992. Diagnóstico serológico de la hepatitis A en 24 horas. **Rodríguez L**, Balmaseda A, Más P. y Detección de IgA sérica específica a hepatitis A. Más P, Balmaseda A, **Rodríguez L**.*
- *IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología y I Congreso Cubano de Medicina Tropical. Cuba, Octubre, 1993. Diagnóstico rápido de la hepatitis A. **Rodríguez L**, Balmaseda A, Más P. y Obtención de un conjugado anti-hepatitis A mediante Superose 12 (FPLC). Aumento 5 veces la dilución de trabajo. Otero A, Balmaseda A, **Rodríguez L**, Más P.*
- *Seminario Latinoamericano de Infectología. I encuentro de Enfermería en Infectología. Cuba, Junio, 1994. Sistemas ELISA para la detección de anticuerpos totales contra el VHA. **Rodríguez L**, Balmaseda A, Más P.*
- *Biotecnología Habana '94. Validación clínica de la prueba IgM anti-VHA. Galván E, Vega H, Más L, Balmaseda A, **Rodríguez L**, Torres N.*
- *V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical. Congreso 60 aniversario IPK. ELISA para la detección y cuantificación de anticuerpos totales contra el VHA. **Rodríguez L**, Larralde O, Díaz B, Aragón U, Sánchez L, Más P.*
- *Biotecnología Habana '97. Detección de IgM a partir de muestras de orina. Resultados preliminares. **Rodríguez L**, Quintana A, Larralde O, Martínez R, Gutiérrez A.*
- *Hepatología 2002. Cuba. Detección de IgM en orina. Cinética y estabilidad. **Rodríguez L**, Quintana A, Larralde O, Martínez R, Gutiérrez A.*

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

II.1 Hepatitis viral. Concepto.

La hepatitis viral es un conjunto de enfermedades clínicamente semejantes entre sí, pero de etiología y epidemiología diferentes, en la cual el hígado es el principal sitio de replicación. Es causada por al menos 5 virus y se nombran: la hepatitis viral tipo A, causada por el VHA, la hepatitis viral tipo B, causada por el virus de la hepatitis B (VHB), la hepatitis viral tipo C, causada por el virus de la hepatitis C (VHC), la hepatitis viral tipo D, causada por el virus de la hepatitis Delta (VHD) y la hepatitis viral tipo E, causada por el virus de la hepatitis E (VHE). Otros virus pueden mostrar marcado hepatotropismo, entre ellos están el virus de la hepatitis G (VHG), el virus TT (VTT) y el virus SEN (SEN-V), los cuales son controversiales. Algunos virus pueden ocasionalmente infectar el hígado: se incluyen al citomegalovirus humano (CMV), el virus Epstein-Barr (VEB), el virus de la rubeola, el virus de la fiebre amarilla, el virus del herpes simple, algunos enterovirus y otros virus exóticos. Por tanto, la hepatitis A es una enfermedad caracterizada por la inflamación aguda del hígado, como consecuencia de la infección por el VHA (Fagan y Harrison, 2000).

II.2 Historia de la hepatitis A.

Las epidemias de ictericia han afectado a la civilización humana durante siglos. La antigua literatura china hace referencia a la ocurrencia de ictericia (Zukerman, 1983), como dice una carta del Papa Zacarías al arzobispo San Bonifacio de Mainz durante el siglo ocho (Migne, 1863). Sin embargo, no fue hasta los siglos 17, 18 y 19 en que la dispersión de los brotes de ictericia es registrada más frecuentemente. La enfermedad fue especialmente común entre los militares (ictericia de campaña) (Weil, 1886).

Los datos aportados por Cockayne en 1912 y las observaciones de Mc Donald en 1908, apuntaron para la etiología viral de la hepatitis infecciosa. En 1923, Blumer resumió los patrones de la enfermedad encontrados en 63 brotes de ictericia epidémica reportados en los Estados Unidos (EE.UU) entre 1812 y 1922.

Estudios epidemiológicos y experimentos en voluntarios realizados durante y después de la Segunda Guerra Mundial, confirmaron la etiología viral y demostraron las diferencias con la ictericia por suero homólogo (Mac Callum et al., 1952, Krugman et al., 1967, Boggs et al., 1970). En 1947, Mc Callum introdujo el término de hepatitis A y B para categorizar

estas enfermedades, los cuales fueron adoptados por el Comité de Hepatitis Viral de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 1973).

Entre el final de la década de los años 50s y principios de los 70s, los estudios de Murray en 1955 y Krugman y col. en 1967 fueron cruciales en la definición futura de las hepatitis A y la B. La cepa MS-1 del VHA fue usada para infectar voluntarios adultos en los cuales la enfermedad fue reproducida (Boggs et al., 1970), y el virus fue identificado por primera vez por inmunomicroscopía electrónica (IME) de sus heces, reportado por Feinstone y col. en 1973. En los siguientes 3 años, inmunoensayos altamente sensibles fueron desarrollados para detectar el antígeno o sus anticuerpos. En 1979, Provost y Hilleman exitosamente cultivaron y pasaron seriadamente el virus en cultivos celulares, un paso importante en el desarrollo futuro de una vacuna.

II.3 Agente infeccioso: el VHA.

II.3.1 Clasificación y comparación con otros virus.

A principios de la década de los 80, el VHA fue provisionalmente clasificado como el enterovirus 72 debido a que sus características biofísicas eran parecidas a los enterovirus y cardiovirus, y sus características bioquímicas semejaban a los enterovirus (Gust et al., 1983). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado varias características que distinguen el VHA de otros picornavirus: La secuencia nucleotídica y aminoacídica son diferentes a otros picornavirus, así como el tamaño de algunas proteínas (Cohen et al., 1987). Dificultad del VHA de adaptarse a crecer en cultivos celulares, replicación lenta y ausencia de efecto citopático (ECP) (Daemer et al., 1981). El VHA es resistente a temperaturas y drogas que inactivan muchos picornavirus (de Chastonay y Siegl, 1988). El VHA es estable a pH 1 (Scholz et al., 1989). El VHA tiene un serotipo único y un sólo sitio neutralizante, el cual es inmunodominante (Lemon et al., 1987). Un anticuerpo monoclonal específico a enterovirus no reacciona con el VHA (Yousef et al., 1987).

El VHA es un miembro único de la familia Picornaviridae, resultando en su clasificación como un nuevo género: Hepatovirus (Wimmer y Murrin, 1991).

II.3.2 Cepas y genotipos.

Las cepas mejor caracterizadas del VHA incluyen HM175 (Australia, 1976), CR326 (Costa Rica, 1960), MS-1 (Nueva York, 1964), SD11 (California, 1974), HAS-15 (Arizona, 1979), MBB (norte de África, 1978), GBM (Alemania, 1976) y PA21

(procedente de un mono lechuza de Panamá, 1980). Estas cepas han sido distinguidas basándose en sus características de crecimiento o genómicas (Cohen et al., 1987, Lemon et al., 1987, Tsarev et al., 1991, Robertson et al., 1992, Graff et al., 1994).

Las únicas variantes antigénicas conocidas del VHA, son cepas aisladas de monos del viejo mundo, que presentan sustituciones de aminoácidos en VP3 y VP1 (Tsarev et al., 1991). Esto sugiere la posibilidad de sitios antigénicos relacionados con el rango de hospederos (Lemon et al., 1992, Ping y Lemon, 1992).

Una región de 168 pares de bases que rodea la unión de la 1D (VP1) y el gen 2A (VP1/2A) fue escogida para el análisis de la diversidad genética entre cepas de VHA. Se han designado siete genotipos con una diversidad genética de un 15 a un 20 %. Los genotipos I y III fueron a su vez divididos en sub-genotipos (A y B), que difieren en un 7.5 % (Robertson et al., 1992). La mayoría de las cepas humanas de referencia fueron caracterizadas como genotipo I: CR326, MS-1, SD11, HAS-15 (sub-genotipo IA) y HM175 y MBB (sub-genotipo IB) (Lemon y Robertson, 1993).

Al genotipo IA pertenece la mayoría de las cepas estudiadas e incluye cepas distribuidas ampliamente en el mundo: Norte, Centro y Sur de América, Cuba, China, Japón, Corea, Europa, Tailandia y Sudáfrica. El resto de las cepas parece estar más disperso con respecto a su origen geográfico. El genotipo IB contiene cepas aisladas en Jordania, Norte y Sur de África, Australia, Europa, Japón, China y Sur América, sin embargo, la mayoría se aislaron en lugares cerca del Mediterráneo. El genotipo III representa a la mayoría de las cepas restantes, en el genotipo IIIA se encuentran cepas provenientes de la India, Sri Lanka, Nepal, Malasia, Suecia, Estonia y EUA, así como la cepa procedente de los simios PA21. En el genotipo IIIB se incluyen cepas de Japón y Dinamarca (Robertson et al., 1992, Díaz et al., 1999, Díaz et al., 2001, Mbayed et al., 2002, Sánchez et al., 2002, Theanboonlers et al., 2002, Chironna et al., 2003, Tallo et al., 2003).

Los genotipos II y VII están representados cada uno por una sola cepa, el genotipo II por una cepa aislada en Francia, en 1979 (CF-53) y el VII contiene una cepa aislada en Sierra Leona, en 1988 (SLF-88). Los genotipos IV, V y VI están representados cada uno, por una cepa aislada de especies de monos del Viejo Mundo (Robertson et al., 1992, Ching et al., 2002).

Estudios filogenéticos han revelado la existencia de 5 linajes genéticos diferentes y evidencias de recombinación en poblaciones naturales del VHA (Costa-Mattioli et al., 2002a, Costa-Mattioli et al., 2003).

II.3.3 Morfología y propiedades físico-químicas.

El VHA es un virus no envuelto, de 27 a 32 nm de diámetro, morfológicamente indistinguible de otros picornavirus. Por microscopía electrónica (ME), se observan partículas esféricas llenas y vacías de simetría icosaédrica (Figura 1) (Lemon y Robertson, 1993).

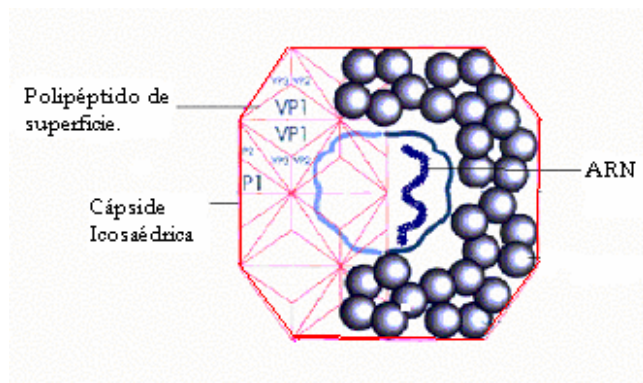


Figura 1: Virus de la hepatitis A.

El VHA posee una densidad de flotación (DF) de 1.32 a 1.34 g/cm³ en CsCl y un coeficiente de sedimentación (CS) de 156 a 160S. Una población menor de partículas sedimenta a 130S, aunque su infectividad no es conocida y pueden corresponderse a proviriones (Ruchti et al., 1991, Bishop y Anderson, 1993).

II.3.4 Genoma y proteínas.

El virión está compuesto por un genoma de ácido ribonucleico (ARN) lineal, de tira única y de sentido positivo, de 7.5 kb de longitud. El ARN del VHA sedimenta a 33S y tiene una DF de 1.64 g/cm³ (Lemon y Robertson, 1993).

El genoma del VHA puede dividirse en tres partes: una región 5' no codificante (NC), que comprende aproximadamente el 10% del genoma, la cual está covalentemente unida al extremo 5' de la proteína viral VPg (2.5 kD); un marco abierto de lectura (MAL) que codifica para una poliproteína de aproximadamente 2235 aminoácidos, con regiones o dominios designados como P1, P2 y P3 que contienen proteínas individuales que son postraduccionalmente clivadas y darán origen a las proteínas estructurales (P1) y no estructurales (P2 y P3); y una pequeña región NC en el extremo 3' el cual está

poliadenilado. Las regiones NC 5' y 3' comprenden 734 y 64 bases respectivamente (Figura 2) (Lemon y Robertson, 1993).

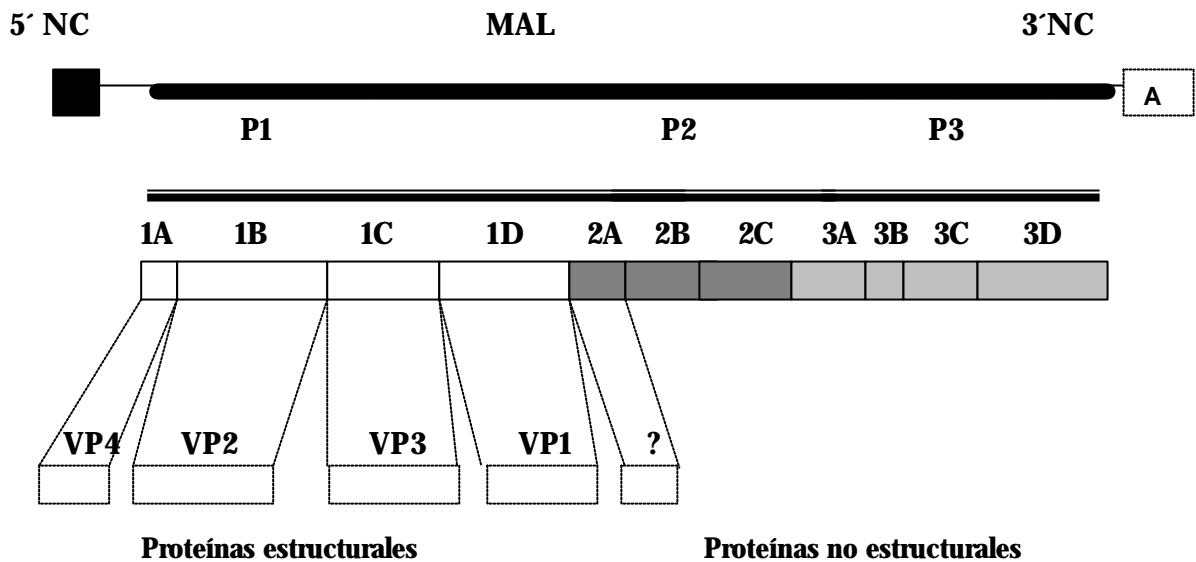


Figura 2: Estructura genómica del VHA.

La región 5' NC parece ser la más conservada entre cepas de los genotipos I, II y III. Las mutaciones en esta región amplifican la adaptación del VHA para crecer en cultivos celulares y no se conoce si juega un rol en la determinación de la virulencia (Emerson et al., 1992). La región 3' NC posee una alta proporción de diferencias (hasta un 20 %) entre cepas de VHA y mutantes. Poco se conoce acerca del efecto de estos extremos en la síntesis del ARN de los picornavirus, pero se conoce que juega un papel importante (Agol, 1991).

El dominio P1 contiene varias regiones: 1A, 1B, 1C y 1D. Las proteínas maduras de la cápside son las formas predominantes en los viriones. Tres de las proteínas de la cápside VP1 (1D; 30 a 33 kD), VP2 (1B; 24 a 30 kD) y VP3 (1C; 21 a 28 kD) han sido identificadas. Todos los otros picornavirus contienen una proteína significativamente más pequeña: la VP4 (1A) que es generada por el clivaje de VPO (1AB; 27 a 31 kD) dando VP4 (1A) y VP2 (1B) en el último paso del ensamblaje siguiendo a la descapsidación del ARN del virión. Basado en estudios con otros picornavirus, se ha asumido que el VHA contiene 60 copias de cada uno de las 3 proteínas mayores VP1, VP2 y VP3 (Lemon y Robertson, 1993, Totsuka y Moritsugo, 1999).

Las cápsides vacías del VHA contienen VPO, que es ligeramente mayor que la VP2 encontrada en los viriones completos, indicando que hay un evento de clivaje similar en el ensamblaje del VHA. Sin embargo, la proteína con la talla esperada para VP4 no ha sido encontrada. Si existe, esta es mucho más pequeña (Totsuka y Moritsugo, 1999).

Se conocen las funciones de algunas proteínas no estructurales; la proteína 2A es requerida para la pentamerización de los precursores de los polipéptidos, y por tanto para el primer paso del ensamblaje (Rachow et al., 2003). La proteína 2C tiene función en la transcripción del ARN y la 3C es una proteasa que rompe las uniones entre proteínas maduras del virus en la proteína precursora. La proteína 3AB parece corresponder con el precursor de la VPg, y puede estar implicado directamente en la replicación viral, mientras que 3D es la polimerasa del ARN viral (Beneduce et al., 1999, Bergmann et al., 1999, Hollinger y Emerson, 2001). Reportes recientes imputan a la región VP1/2A y 2C como responsables de la virulencia (Emerson et al., 2002).

II.3.5 Antígenos y estructura antigénica.

Los antígenos del virión intacto son altamente conformacionales y generalmente diferentes de aquellas proteínas aisladas del virus. Los virus purificados producen elevación de anticuerpos neutralizantes anti-VHA y anticuerpos a las proteínas desnaturalizadas de la cápside. En contraste, anticuerpos a proteínas purificadas de la cápside o a péptidos sintéticos poseen débil o no detectable actividad neutralizante. Se ha reportado respuesta a péptidos encapsulados en liposomas o acoplados a hemocianina (Haro et al., 1995). Pentámeros 14S y cápsides vacías 70S del VHA han inducido anticuerpos neutralizantes (Sánchez et al., 2003). Las cápsides vacías parecen ser antigénicamente indistinguibles de los viriones infecciosos (Lemon, 1997).

La estructura antigénica del VHA es relativamente simple, con un número restringido de una combinación de epítomos que se superponen para formar un sitio antigénico dominante (Lemon, 1997). El epítomo del VHA que estimula la formación de anticuerpos protectores es un sitio tridimensionalmente conformado por la yuxtaposición de zonas de las proteínas VP1 y VP3 (Ping y Lemon, 1992).

II.3.6 Estabilidad

El VHA es estable al tratamiento con ácidos, reteniendo la infectividad por más de 8 horas. El VHA es además, resistente al éter al 20 %, cloroformo, Freón y triclorotrifluoroetano (Provost y Hilleman, 1979, Scholz et al., 1989).

El VHA es resistente al calor. La integridad y la antigenicidad viral no son afectadas a 60 °C a pH neutral durante 60 minutos. El virus es parcialmente inactivado después de 10 a 12 horas expuesto a esta temperatura. Cuando se estabiliza con MgCl 1M, la desintegración ocurre a 81 °C, con la generación de cápsidas vacías que retienen la antigenicidad. Esta propiedad se pierde a 87 °C (Hollinger y Emerson, 2001).

La infectividad puede preservarse por al menos 1 mes en estado seco y guardado a - 25 °C con humedad de un 42 %. El VHA sobrevive desde días hasta meses en agua fresca contaminada experimentalmente, agua de mar, aguas residuales, sedimento marino y ostras vivas (Hollinger y Emerson, 2001, Fiore, 2004).

El VHA no se inactiva con cloramina-T (1 g/L durante 15 minutos a 20 °C) o ácido percloroacético (300 mg/L durante 15 minutos a 20 °C) (Hollinger y Emerson, 2001).

El VHA se inactiva por autoclave (121 °C durante 20 minutos), por radiación ultravioleta (1.1 W a una profundidad de 0.9 cm durante 1 minuto), por formalina (1:4 000 durante 72 horas a 37 °C), por β -propiolactona (0.03% durante 72 horas a 4 °C), por permanganato de potasio (30 mg/L durante 5 minutos), por Yodo (3 mg/L durante 5 minutos), o por cloro (10 – 15 partes por millón durante 15 minutos) o compuestos que contienen cloro, como el hipoclorito de sodio, 3 a 10 mg/L a 20 °C durante 5 a 15 minutos. La infectividad del VHA decrece sustancialmente por etanol al 70 % a 25 °C (reducción de 2.25 y 5.5 \log_{10} después de una exposición durante 3 y 60 minutos respectivamente) (Hollinger y Emerson, 2001, Li et al., 2002, Xin et al., 2002). El VHA es altamente resistente a varios desinfectantes comerciales, necesiándose altas concentraciones del ingrediente activo (Jean et al., 2003).

II.3.7 Replicación viral

El evento inicial del proceso de replicación del VHA es la unión del virus a su receptor, que posiblemente pueda ser una β -2-macroglobulina, localizado en la membrana plasmática de la célula hospedera (Zajac et al., 1991); se ha identificado además, una glicoproteína en células AGMK, que pudiera ser un receptor para el VHA (Kaplan et al., 1996). Este evento requiere de

la presencia de Ca^{2+} . Posteriormente se produce la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula que involucra la pérdida de la proteína VP4 y la separación del ARN de la cápside, proceso conocido como descapsidación (Bishop y Anderson, 1997, Racaniello, 2001).

La fase de eclipse es incompleta, probablemente debido a una replicación asincrónica. A continuación comienza la replicación viral. Una vez liberado el ARN de sentido positivo, este es amplificado a través de un intermediario de cadena negativa. El proceso de replicación se lleva a cabo en dos fases: la primera involucra la copia de la cadena de ARN positiva en una cadena negativa y la segunda utiliza esta cadena negativa para la síntesis posterior de ARN de cadena positiva. El ARN mensajero viral debe ser traducido de forma independiente, lo cual sucede por intermedio de un mecanismo interno de unión al ribosoma, que involucra la subunidad 40S. Las proteínas aparecen en la célula infectada de acuerdo con su ubicación 5'-3' en el genoma como una gran poliproteína. Esta es procesada proteolíticamente, mientras se sigue formando, para originar un precursor de P1, P2 y P3. Esta última (P3) se autoprocresa para originar tres pequeñas proteínas: una proteinasa (3C), requerida para el procesamiento posterior del resto de las proteínas; la proteína 3AB, que origina la Vpg necesaria para el inicio de la síntesis del ARN viral y la polimerasa de ARN (3D) (Johnson y Sarnow, 1995, Lemon, 1997, Racaniello, 2001).

Finalmente, con el incremento de la concentración de proteínas y la de ARN+, estas moléculas son empaquetadas en el virión, conjuntamente con el proceso de ensamblaje de las subunidades proteicas. La formación de la partícula infectiva tiene lugar por un proceso de maduración, en el cual la mayoría de la VPO es transformada en VP4 y VP2. Este proceso es favorecido por un pH bajo, el cual induce cambios conformacionales y ayuda a la escisión de VP0 (Bishop, 1999). Así la forma madura consta de cuatro sub-unidades formadas por VP4, VP2, VP3 y VP1, lo cual es característico de todos los miembros de la familia Picornaviridae (Racaniello, 2001).

II.3.8 Propagación en cultivos celulares.

En 1979, Provost y Hilleman propagaron exitosamente el VHA en cultivos primarios de explantes de hígado de monos marmosets (*Saguinus labiatus*) y en líneas celulares de riñón de mono *Rhesus* fetal, *Macaca mulatta* (FRhK6). Se han usado células primarias de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops* (AGMK), de fibroblastos humanos y continuas de pulmón diploide humano (MRC-5), esta última debido a su disponibilidad como

sustrato potencial para la producción de vacunas. Las líneas celulares derivadas de AGMK (BS-C-1, Vero y BGMK), riñón de mono *Rhesus* fetal (FRhK4, FRhK6, Frp/3) y hepatoma humano (PLC/PRF/5 ó línea Alexander) han sido ampliamente usadas para estudiar la replicación y propagar grandes cantidades de virus. Células derivadas de curiel, delfín y cerdo también permiten la replicación del VHA. Sin embargo, el VHA es difícil de adaptar y crecer "in vitro", requiriendo varias semanas y pases ciegos. La progenie se recupera mediante lisis mecánica de las células (Flehmig, 1980, Daemer et al., 1981, Dotzauer et al., 1994). Se ha sugerido que el mecanismo responsable del ciclo replicativo lento del VHA es debido a la pobre habilidad de traducción del ARN viral (Silveira Corneiro et al., 1998).

El VHA posee escaso o no discernible ECP. Las alteraciones ultraestructurales observadas en células BGMK se localizan en el Reticulo Endoplasmático y la membrana citoplasmática (formaciones ondulantes, que parecen representar membranas degeneradas, estructuras parecidas a la mielina, cuerpos de inclusión citoplasmática y vesículas). Todo esto sugiere una fuerte asociación de subestructuras de membranas en forma de vesículas (Bassu et al., 2000). Se ha observado formación de grandes arreglos de laminillas y dilatación de las cisternas de Golgi (Klinger et al., 2001).

El análisis genómico de VHA salvaje y adaptado a cultivos celulares, indican que las mutaciones en las regiones 2B y 2C de las cepas adaptadas, conjuntamente con mutaciones de la región 5' NC, afectan la adaptación celular, la tasa de crecimiento y el rango de hospedero del VHA (Graff et al., 1994, Hu et al., 2002).

Las variantes citopáticas son cepas extraordinariamente bien adaptadas al cultivo celular y tienen ciclos replicativos cortos bajo determinadas condiciones de crecimiento. En cepas de replicación rápida y fenotipo citopático se han encontrado mutaciones y se ha sugerido que estas se forman por recombinación durante las infecciones persistentes, planteándose el posible rol de la proteína 3A (Lemon et al., 1991).

II.3.9 Rango de hospederos e infección experimental en animales.

El VHA produce enfermedad en humanos, chimpancés (*Pan troglodites*), monos lechuza (*Aotus trivirgatus*), *Macaca speciosa* y varias especies de monos sudamericanos (*Saguinus mystax* y *S. labiatus*). La enfermedad en los primates no humanos se parece a la de los humanos, pero es usualmente más leve. El VHA o el antígeno pueden detectarse en

heces, suero, hígado y bilis. Otras especies de primates son susceptibles a la infección, pero no desarrollan la enfermedad con cepas de VHA humanas (Balayan, 1992, Purcell y Emerson, 2001). Se encontró que los monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) pueden infectarse en estado salvaje. En condiciones de laboratorio, se indujo hepatitis en *M. fascicularis* y *M. arctoides* mediante la inoculación experimental con la cepa YaM-55 aislada a partir de monos cynomolgus, pero no por la cepa humana HAS-15. Estos datos sugieren que los mutantes de rango de hospederos pueden ser seleccionados e inducidos (Lemon et al., 1987).

II.4. La Enfermedad: Hepatitis A.

II.4.1 Patogénesis.

La infección natural con el VHA, usualmente sigue a la ingestión del virus por material contaminado con heces infectadas. La secuencia de eventos que comienza con la entrada vía tracto gastrointestinal (TGI), no ha sido completamente resuelta. Aunque el primer sitio de replicación es el hepatocito, la naturaleza del receptor celular del huésped que determina el tropismo no ha sido bien elucidada. Durante el período de incubación, la viremia ocurre al mismo tiempo que la eliminación fecal. Se piensa que el VHA alcanza el TGI por la bilis. La viremia termina después que se desarrolla la hepatitis, mientras que las heces se mantienen infecciosas por 1 ó 2 semanas más. Por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) se ha determinado que la viremia dura 30 días (rango 5-59 días) (Stapleton et al., 1991a, Zajac et al., 1991, Kwon et al., 2000).

Aunque se han detectado coproanticuerpos, estos no poseen actividad neutralizante. Sin embargo, se ha observado la formación de complejos inmunes entre anticuerpos específicos IgA y VHA fecal. Esto puede explicar porque el VHA puede ser detectado por hibridación molecular aun después que el antígeno se hace negativo por inmunoensayo. Los pacientes con recaídas de hepatitis A pueden continuar excretando VHA detectable, incluso siendo su suero negativo a la IgM anti-VHA (Stapleton et al., 1987, Karayiannis et al., 1988).

Se ha reportado que el VHA se une a la IgA anti-VHA en el intestino, y este complejo viaja al hígado por vía sanguínea, el hepatocito ingiere el complejo VHA-IgA anti-VHA a través de la asialoglicoproteína. En el caso de las recaídas, el hígado se reinfecta a través del mismo mecanismo (Dotzauer et al., 2000).

Si existe un sitio de replicación extrahepática, este ha sido difícil de demostrar, en infecciones experimentales el antígeno o material genómico ha sido observado en bazo, riñones, amígdalas y saliva, pero ha sido inconsistentemente identificado en la mucosa intestinal, aunque datos más recientes indican que el virus se replica en la superficie apical de las células epiteliales de la porción distal del ileum (Lemon, 1997). La detección del VHA en amígdalas y saliva antes de la viremia sugiere que un evento replicativo temprano puede ocurrir en la orofaringe o en las glándulas salivales (Cohen et al., 1989). En un estudio en humanos, una muestra de saliva fue 10.000 veces menos infecciosa que una muestra de suero, la cual fue a su vez 100.000 veces menos infecciosa que una muestra de heces colectada en el mismo día (Purcell et al., 1984).

El VHA no es el responsable directo de los cambios citopatológicos observado en los hepatocitos, la enfermedad hepática parece resultar primariamente por mecanismos inmunes. Estudios “in vitro” han demostrado lisis de las células infectadas por el VHA mediado por células asesinas naturales (*NK*, por sus siglas en inglés) y linfocitos CD8+ restringido al sistema mayor de histocompatibilidad (*MHC*, por sus siglas en inglés) clase I. No obstante, el efecto directo viral puede ocurrir (Siegl y Weitz, 1993).

La yuxtaposición de la hepatitis con la aparición de IgM anti-VHA, complejos inmunes y niveles reducidos de complemento sérico pueden ser coincidentes o relevantes a los cambios histopatológicos. Análisis de los complejos inmunes han revelado IgM e IgG, proteínas de la cápsida y el componente C3d del complemento (Margolis y Nainan, 1990). Los pacientes con hepatitis A parecen tener ausencia de anticuerpos citotóxicos dependientes del complemento, altos niveles de β -2 microglobulina, presencia de anticuerpos anti-músculo liso y presencia de anticuerpos anti-actina, que parece ser expresión de la estimulación no específica de los linfocitos B. Niveles crecientes de interferón (IFN) han sido detectados en suero (López et al., 1998, Pak et al., 1999).

II.4.2 Patología.

El tejido hepático en pacientes con hepatitis A tiene menos cambios parenquimatosos (necrosis focal, proliferación de células de Kupffer, cuerpos acidófilos y degeneración en balón) y menos ocurrencia de esteatosis que en aquellos tejidos infectados por el VHC, pero la necrosis y la inflamación de células mononucleares de la región periportal es más evidente en la hepatitis B. Ultraestructuralmente se observa una pérdida de glucógeno y

dilatación marcada de la cisterna del retículo endoplasmático con degranulación. La destrucción del canalículo biliar conlleva a la retención de bilis. Puede ocurrir degeneración acidófila (apoptosis) (Scheuer et al., 1996, Fagan y Harrison, 2000).

La degeneración provoca migración de las células afectadas a los espacios de Disse y eventualmente hacia las sinusoides, allí son rodeados por las células de Kupffer donde son fagocitados y digeridos, resultando en marcada hipertrofia e hiperplasia. El tracto portal se agranda. Las células inflamatorias pueden verse en el parénquima adyacente (necrosis en pedazos). Durante la recuperación, la regeneración es prominente, manifestado por anisonucleosis, la presencia de células bi y trinucleadas y mitosis. El tejido hepático dañado se recupera en 8 ó 12 semanas. Raramente se desarrollan cuadros de colestasis severa centrolobulillar asociada a inflamación periportal (Scheuer et al., 1996).

En un 15 a 10 % de los pacientes, la necrosis focal, conlleva a zonas de necrosis submasiva o masiva. La hepatonecrosis confluyente es potencialmente una lesión progresiva que puede conllevar a hepatitis fulminante y muerte en un 30 a 60 % de los casos. La muerte es inevitable cuando la necrosis es más de un 65 a 80 % del total de hepatocitos. En los pacientes sobrevivientes no quedan secuelas (Fagan y Harrison, 2000).

II.4.3 Respuesta inmune.

La inmunidad natural contra el VHA es compleja e involucra las ramas humorales y celulares del sistema inmune. La inmunidad se debe a primera instancia a la inducción de anticuerpos neutralizantes. Desde el comienzo de los síntomas, se pueden detectar anticuerpos anti-VHA de las clases IgM, IgG e IgA (Hess et al., 1995, Stapleton, 1995).

La IgM se eleva al final del período de incubación y típicamente desaparece entre 3 y 6 meses después del comienzo de los síntomas. Ensayos inmunoenzimáticos (EIE) muy sensibles pueden ocasionalmente detectar la IgM hasta un año después de la infección aguda. La IgM es considerada el estándar de referencia en el diagnóstico específico del VHA (Stapleton, 1995).

La IgG aparece tempranamente, siendo la principal clase de anticuerpo en la fase de convalecencia, y se plantea que frecuentemente persiste de por vida. Evidencias actuales indican que es la línea de defensa primaria contra la reinfección (Stapleton, 1995). Actualmente se puede diferenciar la infección natural de la inmunización, a través de

ensayos que permiten la detección de anticuerpos contra las proteínas no estructurales del virus: anti-P2 y anti-3C (Robertson et al., 1993, Kabrane-Lazizi et al., 2001).

La IgA se eleva antes del comienzo de los síntomas y parece perdurar hasta 2 años después de la infección. Aunque se han hecho pocos estudios de inmunidad secretora contra el VHA, se sugiere que la inmunidad intestinal no juega un papel significativo en la protección contra esta enfermedad. La baja frecuencia de anticuerpos neutralizantes del tipo IgA, encontrada en heces de humanos y animales, podría ser una evidencia indirecta de que el VHA no se replica en el intestino, y si lo hace, esto es muy limitado. Se ha reportado que la IgA secretora no parece jugar un papel relevante en los mecanismos de inmunidad humoral contra este virus (Stapleton et al., 1991b). Recientemente un estudio ha reportado que la inmunización rectal en ratones con vacuna de hepatitis A, ha sido una vía efectiva para inducir respuesta inmune local y sistémica (Mitchell y Galun, 2003).

Los anticuerpos anti-VHA son cualitativa (afinidad) y cuantitativamente diferentes cuando se mide la respuesta inmune después de la inmunización pasiva, después del empleo de vacuna viva atenuada y vacuna inactivada o tras una infección natural, esta última alcanza los títulos mas elevados:(entre 10.000 y 100 000 mUI/mL) (Lemon, 1992, Lemon, 1997).

Además de la respuesta isotipo específica, se ha estudiado la respuesta contra cada una de las proteínas de la cápside utilizando sueros de personas infectadas naturalmente. En el mismo se evidenció que la respuesta de tipo IgM es inmunodominante para VP1 (94%). En los sueros de fase aguda, la respuesta de IgG fue también inmunodominante para VP1 (98%), pero mostró un mayor porcentaje contra VP0 (88%) y VP3 (81%) con respecto a la IgM. Sin embargo, en infecciones pasadas, la respuesta fue dominante contra VP3 (73%) (Wang et al., 1996).

Los anticuerpos neutralizantes están presentes desde los 3 a 5 días antes del comienzo de los síntomas, describiendo un comportamiento en el tiempo similar al de los anticuerpos totales detectados por RIA (predominantemente IgG) (Lemon y Binn, 1983).

Claramente, los anticuerpos contra el VHA son críticos y suficientes por si mismos para prevenir contra la reinfección. Sin embargo, existen evidencias del potencial papel de la inmunidad celular en el aclaramiento del VHA de los hepatocitos, la patogenia de la enfermedad y a la inmunidad contra la reinfección. Existen evidencias indirectas de que

los linfocitos T citotóxicos CD8+ median la destrucción de los hepatocitos infectados por el VHA. Se conoce poco la respuesta de los linfocitos T auxiliares CD4+, los cuales modulan la producción de anticuerpos (Siegl y Lemon, 1990, Stapleton, 1995).

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos parece no ocurrir en la infección por el VHA. La interleucina 15 y las NK aumentan en las últimas etapas de la enfermedad, lo cual puede contribuir a la patogenia de la hepatitis fulminante subaguda (Tokushige et al., 2002).

La replicación del virus se inhibe por el IFN beta y gamma, que, a su vez, promueven la actividad citotóxica de los linfocitos T, al inducir la aparición de antígenos del MHC clase I en la superficie de los hepatocitos (Siegl y Lemon, 1990, Vallbracht et al., 1993).

II.4.4 Cuadro clínico.

Puede ser extremadamente variable: inaparente o subclínica siendo identificada por las alteraciones bioquímicas o serológicas o hepatitis anictérica o icterica. Los síntomas pueden ir desde leves y transitorios, hasta severos y prolongados. Puede ocurrir la recuperación completa o desarrollar hepatitis fulminante y muerte (Hollinger y Emerson, 2001).

El curso clínico se puede dividir en cuatro fases: a) periodo de incubación o preclínico, b) etapa prodrómica o preictérica, c) fase icterica y d) periodo de convalecencia. El periodo de incubación oscila entre 10 a 50 días, promedio de 1 mes, independientemente de la ruta de infección, sin embargo, grandes dosis de virus, disminuyen el periodo de incubación. Es en esta fase donde la transmisibilidad es alta (Koff, 1998).

La fase prodrómica varía desde varios días a más de una semana. Se caracteriza por anorexia, fiebre (< 39 °C), fatiga, malestar, mialgias, náuseas y vómitos. Algunos de estos síntomas pueden ser mediados por la inducción de IFN. La transición entre bienestar y enfermedad aguda ocurre abruptamente (24 horas) en un 60 % de los pacientes, mientras que el comienzo es más insidioso. La diarrea, el vómito y las náuseas son más frecuentes en niños. La pérdida de peso entre 2 y 10 libras es común por la anorexia que acompaña a los desórdenes del gusto y el olfato. Se puede presentar dolor en cuadrante superior derecho debido a la hepatomegalia, la cual usualmente precede la ictericia por 1 ó 2 semanas (Flehmig, 1990, Lemon, 1997, Hollinger y Emerson, 2001).

La fase icterica se caracteriza por orinas oscuras (carmelita - dorado) por la bilirrubinuria, seguido de heces palidas y coloracion amarilla de las membranas mucosas, conjuntiva, esclera y piel. Esta fase comienza dentro de los 10 dias de inicio de los primeros sintomas en cerca de un 85% de los casos. La ictericia se hace aparente cuando la bilirrubina excede de 2.0 a 4.0 mg/dL (Flehmig, 1990, Lemon, 1997, Hollinger y Emerson, 2001).

El examen fisico revela dolor a la palpacion y percusion del cuadrante superior derecho, se recoge el agrandamiento hepatico, con un borde firme pero no irregular. Del 5 al 15 % de los pacientes poseen esplenomegalia y puede observarse eritema palmar y arañas vasculares (Hollinger y Emerson, 2001).

El fallo hepatico fulminante y subfulminante es un sindrome devastador y complejo resultado de un trastorno severo de las funciones de un higado previamente sano. Ocurre durante las primeras 6 a 8 semanas de la enfermedad, se caracteriza por el comienzo subitico de fiebre alta, marcado dolor abdominal, vomitos e ictericia seguida por el desarrollo de encefalopatia hepatica, asociado con coma profundo y convulsiones. Puede ocurrir ascitis, diatesis hemorragica y rigidez de descerebracion, que lleva a la muerte a mas del 75 % de los pacientes (Schiodt et al., 1999).

Las manifestaciones atipicas incluyen: (Durand, 2000).

- Colestasis: Se caracteriza por prurito, fiebre, diarrea y perdida de peso, la bilirrubina se mantiene por encima de 10 mg/dL por mas de 12 semanas y la alanina aminotransferasa (ALAT) por debajo de 500 UI/L. la resolucion es lenta, pero la recuperacion es completa.
- Recaidas: Ocurre en el 3 al 20 % de los pacientes, la recrudescencia de la enfermedad puede ser mas o menos severa que el episodio original, ocurre 4 a 15 semanas despues que los sintomas iniciales se han resuelto. En algunos pacientes solo se observan cambios bioquimicos. La IgM anti-VHA reaparece o se incrementa y el virus se ha detectado en heces y suero.
- Manifestaciones extrahepaticas.
- Induccion de hepatitis cronica autoinmune de tipo I, observada en pacientes con predisposicion genetica.

Una comparacion entre las caracteristicas clinico patologicas de la hepatitis A y el analisis de la region 5' NC, utilizando la tecnica *Polimerasa Chain Reaction-Single Strand Conformational Polymorphism* (PCR-SSCP), no demostró diferencias entre los casos severos y

los autolimitados (Fujiwara et al., 2000). Además, no existe asociación aparente entre la severidad de la enfermedad y la secuencia nucleotídica del VHA que determina el genotipo (VP12A) (Fujiwara et al., 2003).

II.4.5 Tratamiento

El tratamiento es de apoyo y está dirigido a permitir que el daño hepatocelular se resuelva y repare por sí mismo. La dieta será conforme al apetito del paciente, sin embargo, debe suplir adecuada cantidad de proteínas (1g/kg) y calorías (30–35 cal/kg). Los pacientes hospitalizados pueden beneficiarse con restricción proteica, supliendo las calorías en forma de carbohidratos por vía endovenosa (Arús, 1998, Hollinger y Emerson, 2001).

Se han usado sustancias antivirales como la ribavirina, que acorta el período de inflamación hepática, y el IFN Alfa en la forma prolongada. Deben evitarse el uso de medicamentos hepatotóxicos y el consumo de alcohol (Fabri et al., 1997, Arús, 1998).

Los corticoesteroides no están indicados, sin embargo, ellos pueden facilitar la resolución en pacientes con hepatitis colestásica de moderada a severa. En ocasiones es necesario utilizar medicación sintomática (Arús, 1998, Hollinger y Emerson, 2001).

En la hepatitis fulminante es importante el tratamiento de apoyo y el reconocimiento temprano y manejo apropiado de las complicaciones. El trasplante hepático parcial o total es una opción (Fujiwara y Mochida, 2002, Jaeck et al., 2002).

II.5 Diagnóstico de laboratorio

II.5.1 Laboratorio clínico.

En la fase pre-ictérica se encuentra leucocitosis ligera con neutrofilia, y en la fase ictérica leucocitosis con linfocitosis relativa y eosinofilia. Las pruebas de funcionamiento hepático anormal como la ALAT, la aspartato aminotransferasa (ASAT) y la bilirrubina complementan los datos clínicos, patológicos y epidemiológicos. La ALAT y la ASAT son indicadores sensibles de daño hepático y proveen una evaluación cuantitativa del mismo. En la hepatitis aguda, los valores de la ALAT varían entre 500 y 2 000 unidades y casi nunca son menores de 100, es característico un aumento brusco y de corta duración (tres a nueve días). El Centro para el Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en Atlanta, estima que en la infección aguda las cifras de ALAT deben ser 2,5 veces por encima del valor normal. Los niveles de ALAT son significativamente más altos que la ASAT en la hepatitis no complicada resultando en un elevado radio ALAT/ASAT (mayor

de 1.4). Cuando se desarrolla una necrosis severa, se libera ASAT mitocondrial en la sangre. En estas situaciones, la enzima deshidrogenasa láctica (LDH, por sus siglas en inglés) está significativamente elevada (CDC, 2000, Hollinger y Emerson, 2001).

La bilirrubina sérica total usualmente permanece por debajo de 10 mg/dL. Otros exámenes como la fosfatasa alcalina (FA) sérica, que puede estar ligeramente aumentada, valor que puede incrementarse en las formas colestásicas de la enfermedad, los lípidos totales que se encuentran elevados, las proteínas séricas y los exámenes que monitorean la capacidad de síntesis hepática como los factores de la coagulación (Arús, 1998). Dichas anormalidades raramente están presentes más allá de 6 meses (Lemon, 1997).

II.5.2 Laboratorio virológico:

Es quien verdaderamente nos ayuda a comprobar la sospecha clínica y epidemiológica de la etiología de las hepatitis virales. Las técnicas diagnósticas están encaminadas a la detección del virus o sus componentes y la detección de anticuerpos circulantes en respuesta a la entrada del agente. Los eventos virológicos y serológicos subsiguientes a la exposición al VHA se muestran en la Figura 3.

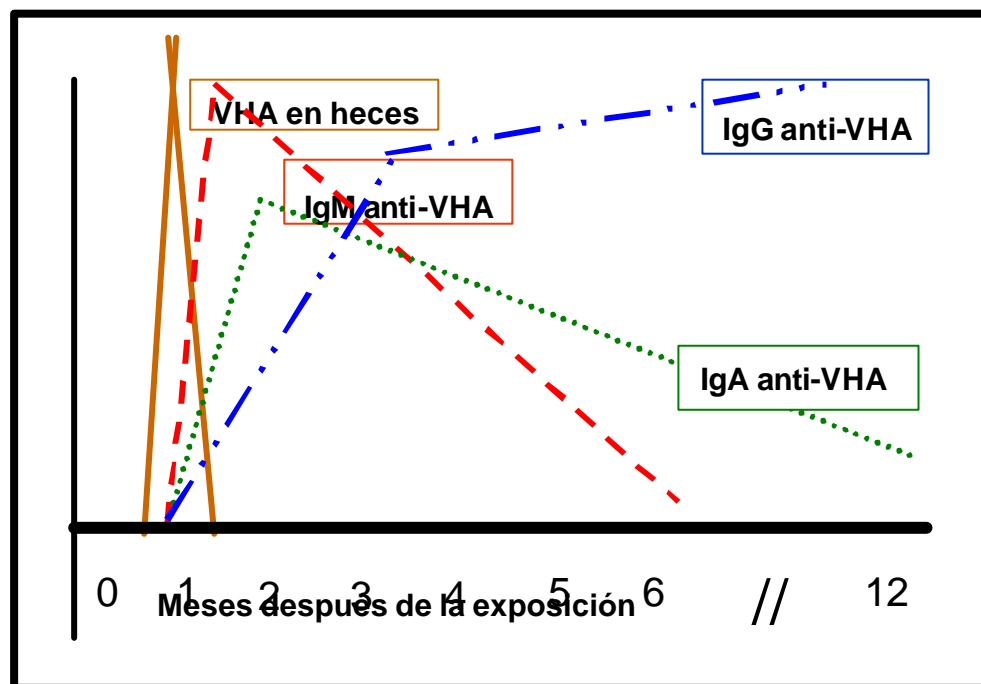


Figura 3. Eventos virológicos y serológicos subsiguientes a la exposición al VHA.

Es posible detectar el VHA en hígado, heces, bilis y sangre de humanos infectados mediante ME e IME, inmunoanálisis, siendo los más usados el Radioinmunoanálisis

(RIA), los EIE, el análisis de hibridación de ácidos nucleicos y la RCP (Feinstone et al., 1973, Jansen et al., 1990, Seelig et al., 1992, Sjogren et al., 1994, Yotsuyanagi et al., 1996, Polish et al., 1999). El aislamiento del virus en cultivos celulares no es un método útil en el diagnóstico (Lemon, 1997).

El anticuerpo anti-VHA aparece en su fracción IgM durante la fase aguda y alcanza su máximo casi dos semanas después del aumento de las enzimas hepáticas. La IgM anti-VHA en general declina hasta concentraciones no detectables después de tres a seis meses del comienzo de la enfermedad. Puede persistir por más de seis meses en el 25% de los pacientes, y su detección más allá de doce meses es un hallazgo inusual. La IgM ha sido aceptada universalmente como el estándar de la infección por el VHA, los cuales están presentes en más del 99% de los pacientes en el momento que solicitan atención médica (Duermeyer, 1980, Stapleton, 1995, Lemon, 1997, Koff, 1998).

Las IgG anti-VHA aparecen tempranamente, alcanzan su pico máximo en la fase convaleciente y con el tiempo reemplazan a la IgM, la IgG persiste durante décadas. Raramente se indica en la práctica médica. Su utilidad máxima está en el estudio de personal en riesgo para conocer su estatus inmune, en estudios seroepidemiológicos y en ensayos clínicos pre y post-vacunales (Duermeyer, 1980, Koff, 1998). Los anti-VHA totales son una mezcla de IgG, IgM e IgA anti-VHA. Con el paso del tiempo, la IgG es el mayor contribuyente de las anti-totales (Sjogren, 1994, Lemon, 1997).

Con el objetivo de detectar estos indicadores se han desarrollado numerosas técnicas, a partir del descubrimiento del VHA por Feinstone y col en 1973. En 1975, Provost y col. describen la técnica de Fijación del complemento (FC) aplicada al VHA, y en ese mismo año, Miller y col en 1975 reportan la Hemaglutinación por inmunoadherencia (HIA), utilizando ambos homogenizados de hígados de marmosets infectados como fuente de antígeno. Hollinger y col., en 1975 reportan el RIA para la detección del VHA con muy buenos resultados, técnica que va a ser utilizada en 1976 por Purcell y col. para detectar tanto antígenos como anticuerpos. En años posteriores, diferentes autores reportaron modificaciones en estas técnicas, utilizando extractos fecales crudos (Bradley et al., 1977, Flehmig et al., 1977).

Se ha reportado además, la Inmunofluorescencia Indirecta, la Hemaglutinación, la Inhibición de la Hemaglutinación, la Inmunoperoxidasa y la Hemadsorción como métodos

alternativos para la detección de IgM e IgG anti-VHA (Nadala y Loh, 1990a, Summers et al., 1993, Kukavica-Ibrulj et al., 2003).

Con el desarrollo de los EIE, entre ellos los conocidos como ELISAs, se abrió una nueva posibilidad para el diagnóstico de este agente, reportándose primero ensayos para determinar la presencia de antígenos y anticuerpos totales y poco después para la detección de IgM. Conjuntamente con el RIA, son las técnicas más ampliamente usadas. Las variantes más utilizados han sido: tipo Sándwich o de doble anticuerpo, de Inhibición y de Captura de IgM. El aislamiento y propagación del virus en cultivos celulares en 1979, significó sustituir el antígeno proveniente de heces o hígados infectados, por antígeno proveniente de cultivo celular, lo cual permitió una mayor homogeneidad y reproducibilidad de los ensayos, disminuir los costos y facilitar el trabajo (Provost y Hilleman, 1979, Duermeier, 1980, Chitambar et al., 1991, Kalashnikova et al., 1991, Chitambar et al., 1994, Hess et al., 1995).

Se ha reportado además, la obtención de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos y su posible uso como antígeno en EIE con resultados alentadores (Le Brecque et al., 1998, Gomara et al., 2000a, Gomara et al., 2000b, Ternovoi et al., 2001, Delahanty et al., 2004).

La OMS desarrolló un suero de referencia internacional que tiene un título promedio geométrico (TPG) de anticuerpos totales de 600 por HAVAB RIA y un título de anticuerpos neutralizantes de 80 000 por el ensayo de inhibición del radioinmunoensayo. A 1 mL de esta presentación se le asignó un valor de 100 UI (Lemon, 1993, Stapleton, 1995).

Otras variantes de EIE reportados en la literatura, son los ensayos microparticulados automáticos, que detectan IgM e IgG anti-VHA (Robbins et al., 1991). Se han reportado además, los ensayos en papel de nitrocelulosa, que se amplifican con un sistema biotina/estreptavidina (Nadala y Loh, 1990b) y los que utilizan oro coloidal (Wu et al., 1999). Los anticuerpos monoclonales también han sido empleados tanto para la detección del virus en muestras de heces, como de los anticuerpos IgM e IgG (Razumov et al., 1998).

Se ha publicado una variante de EIE "in situ" para la detección del VHA en cultivos celulares (Borovec y Unen, 1997, Hou et al., 1999), además, de EIE para los ensayos de

potencia de evaluación de vacunas (Poirier et al., 2000). También es posible diferenciar la IgG anti-VHA inducida por vacunas o por la infección natural (Ochnio et al., 1997).

La neutralización es el estándar para la estimación de la protección (Berger et al., 1993).

La titulación viral y detección de anticuerpos neutralizantes han demostrado ser muy exactos, sin embargo, estos ensayos requieren condiciones muy elaboradas en los cuales el antígeno crece en cultivos celulares (Krah, 1991, Krah et al., 1991, Beales et al., 1996, Borovec y Unen, 1997, Richards y Watson, 2001). Se han reportado ensayos de inmunoprecipitación y neutralización viral que demuestran diferencias cualitativas (afinidad) entre la respuesta de anticuerpos inducidos por pasiva o activa (Lemon, 1997).

Como diagnóstico alternativo de la hepatitis A se han usado otros marcadores, como la IgA sérica y secretora (detectada en saliva) (Trotta et al., 1984, Angarano et al., 1985, Oba et al., 2000). También, otros métodos de colecta de muestra, como la absorción de sangre en esponjas de algodón o en papel de filtro (Adler y Shouval, 1993, Gil et al., 1997, Gil et al., 1999, De Almeida et al., 1999, Chitambar y Chadha, 2000).

II.5.2.1 La orina como muestra útil en el diagnóstico y la investigación.

La orina parece ser una muestra factible para el diagnóstico y la investigación. La enorme permeabilidad de la membrana glomerular es consecuencia de su especial estructura: el endotelio capilar, una membrana basal y una capa de células epiteliales (podocitos), llamada en su conjunto Barrera Glomerular. Las células endoteliales están perforadas por pequeños agujeros llamados fenestraciones. Por fuera, se sitúa la membrana basal, compuesta por un entramado de fibras de colágenos y proteoglicanos, que deja grandes espacios en su interior por donde el líquido puede pasar fácilmente. La última capa es la de células epiteliales, que se sitúa en la parte más externa del capilar glomerular. Sin embargo, estas células no son continuas, sino que tienen múltiples proyecciones digitiformes que revisten la membrana basal. La permeabilidad de esta membrana es del orden de 100-500 veces superior a la de los capilares normales (Guyton y Hall, 1996).

Hay dos razones básicas para esta alta selectividad molecular de la membrana glomerular: el tamaño de los poros, los cuales son suficientemente grandes para permitir el paso de moléculas de hasta 8 nm de diámetro (80 Å) y que la membrana basal glomerular esta recubierta por una red de proteoglicanos cargados negativamente, así la repulsión electrostática de las moléculas por las paredes de los poros evita que todas las proteínas

con un peso molecular igual o superior a 69 kDa pasen con una permeabilidad de 0.5% o no pasen (Guyton y Hall, 1996).

Se ha deducido que la IgM no se secreta a través de la orina de forma pentamérica (900 kDa). La IgM en forma monomérica (67.kDa) se ha detectado en fuentes post-renales y no en filtro glomerular (Perry et al., 1992, Guyton y Hall, 1996, Tencer et al., 1998).

La orina es un fluido que posee bajas cantidades de inmunoglobulinas pero medibles, se han usado en diferentes patologías infecciosas virales como: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), CMV, VHA, VHB, Poliovirus, entre otros (Perry et al., 1992, Koopmans et al., 1995). Se ha comprobado que estas inmunoglobulinas provienen del plasma, ya sea del riñón por trasudación hacia el tracto renal bajo o por síntesis local (Perry et al., 1992).

II.5.2.2 La saliva como muestra útil en el diagnóstico y la investigación.

La saliva es una mezcla de secreciones procedentes de las glándulas salivales y trasudados procedentes de los capilares que se encuentran debajo de la mucosa bucal. Es de conocimiento que la saliva contiene IgA secretora aunque recientemente se ha concentrado la atención a otros tipos de inmunoglobulinas. El contenido del fluido de la hendidura es similar al plasma, y la concentración de inmunoglobulinas es más alta que en la secreción de las glándulas salivales (Tabla 1) (Parry, 1993, Madar et al., 2002). La IgA es el isotipo más abundante en las secreciones mucosas, siendo secretada como dímeros o grandes polímeros después de la incorporación de la cadena J y la asociación con una glicoproteína epitelial transmembranosa, conocida como componente secretor (Fagarasan y Honjo, 2003).

Tabla 1: Concentración media de inmunoglobulinas (mg/L) en componentes de la saliva y el plasma (Brown et al., 1994).

MUESTRA	IgG	IgM	IgA
<i>Plasma</i>	14730	1280	2860
<i>Fluido de la hendidura</i>	3500	250	1110
<i>Saliva completa</i>	14.4	2.1	194
<i>Saliva de la Parótida</i>	0.36	0.43	39.5

Se ha postulado que los componentes de la saliva actúan como un espejo de la salud del cuerpo, de ahí su creciente aceptabilidad como herramienta diagnóstica (Lawrence, 2002). Usando EIE sensibles, se ha hecho posible el diagnóstico en muestras de saliva en un amplio rango de enfermedades infecciosas virales: hepatitis A, B y C, sarampión, rubéola, parotiditis, VIH, VEB, Parvovirus B19 y herpesvirus humano 6 (Parry, 1993, Jacobson et al., 1995, Garrido et al., 1997, Ochnio et al., 1997, O'Farrel et al., 1997, Elsana et al., 1998, Oba et al., 2000).

Existen múltiples ventajas de la muestra de saliva: gran aceptabilidad: no invasiva y ausencia de dolor, gran conveniencia: simple, rápida, barata y colectada por el propio investigador, menos peligrosa: para el paciente y el investigador y mejor acceso: en brotes epidémicos, niños, grandes poblaciones y grupos difíciles de acceder (ej. Drogadictos endovenosos) (Madar et al., 2002).

II.5.2.3 Inmunoensayo ligado a enzimas.

II.5.2.3.1 Generalidades.

Los EIE fueron concebidos hace más de 30 años. Los principios en los que se basaron eran similares a los RIA, se necesitaba el uso de una fase sólida y fueron llamados heterogéneos. En 1972, Rubinstein y Schneider reportaron un inmunoensayo el cual no necesitaba el uso de fase sólida y se le denominó ensayo homogéneo. Los ensayos heterogéneos han sido de más amplio uso (Avrameas y Grulbert, 1971a y b, Engvall y Perlmann, 1971).

Diferentes fases sólidas han sido probadas para inmovilizar los anticuerpos o antígenos, tales como el cristal, el nylon, celulosa, poliestireno y cloruro de polivinilo, sin embargo, ningún método ha sido verdaderamente superior a la simple adsorción física sobre la superficie de plástico cuando se trata de poliestireno. Rutinariamente se usa el formato de la microplaca estándar de 96 pocillos (8 filas y 12 columnas) para los cuales los lectores fotométricos y máquinas de lavado están disponibles. La adsorción de moléculas se puede realizar por métodos pasivos o covalentes (Crowther, 1995, Fossceco y Curtis, 2003).

La fase sólida posee una limitada capacidad de adsorción para las proteínas, de manera que si la concentración de IgG excede $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, se originan bicapas y policapas de anticuerpos inestables, de donde son removidas las moléculas de analitos. En la cinética de adsorción pasiva se plantea que a mayor tiempo de incubación, más moléculas reaccionantes se fijan a la fase sólida hasta que esta se satura. Para la adsorción, tanto el antígeno como el anticuerpo deben estar en la forma más pura posible (Porstmann y Kiessig, 1992, Crowther, 1995).

Cuando se utilizan bajas concentraciones de reactivos se deben añadir moléculas inertes que bloqueen los sitios libres sobre la fase sólida, minimizando la reacción de fondo; se ha usado la caseína, albúmina, gelatina y detergentes entre otros (Crowther, 1995, Ochoa et al., 2000b).

Entre las ventajas del uso de las enzimas se encuentran: la seguridad del operador, el costo y su duración. La peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la β galactosidasa han sido las más utilizadas, por su pureza, la actividad específica, estabilidad, solubilidad, fácil medición y la no reducción de la actividad por la conjugación. El acoplamiento de estas enzimas con anticuerpos puede realizarse por

diferentes métodos: glutaraldehído y peryodato (Nakane y Kawoi, 1974, Avrameas et al., 1978).

La presencia de la enzima conjugada puede evidenciarse por la utilización de sustratos que tienen la propiedad de dar productos de reacción solubles coloreados y medibles al espectrofotómetro. Se han utilizado diferentes cromógenos como son la o-dianisidina, la ortofenilendiamina (OPD), el ácido 2,2-di (etil) benzothiazolonei-6-sulfónico (ABTS), el 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (Porstmann y Kiessig, 1992, Crowther, 1995).

Los sustratos y cromógenos deben ser solubles en agua, incoloros, poseer una alta constante de enlace con la enzima y no estar presentes en la muestra a analizar. Además, el producto formado debe poseer un alto coeficiente de extinción molar, con un máximo de absorbancia entre 400 y 600 nm, y mostrar linealidad en un rango amplio entre la intensidad del color y la concentración de la enzima (Porstmann y Kiessig, 1992).

Los conjugados deben poseer un grado ajustable de marcaje y una alta estabilidad, sin la pérdida de la actividad enzimática e inmunológica. Además, durante el procedimiento se debe obtenerse un alto rendimiento del conjugado y un bajo rendimiento de la enzima libre (Porstmann y Kiessig, 1992).

La sensibilidad de los ELISA para detectar anticuerpos depende de la densidad de epítomos con relevancia diagnóstica presentes en la fase sólida, de ahí que el antígeno debe estar en la forma más pura posible (Crowther, 1995).

La detección de anticuerpos IgM es una herramienta valiosa en el diagnóstico rápido y temprano de entidades donde el aislamiento del patógeno es difícil. Las técnicas convencionales son demoradas y necesitan ensayos adicionales. El uso de conjugados anti-IgM puede conllevar a reacciones falsos positivos si está presente el Factor Reumatoideo (FR). La presencia simultánea de IgM e IgG puede llevar a reacciones falso negativas debido a una competencia por el antígeno (Duermeyer, 1980, Crowther, 1995). Para evitar la interferencia con el FR e IgG se han diseñado sistemas ELISA con el principio de Captura. Este modelo se emplea principalmente cuando el anticuerpo está en bajas concentraciones en la muestra, ya que garantiza una amplificación de la reacción y por tanto aumenta la sensibilidad del sistema (Duermeyer, 1980).

Los ELISA de Inhibición-competitivos detectan anticuerpos específicos independientemente de su isotipo. Estos EIE se basan en la capacidad que tienen los

anticuerpos específicos, presentes en la muestra, de inhibir la unión del conjugado al respectivo antígeno. La sensibilidad depende de la afinidad de los anticuerpos presentes en la muestra (Porstmann y Kiessig, 1992).

II.5.2.3.2 Conceptos para la evaluación de los resultados en los EIE (Racin-Poon et al., 1991, Porstmann y Kiessig, 1992, Tijssen, 1999, Ochoa et al., 2000a, Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión, 2001, Otero et al., 2001, Duke University Medical Center Library, 2003, Fossceco y Curtis, 2003).

- **Valor de corte:** Es el nivel de discriminación positivo/negativo. La utilización de valores de corte predeterminados no tiene en cuenta el error interensayo, por lo que se prefiere su expresado en términos de exclusión porcentual a partir de una distribución de frecuencias de absorbancias de sueros negativos. La selección del valor de corte es importante para minimizar el número de falsos positivos o falsos negativos de acuerdo con el grado de ajuste deseado.
- **Exactitud:** Es el grado de concordancia de un resultado con un valor estándar aceptado o con un valor real. Indica la capacidad de un método analítico para dar resultados lo más próximo posible al verdadero valor.
- **Precisión: Reproducibilidad y Repetibilidad:** Nos da una idea de cuan preciso es un ensayo. Para que exista una buena reproducibilidad, la imprecisión interensayo debe tener un coeficiente de variación menor de un 15% y no exceder de dos a tres veces la imprecisión intraensayo, la cual debe tener un coeficiente de variación menor del 10 %. Errores en las diluciones son fuentes comunes de error intraensayo, mientras que el tipo de placas, productores y lotes pueden ser fuentes de errores interensayo, fuentes adicionales incluyen las condiciones experimentales en los cuales el ensayo se realiza (temperatura y tiempo de incubación). El Coeficiente de variación = $(\text{Desviación Estándar}/\text{Promedio}) \times 100$.
- **Ancho de la zona "gris" como medida de precisión:** La zona "gris" es aquella en que los resultados no pueden clasificarse con certeza como positivos o negativos, o son claros pero no reproducibles. El ancho de esta zona es importante y define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que sea más estrecha. Se evalúa preparando varias diluciones de una muestra de referencia, analizando al menos 20 replicados de cada dilución en orden aleatorio y registrando los

resultados en positivos o negativos según el valor de corte definido para el ensayo. El valor de discriminación corresponderá a la dilución en la que se obtenga el 50% de resultados positivos y la zona gris se extenderá entre el 5% y el 95% de resultados positivos. Si no existe una referencia conocida se puede usar una muestra fuertemente positiva y los resultados se expresaran en términos arbitrarios

- Sensibilidad analítica: Se define como la sensibilidad de respuesta del ensayo a los cambios en la concentración del analito. Depende de la pendiente de la curva dosis-respuesta.

- Límite de detección: Es la menor concentración del analito detectada por el ensayo. Estadísticamente es la menor concentración del analito excediendo la precisión de la dosis cero. En los ensayos de anticuerpos, para lograr un incremento en la especificidad de la prueba, se recomienda calcular el límite de detección según el método descrito por Porstmann y Kiesssig en 1992, donde:

$$\text{Absorbancia límite de detección} = \text{Absorbancia dosis cero} + 5 * S$$

Absorbancia dosis cero: Media de los valores de absorbancia a partir de los cuales el ensayo no responde a los cambios en la concentración del analito.

S: Desviación estándar de los valores de absorbancia a partir de los cuales el ensayo

no responde a los cambios en la concentración del analito.

- Sensibilidad: Es la proporción o porcentaje de individuos con la enfermedad, que tienen un resultado positivo.

$$\text{Sensibilidad} = \text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}).$$

- Especificidad: Es la proporción o porcentaje de individuos sin la enfermedad, que tienen un resultado negativo.

$$\text{Especificidad} = \text{verdaderos negativos} / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}).$$

- Valor Predictivo Positivo (VPP): Es la probabilidad (o proporción) de tener realmente la enfermedad, cuando su resultado es positivo.

$$\text{VPP} = \text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}).$$

- Valor Predictivo Negativo (VPN): Es la probabilidad (o proporción) de no tener la enfermedad cuando el resultado es negativo.

VPN = verdaderos negativos / (falsos negativos + verdaderos negativos).

Los VPP y VPN se modifican con la prevalencia de la enfermedad.

- Linealidad: Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.
- Razón de Probabilidades (RP): Es la probabilidad de que el resultado de una prueba dada pueda ser esperado en un paciente **con** la enfermedad, comparado con la probabilidad de que el mismo resultado pueda ser esperado en un paciente **sin** la enfermedad. Matemáticamente, la RP es la relación de dos probabilidades. Es un método alternativo para evaluar el rendimiento de una prueba diagnóstica con resultados dicotómicos (positivo y negativo) y no dicotómicos, y no es influida por la prevalencia de la enfermedad.

RP de un resultado positivo (RP+)= Sensibilidad / (1-especificidad).

RP de un resultado negativo (RP-)= (1-Sensibilidad) / especificidad.

Altas RP+ (ej RP>10) indican que la prueba es mejor para diagnosticar la enfermedad, mientras que bajas RP- (ej RP<0.1) mejor es la prueba para excluir la enfermedad. Como regla general, son útiles clínicamente las pruebas con RV+ mayor de 10 y con RV- menor de 0.1.

- Índice de Concordancia Kappa (K): Se utiliza con el fin de determinar hasta que punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar. En caso de acuerdo perfecto la proporción de concordancia será 1 (Tabla 2).

Fórmula: $K = Po - Pe / 100 - Pe$.

Donde: Po es el porcentaje total de concordancias

Pe es el porcentaje de concordancia esperado por azar.

Otros aspectos a considerar son la Fortaleza y la Robustez, el primero es el grado de reproducibilidad de los ensayos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación. El segundo investiga la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico, localizando los factores que originan fluctuaciones y los que necesitan una atención especial, por cuanto originan variaciones significativas (Serret y Rosales, 1997).

La validación de cualquier sistema diagnóstico se debe hacer contra una técnica de referencia o convencional (Kenneth et al., 1995).

Tabla 2: Márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice K, según Landis y Koch (Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión, 2001).

KAPPA	GRADO DE ACUERDO
<i>< 0</i>	<i>Sin acuerdo</i>
<i>0 – 0.2</i>	<i>Insignificante</i>
<i>0.2 – 0.4</i>	<i>Bajo</i>
<i>0.4 – 0.6</i>	<i>Moderado</i>
<i>0.6 – 0.8</i>	<i>Bueno</i>
<i>0.8 - 1</i>	<i>Muy bueno</i>

II.5.2.3.3 Cuantificación de anticuerpos mediante ELISA.

La homogeneidad frecuente de los antígenos contrasta con la heterogeneidad en la afinidad y concentración de los anticuerpos en los sueros, lo cual resulta en marcadas diferencias en la naturaleza de las curvas dosis-respuesta para anticuerpos y para antígenos. A pesar de esto ambos tipos de curvas presentan un comportamiento sigmoidal; siendo su parte más sensible la zona con mayor pendiente, la cual tiene un rango relativamente pequeño (Buttler y Hamilton, 1991, Fossceco y Curtis, 2003). Las curvas dosis-respuesta de anticuerpos son complicadas debido a una variedad de factores: su rango de concentración es mucho mayor que el de las curvas para antígenos, las curvas dosis-respuesta para diferentes sueros son raramente paralelas, las curvas se entrecruzan debido a diferencias en la concentración y la afinidad de anticuerpos, una curva obtenida a partir de un sólo suero de referencia no puede tomar en consideración ambos parámetros, y por lo tanto es escasamente representativa de otros sueros y la presencia de anticuerpos de diferentes clases, lo cual puede causar un efecto de prozona. (Malvano, 1986, Fossceco y Curtis, 2003).

Existen diferentes métodos para determinar la concentración de anticuerpos. Los más usados son la titulación a punto final y el método de la curva estándar o de referencia. El primero requiere un análisis detallado de las curvas de titulación completas de todas las muestras para encontrar el punto final de cada una. En el segundo, primero se analiza el suero de referencia para determinar la ecuación de mejor ajuste de la curva patrón, la cual se usará para estimar la concentración de las muestras (Peterman, 1991, Tijssen, 1999).

II.5.2.3.4 Técnicas para la representación y el ajuste de los datos experimentales.

Los datos de la titulación por ELISA se pueden representar de distintas formas. El procedimiento más apropiado es representar la DO como una función logística de cuatro parámetros del log (dilución del suero) y ajustar los datos mediante regresión lineal aplicando el método de los mínimos cuadrados. Este procedimiento permite un excelente ajuste de los datos en un amplio rango de las diluciones de suero (Karpinski et al., 1987, Karpinski, 1990, Fossceco y Curtis, 2003).

II.5.2.4 La Biología Molecular aplicada al estudio del VHA.

El genoma del VHA clonado en un vector, puede ser usado para la síntesis de sondas de ARN, siendo de utilidad en la determinación del virus en muestras clínicas, ambientales, y en investigaciones básicas, mediante ensayos de hibridación. Su sensibilidad es mayor cuando se compara con la de otras técnicas convencionales (Van Cuyck-Gandre et al., 1994). Aunque es poco probable que algún método para la detección del antígeno o los anticuerpos pueda suplantar los métodos serológicos convencionales para el diagnóstico, la elevada sensibilidad de la RCP es algo a tener en cuenta (Jansen et al., 1990, Seelig et al., 1992, Robertson et al., 2000).

La RCP también juega un papel fundamental en las recaídas (Glikson et al., 1992) y en la confirmación de la transmisión vertical (intraparto) del VHA (Renge et al., 2002). Otras de las aplicaciones de la RCP y RCP en tiempo real, han sido en el estudio de la duración de la viremia del VHA (Kwon et al., 2000, Costa-Mattioli et al., 2002b). Estudios recientes utilizando la RCP han demostrado la utilidad de la detección de ARN viral antes de la aparición de la IgM, así como la correlación directa entre el pico de la carga viral con el pico de aminotransferasas, pero no con el de la IgM (De Paula et al., 2004, Norman et al., 2004). Mas allá de sus aplicaciones en el diagnóstico individual, la RCP ha sido usada en la detección de virus en fuentes potenciales de contaminación colectiva, como es el caso de sangre y hemoderivados (Diwon et al., 2003). Aunque esta técnica no discrimina entre partículas infecciosas y no infecciosas, ofrece un método rápido para pesquisar muestras ambientales como aguas de río, de consumo humano, albañales y marinas (Casas y Sunen, 2002, Morace et al., 2002), así como mariscos (Coelho et al., 2003), frutas y

vegetales (Dubis et al., 2002) y alimentos (Leggitt y Jaykus, 2002) que pudieran ser fuente de brotes y perpetuar el virus en la comunidad.

Otras herramientas para el estudio de VHA son las Enzimas de Restricción (*RFLP* por sus siglas en inglés) y el SSCP para la identificación de variantes genéticas (Goswani et al., 1997), la técnica *Nucleid Acid Sequence-Based Amplification* (*NASBA*) para la detección del VHA (Jean et al., 2002) y el ensayo de movilidad del heteroduplex que ha permitido conocer la infección mixta por genotipos 1A y 1B (De Paula et al., 2003). Por último, los estudios de epidemiología a nivel molecular se han visto muy favorecidos por el desarrollo de técnicas que combinan la RCP con la secuenciación de ácidos nucleicos lo que ha permitido la clasificación por genotipos y el seguimiento de cepas (Jansen et al., 1990, Robertson et al., 1992).

II.6 Epidemiología

La hepatitis A es causa de una importante morbilidad en países con precario desarrollo socioeconómico. Los brotes son comunes en instituciones cerradas como guarderías, escuelas, unidades militares, campos de veraneo, entre otras, también pueden ocurrir brotes explosivos en población abierta, casi siempre relacionados con la contaminación de una fuente de abasto de agua. Ocurren casos todo el año, aunque se ha observado cierta variación estacional con alta incidencia en primavera y verano, relacionado con un aumento de las lluvias. El consumo de ostras crudas o de almejas cocidas de manera inapropiada procedentes de aguas contaminadas con aguas negras, también han producido epidemias. Se ha reportado la ocurrencia de brotes a partir de chimpancés, que transmitieron la enfermedad a sus cuidadores. La forma de transmisión en estas condiciones es la ruta fecal-oral a través de un estrecho contacto personal. Las heces pueden contener más de 10^8 viriones infecciosos/mL y es la primera fuente de infección del VHA, la saliva y el suero también pueden contener virus infecciosos, pero estas rutas no son comunes. Las concentraciones virales son altas a finales del período de incubación, persistiendo hasta 1 a 2 semanas después de comenzada la ictericia (período de transmisibilidad), lo cual es difícil de precisar en los casos asintomáticos (Mast y Alter, 1993, Hollinger y Emerson, 2001, Veller et al., 2002, Fiore, 2004).

Se han reportado brotes de hepatitis A en hemofílicos (Mannucci et al., 1994), la transmisión vertical (Renge et al., 2002), drogadictos endovenosos (Lemon, 1997) y en hombres que tienen sexo con hombres (Cotter et al., 2003).

La infección por el VHA tiene lugar en la primera infancia en condiciones de hacinamiento y falta de higiene, en estas circunstancias la mayoría de los niños ya son inmunes alrededor de los 10 años de edad. La severidad del cuadro clínico aumenta con el incremento de la edad, con tasas mayores en el grupo de 5 a 14 años de edad. En los adultos, la proporción entre casos anictéricos e ictericos es de 1:3 y en los niños 12:1. La mortalidad es baja (<0.5%). Ciertos factores predisponen a la enfermedad hepática severa por VHA y aumento de la mortalidad. El riesgo aumenta después de los 40 años, en los drogadictos endovenosos, los homosexuales masculinos, el excesivo consumo de alcohol o personas con enfermedad hepática severa previa (O'Grady, 2000, Hollinger y Emerson, 2001).

A escala mundial se han descrito tres patrones de seroprevalencia (Mast y Alter, 1993):

Patrón A: De regiones hiperendémicas (30-100 casos al año/100 000 habitantes). Prácticamente toda la población mayor de 10 años es inmune.

Patrón B: De áreas en vías de desarrollo (20-30 casos al año/100 000 habitantes). Los adolescentes y adultos jóvenes son inmunes.

Patrón C: Países desarrollados (<20 casos al año/100 000 habitantes). Los niños y jóvenes son susceptibles. Los anticuerpos predominan en la población más vieja.

En muchos países se ha observado un cambio en la epidemiología del VHA, con un desplazamiento de los susceptibles a edades mayores de la vida (Cianciara, 2000)

En Cuba las hepatitis víricas ocupan la quinta causa de morbilidad por enfermedades infecciosas. Dentro de este grupo predomina la hepatitis A, que representa del 80 al 90% de la incidencia conocida de estas enfermedades. Su comportamiento es endémico, produciéndose brotes epidémicos cada 4 a 5 años por acumulación de susceptibles. Como promedio se notifican cerca de 20 000 casos anuales, pudiendo aumentar esta cifra en periodos epidémicos. La evolución estacional muestra incremento en el período de julio a noviembre, sobre todo entre agosto y septiembre, relacionado con el comienzo del curso escolar. Los escolares y pre-escolares constituyen el grupo más afectado (MINSAP, Departamento de Estadística Nacional, 2002).

II.6.1 Epidemiología molecular

Estudios de epidemiología molecular a escala mundial han permitido definir el patrón de transmisión existente en las mismas, determinando la presencia de circulación endémica o la importación de las cepas. Estudios de epidemiología molecular realizados en países con un alto nivel socioeconómico como Suecia, Alemania, Dinamarca y Suiza, han demostrado que la mayoría de los casos se deben a cepas importadas de otras regiones. En el caso particular de Suecia, las cepas definidas como sub-genotipo IIIA, fueron aisladas de drogadictos por vía parenteral, en el caso de Japón, se han aislado cepas con diferente genotipo, indicando la existencia de una combinación de patrones. En EE UU, la mayoría de las cepas aisladas pertenecen al sub-genotipo 1A, sugiriendo transmisión endémica (Robertson et al., 1992).

En Cuba, ha sido clasificada la primera cepa aislada en 1991, la cual se situó dentro del genotipo IA, conjuntamente con el grupo de las demás cepas americanas, y ha sido clasificada como una cepa independiente. Las características de esta cepa son coherentes con los estudios epidemiológicos a nivel poblacional, donde se ha encontrado una circulación endémica-epidémica del VHA. Otro estudio, con 27 aislamientos salvajes, también clasificaron como sub-genotipo IA (Díaz et al., 1999, Díaz et al., 2001).

II.6.2 Prevención de la infección por el VHA

La principal medida para prevenir la infección es el mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias de la población: cloración del agua, la higiene personal y ambiental, correcta disposición de los desechos líquidos y sólidos y la educación comunitaria. La interrupción de la transmisión fecal-oral del VHA, tiene un efecto paradójico ya que incrementa el número de adultos susceptibles, creando el potencial para la ocurrencia de una epidemia a gran escala. Los objetivos de la prevención son: proteger al paciente individual, reducir la incidencia de la enfermedad, bajar la tasa de infección en los grupos de riesgo, bajar la tasa global de infección y erradicar la infección por el VHA (Hollinger y Emerson, 2001).

Profilaxis pasiva: La globulina inmune es efectiva en un 80-90 % para prevenir la hepatitis clínica, cuando se administra antes de la exposición o tempranamente en el período de incubación, pero sólo ofrece protección de 3 a 6 meses, no previniendo la infección en caso de exposición mantenida del agente. La dosis usada es de 0.02 mL/kg. Su acción

profiláctica se produce por neutralización del virus en la fase virémica (Stapleton, 1995). Mediante librería de fagos se ha obtenido la fracción Fab de anticuerpos que neutralizan el VHA in vitro, los cuales proveen la base para el desarrollo futuro de una molécula completa de IgG recombinante y su uso en la profilaxis de la infección (Cao et al., 2000).

Profilaxis activa: Ya se encuentran licenciadas vacunas inactivadas, como la **HAVRIX**, de la firma Smith-Kline Beecham Biological, Bélgica (Troisi et al., 1997), **VAQTA**, de Merck Sharp & Dohme (Werzberger et al., 1998), **AVAXIM** de Aventis Pasteur (Vidor et al., 1996), **EPAXAL**, del Instituto de Sueros y Vacunas de Berna, Suiza, que utiliza como adyuvante un virosoma inmunopotenciador reconstituido del virus influenza (Bovier et al., 2002) y la vacuna inactivada rusa **Hep-A-in-vac** (Gorbunov et al., 1998). Estas vacunas han demostrado ser altamente seguras e inmunogénicas (Demicheli y Tiberti, 2003), induciendo altos títulos de anticuerpos que parecen persistir por más de 20 a 25 años (Van Herck y Van Damme, 2001). Se han producido vacunas combinadas como la **TWINRIX**, la cual es una vacuna contra la hepatitis A y B (Joines et al., 2001) y la vacuna contra la hepatitis A y Fiebre tifoidea (Beran et al., 2000). Por último, la vacuna viva atenuada china (**HAVAC**), ha demostrado seguridad, eficacia y respuesta inmune comparable a los resultados de las vacunas inactivadas (Wang et al., 2004).

Otras alternativas para el desarrollo de vacunas incluyen: la aplicación de anticuerpos anti-idiotipos, péptidos sintéticos y subunidades virales, cápsides vacías, vectores virales y bacterianos vivos, así como la inmunización con ADN (D'Hondt, 1992, Stapleton et al., 1993, Andre, 1995, Liu et al., 1996). Últimamente, se han introducido técnicas más novedosas que consisten en la obtención de anticuerpos en chimpancés con librería de fagos para identificar nuevos epítomos (Scholfield et al., 2002), expresar el virus o sus proteínas en plantas transgénicas (Ketzinel-Gilad, 2003) y la obtención de péptidos sintéticos multiantigénicos (MAP) de los dominios VP1 y VP3 del VHA (Haro et al., 2003). La administración simultánea de vacuna e inmunoglobulina, debe proveer protección inmediata y a largo plazo en adultos. Sin embargo, los títulos de anti-VHA son 2 veces más bajos comparados con los observados cuando se administra sólo vacuna pero más de 100 por encima del nivel protector (Leentvaar-Kuijpers et al., 1992).

La OMS aconseja vacunar a la población de riesgo, como: viajeros jóvenes que se dirijan a zonas de alta endemicidad, manipuladores de alimentos, deportistas con viajes

frecuentes, trabajadores sanitarios, personal de instituciones para deficientes mentales, militares y personas que desempeñan ayudas humanitarias en áreas endémicas, adictos a drogas por vía parenteral, homosexuales, personal de limpieza y recogida de basuras, personal y niños de guarderías y pre-escolares, personas que residen en áreas donde existen brotes de hepatitis A frecuentemente, refugiados, entre otros (Hollinger y Emerson, 2001, Franco et al., 2003). Además, se recomienda vacunar a personas con enfermedad hepática crónica (Almasio y Amoroso, 2003). En EE.UU, la vacunación en niños que viven en áreas endémicas, ha sido altamente efectiva, produciendo una disminución de la incidencia en niños y adultos (Averhoff et al., 2001).

Es posible la eliminación de VHA porque: en personas susceptibles el ciclo viral se efectúa una sola vez, la inmunidad generada se mantiene por largo plazo, no existe un reservorio humano de personas crónicamente infectadas, existe un sólo serotipo y se encuentran licenciadas vacunas seguras y eficaces (Hollinger y Emerson, 2001).

II.6.3 Vigilancia de la hepatitis A

El sistema de vigilancia de las enfermedades es una herramienta para el control de las mismas. Puede ser activa o pasiva. El objetivo de la vigilancia de la hepatitis viral es proveer información serológica, demográfica y epidemiológica, que pueda ayudar en la formulación de estrategias y políticas para la prevención y control de estas enfermedades. Una parte importante de esta vigilancia es detectar cambios en la incidencia y diseminación de la infección y la enfermedad en la población. Las hepatitis agudas y crónicas son enfermedades notificables a las autoridades de Salud Pública. En los EE.UU la información en hepatitis se obtiene por tres sistemas de vigilancia (CDC, 2000, Fagan y Harrison, 2000).

Para analizar e interpretar las tendencias y patrones, identificar grupos de riesgo y determinar los mecanismos de transmisión, es importante la determinación precisa del agente específico. Es importante la definición de caso que manifiesta que un caso agudo debe incluir una enfermedad de comienzo discreto e ictericia o valores elevados de ALAT por encima de 2.5 su valor normal. El criterio serológico usado para distinguir la hepatitis tipo A fue: IgM anti VHA positiva, independientemente del estatus del HBsAg (CDC, 2000).

La notificación obligatoria de la hepatitis viral se inicio en Cuba en 1960 a través de tarjetas de Enfermedades de Declaración Obligatoria, en ellas estaban establecidos el reporte individual y detallado de los enfermos agudos con vivencias clínicas de la enfermedad y estudio de ALAT por encima de los valores de 12 UI. En 1987, se implantó el nuevo Programa de Prevención y Control de las hepatitis virales, con los objetivos de conocer la participación de las hepatitis A, B y No A No B dentro de las hepatitis virales y prevenir y controlar la transmisión de los virus A y B de la hepatitis. Se estableció la clasificación operacional por tipo a partir de la realización del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) a todo enfermo agudo diagnosticado, considerando como hepatitis B los que tuviesen resultados positivos. Los resultados del HBsAg negativos en los enfermos se consideraron casos de hepatitis A, sin antecedentes de exposición a sangre o hemoderivados, o riesgo parenteral. A partir de 1987, en que se clasificó el 11.8 % de las hepatitis virales agudas, este indicador se ha ido elevando hasta alcanzar en 1993 el 86.2 % de los casos diagnosticados. Otro hecho importante fue la implantación del diagnóstico de la hepatitis B y C en 1992 y 1995 respectivamente. En 1993, por acuerdo del MINSAP y a sugerencia de la Dirección Nacional de Epidemiología, se propone que el Laboratorio de Hepatitis virales del IPK pase a ser Centro de Referencia Nacional para el estudio de las hepatitis víricas.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.1 Línea celular, cepas y anticuerpos.

Los materiales que a continuación se explican, serán utilizados como reactivos comunes en los diferentes ensayos realizados.

III.1.1 Línea celular.

Se utilizó la línea celular continua derivada de riñón de mono *Rhesus* fetal, *Macaca mulata* (FRhK4), subcultivos 38-50, procedente de la *American Type Culture Collection* (ATCC CRL 1688), Rockville, Maryland, EE.UU, la cual fue cultivada en el Laboratorio de Cultivo Celulares del IPK en condiciones de esterilidad y mantenidas a 37 °C. Estas células son de morfología epitelial, crecen en cultivos dependientes de anclaje, se subcultivan a razón de 1:2 o 1:3 y su medio de crecimiento consistió en MEM-Dulbecco (MEM-D) al 50% suplementado con vitaminas, aminoácidos no esenciales, glutamina y suero fetal bovino (SFB) al 10% (el medio de mantenimiento contiene SFB al 2 %), como antibiótico se usó la gentamicina.

III.1.2 Cepas virales.

- Cepa de referencia de hepatitis A HAS-15, genotipo 1a, aislada en Arizona en 1979, pases 22 – 25 en células FRhK4 y gentilmente donada por el Instituto de Poliomieltis y Encefalitis Virales de la antigua URSS (IPEV) (Robertson et al, 1992).
- Cepa M2 clon C5, genotipo 1a, aislada en Cuba en 1991 por Más y col., pases 5 – 10 en células FRhK4.

III.1.3 Preparación del antígeno de la hepatitis A para ELISA.

Se utilizaron frascos plásticos Roller (Corning, EE.UU) de 850 cm² de superficie, con monocapa confluyente de células FRhK4. El virus semilla fue inoculado en la dilución 1:50 (título 1:8) en medio de mantenimiento, permaneciendo en contacto durante una hora a 37 °C. Cada siete días se realizó cambio de medio. Entre los 17 y 21 días se descartó el medio de crecimiento, se lavó dos veces la monocapa con tampón fosfato-salino (PBS) estéril y se cosechó el virus intracelular mediante siete ciclos de congelación y descongelación. Posteriormente, las células se centrifugaron a baja velocidad (500 g) y se obtuvo el sobrenadante, el cual es rico en partículas virales. A este sobrenadante se le

realizaron 6 ciclos de sonicación 30" x 30", amplitud de 15 micrones (Soniprep 150, MSE) y luego fue tratado con el detergente Nonidet P-40 al 0.5 % (v/v) y a 4 °C durante 30 minutos en agitación constante. El producto obtenido se centrifugó a 200 g durante 15 minutos, y el sobrenadante fue estabilizado con Albúmina Bovina Sérica (BSA) (BDH) al 1 % (p/v) e inactivado con Formaldehído (AnalaR) 1:2 000 durante tres días a 37 °C. El antígeno obtenido fue dispensado en ampulas de congelación y guardado a -70 °C hasta su uso (Kusov et al, 1987).

III.1.4 Inmunoglobulinas de recubrimiento.

Se utilizó el suero de un convaleciente de hepatitis A con un título 1:100 000 por ELISA de Inhibición comercial (Organon Teknika, Holanda). La fracción gamma se obtuvo por precipitación con una solución saturada de Sulfato de Amonio y luego se purificaron por Cromatografía de Intercambio Iónico. Se determinó la concentración proteica y se fijaron a la fase sólida diluidas en tampón Carbonato/Bicarbonato 0.05 M pH 9.5.

III.1.5. Preparación de los Conjugados.

Conjugado I: Se obtuvo a partir de un pool de sueros de convalecientes de título 1:10 000 al VHA, cuyas inmunoglobulinas fueron precipitadas con solución saturada de Sulfato de Amonio.

Conjugado II: Se obtuvo a partir de un suero hiperinmune procedente de un paciente convaleciente de hepatitis A, que presentaba un título superior a 1:100 000 mediante ELISA comercial Heparostika anti-HAV (Organon Teknika). Las inmunoglobulinas se precipitaron con solución saturada de Sulfato de Amonio y se purificaron mediante Cromatografía de Intercambio Iónico utilizando como matriz Superose 12, en equipo FPLC (*Fast Liquid Protein Chromathography*).

Ambas inmunoglobulinas fueron conjugadas con la enzima peroxidasa de rábano picante (Sigma, tipo VI) por el método del peryodato (Nakane y Kawoi, 1974). Posteriormente, el conjugado II fue purificado por igual método que las inmunoglobulinas.

El conjugado I fue utilizado en la normalización del ensayo de Captura de IgM-VHA utilizando la cepa de referencia HAS-15, mientras que el conjugado II se utilizó en el resto de los ensayos y en la preparación del juego de reactivos.

III.2 Ensayos tipo ELISA.

III.2.1 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA para la detección de IgM anti VHA.

III.2.1.1 Evaluación del ELISA de Captura de IgM utilizando como antígeno la cepa de referencia HAS-15.

III.2.1.1.1 Muestras

Se estudiaron 48 muestras de sueros de Banco de sangre para definir el valor de corte del ensayo. Para la evaluación y comparación del ensayo se estudiaron 84 muestras de sueros procedentes de pacientes con las siguientes características:

- 51 con diagnóstico clínico de hepatitis viral aguda (HVA).
- 3 con antecedentes de hepatitis crónica.
- 5 con valores elevados en sangre de la enzima ALAT.
- 3 con síntomas generales inespecíficos.
- 22 de contactos y enfermos en brotes de HVA en círculos infantiles y escuelas de Ciudad de la Habana.

Todas las muestras fueron conservadas a temperatura de - 70 °C hasta su procesamiento.

III.2.1.1.2 Procedimiento del ELISA de Captura de IgM.

Se siguió la metodología del ELISA de Captura según Duermeyer, 1980. Se recubrieron las placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos (Dynatech, Alemania) con 100 µL por pocillo de anti-IgM humana (Sigma, EE.UU) (concentraciones 1, 2.5, 5 y 10 µg/mL) diluidas en tampón Carbonato/Bicarbonato 0.05 M pH 9.6 y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 18 a 24 horas. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS más Tween 20 (BDH) al 0.05% (PBS-T) y se colocaron 50 µl de los sueros controles (4 negativos y 2 positivos) y 50 uL de los sueros a ensayar diluidos 1:1000 en PBS-T (por duplicado). Después de 4 horas de incubación a 37 °C se lavó 4 veces la placa y se añadió 50 uL del antígeno (diluciones al doble desde 1:2 hasta 1:32) diluido en tampón de dilución (PBS-T más suero humano negativo (SHN) a anticuerpos contra el VHA al 5%). Se incubó toda la noche a TA. Al tercer día, después de 4 lavados con PBS-T, se añadió 50 µL de conjugado anti-VHA/peroxidasa (diluciones 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1 000 y 1:2 000) en tampón de dilución, el cual se incubó a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos. Posteriormente se realizaron 5 lavados y se añadió el sustrato consistente en 25 mL de

tampón fosfato-citrato 0.1 M pH 5.0, 10 µg de OPD (Merck) y 2 uL de peróxido de hidrógeno (BDH) al 30%, se incubó la placa 30 minutos en oscuridad a TA y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico al 12.5%. La lectura se realizó en un lector de placas de microELISA (Titertek Multiskan) con filtro de longitud de onda de 492 nm. En la Figura 4 se muestra un esquema del ELISA de Captura de IgM.

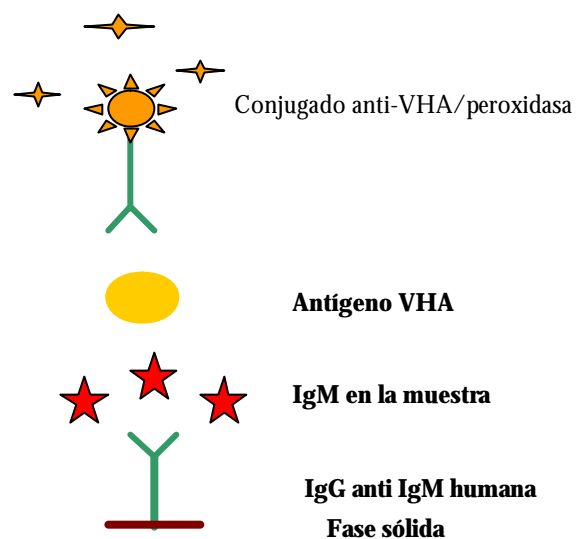


Figura 4: ELISA de Captura de IgM anti-VHA.

Criterios de validez de la prueba: Para verificar la validez de los resultados obtenidos tiene que cumplirse que el promedio de los valores de DO de los controles negativos (X_n) sea menor que 0.2 y que la relación positivo / negativo debe ser mayor que 5, siguiendo los criterios de Voller et al., 1979 y Crowther, 1995.

Criterio de positividad: Se consideran positivos aquellas muestras cuya DO sea mayor o igual al valor de corte.

III.2.1.1.3 Determinación de las condiciones óptimas de los ensayos :

El análisis de las condiciones de recubrimiento y de las diluciones óptimas de las muestras, el antígeno y el conjugado se hicieron por titulación cruzada (Bunch et al., 1990). Se mantuvieron constantes la temperatura y el tiempo de sensibilización de las placas, así como el volumen del pocillo y los tampones empleados.

Criterios de selección de las variables de estandarización:

- Concentración óptima de recubrimiento: Se definió como aquella con la que se alcanzó la meseta de mayor señal con el suero control positivo y la menor con el suero control negativo (Ochoa et al., 2000b).
- Dilución de la muestra problema. Se definió como dilución de trabajo 1:1000 basándose en los criterios de la literatura y en estudios previos realizados (Duermeyer, 1980).
- Dilución del antígeno y el conjugado: Se definió como la mayor dilución de antígeno y conjugado que mostraron una mayor discriminación entre los sueros controles positivos y negativos, que presentaran además una DO entre 1.0 y 1.5 logrando así una mayor economía de los reactivos (Voller et al., 1979, Crowther, 1995, Ochoa et al., 2000b).

En todos los casos se tuvieron en cuenta los resultados alcanzados con las pruebas de validación como criterio definitivo de una adecuada estandarización (Ochoa et al., 2000b).

III.2.1.1.4 Parámetros de validación.

- Precisión: Los experimentos de repetibilidad y reproducibilidad preliminar, se realizaron ensayando cinco réplicas de cada muestra en tres series sucesivas, utilizando tanto los controles positivos y negativos, como sueros positivos altos, positivos intermedios, bajos y negativos. Para expresar las variaciones se empleó el coeficiente de variación. Se utilizó como criterio menos del 10% en la imprecisión intraensayo y del 15% en la imprecisión interensayo (Porstmann y Kiessig, 1992, Foscecco y Curtis, 2003).
- Definición del valor de corte del ensayo: El valor de corte del ensayo fue definido a partir de una distribución de absorbancia de paneles de sueros negativos y positivos mediante histograma de frecuencia para un intervalo de confianza del 95%.

III.2.1.1.5 Controles

Se usaron sueros humanos positivos y negativos conocidos, determinados por el juego comercial "Diag-A-Hep".

III.2.1.1.6 Inmunoensayo de referencia

Para la comparación de nuestros resultados se usó el ELISA de Captura de IgM “Diag-A-Hep” gentilmente donado por el IPEV (Kalashnikova et al., 1991).

III.2.1.2 Evaluación del ELISA de Captura de IgM utilizando como antígeno la cepa M2 clon C5.

III.2.1.2.1 Muestras y procedimiento.

Se estudiaron 170 muestras de sueros que llegaron al Laboratorio de hepatitis del IPK para ser analizados mediante IgM-VHA, procedentes de diferentes centros e instituciones de salud del país. Se siguió igual proceder y criterios que el ELISA de Captura descrito en el acápite III.2.1.1.2, así como las determinaciones óptimas de los ensayos y los parámetros de validación. El antígeno utilizado provenía del cultivo de la cepa cubana M2 clon C5 (diluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:25) y el conjugado utilizado fue el II a las diluciones 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 y 1:2000.

III.2.1.2.3 Inmunoensayo de referencia.

Para la evaluación de los resultados se utilizó el juego comercial Hepanostika anti-HAV IgM de la firma Organon Teknika.

III.2.1.3 Reducción de los tiempos de incubación del ELISA IgM-VHA (24 horas).

III.2.1.3.1 Muestras.

Se utilizaron 100 muestras de sueros que habían sido procesadas por el ELISA IgM-VHA, previamente normalizado y validado en el laboratorio, con una duración de 48 horas. De ellas 56 eran positivas y 44 negativas. Se estudiaron además, 20 sueros, de los cuales 10 eran positivos a IgM del virus de la rubeola y 10 eran positivos a IgM del virus dengue. El objetivo del mismo fue estudiar la reactividad cruzada de sueros IgM positivos a otros agentes virales.

III.2.1.3.2 Procedimiento del ELISA de Captura de IgM anti-VHA en 24 horas.

Se fijaron a la placa de poliestireno (MaxiSorp, F8 Nunc, desmontable en 12 tiras, Dinamarca) 100 µl de anti-µ humana (Centro de Inmunoensayo (CIE), La Habana, Cuba) a la concentración definida en acápite III.2.1.1.3 y diluido en buffer Carbonato-Bicarbonato 0.05 M pH 9.5. Se incubaron toda la noche a TA. Al día siguiente, se bloqueó la placa con sacarosa (6% p/v) y BSA (5% p/v) incubándose 1 hora a 37 °C. Después de 3 lavados, se añadieron 50 µL de los sueros controles (4 negativos y 2

positivos) y sueros problemas (por duplicado) a la dilución 1:1 000 en PBS-T, incubándose durante 1 hora a 37°C. Luego de 4 lavados con PBS-T, se adicionaron 50 µL del antígeno del VHA a la dilución definida en el acápite III.2.1.2.1 en tampón de dilución; este reactivo se incubó 2 horas a 37°C. Posteriormente se agregó el conjugado anti-VHA/peroxidasa (50 µL) a la dilución definida en acápite III.2.1.2.1 en tampón de dilución, el cual se incubó durante 1 hora a 37°C. Se lavó 5 veces la placa con PBS-T. Por último, se añadió 50 µL de sustrato, compuesto por 5 mg de OPD, 5 mL de buffer fosfato-citrato 0.1 M pH 5.0 y 2 µL de peróxido de hidrógeno (30%), deteniéndose la reacción a los 15 minutos con 50 µL de Ácido Sulfúrico al 12.5%. La lectura se realizó en un lector MicroELISA (Titertek Multiskan) a una longitud de onda de 492 nm.

Criterios de validez de la prueba: Para verificar la validez de los resultados obtenidos tiene que cumplirse que X_{η} sea menor que 0.2 y que la relación positivo / negativo debe ser mayor que 5, siguiendo los criterios de Voller et al., 1979 y Crowther, 1995.

Determinación del valor de corte: El valor de corte se halló multiplicando la media del valor de los controles negativos válidos por la constante definida en el acápite III.2.1.1.4.

Criterio de positividad: Se consideran positivos aquellas muestras cuya DO sea mayor o igual al valor de corte.

III.2.1.3.3 Análisis estadístico.

Se usó el Coeficiente de Correlación ajustado (R^2) utilizando el paquete NCSS instalado en una computadora personal Pentium 4.

III.2.1.4 Toma de muestra de sangre adsorbida en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM anti-VHA.

III.2.1.4.1 Muestras.

Para evaluar la utilidad de la toma de muestra de sangre adsorbida en papel de filtro, se estudiaron simultáneamente un total de 168 muestras de suero y sangre colectada en papel de filtro (Blood Sampling Paper, Nobuto's tipo I, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Tokio, Japón) en los laboratorios clínicos del IPK y del Instituto de Gastroenterología (IGE).

- **IPK:** Se tomaron 68 muestras de suero y papel de filtro, de estas 16 correspondieron a pacientes clínicamente sospechosos de HVA y 52 a pacientes con patologías no relacionadas con esta entidad.

- **IGE:** Se obtuvieron 100 muestras de suero y papel de filtro, procedentes de pacientes clínicamente sospechosos de HVA.

Para el estudio de aplicación del método de recolección de muestras de sangre total en papel de filtro, en el diagnóstico virológico de la Hepatitis A, se tomaron 4 muestras de casos clínicos sospechosos de hepatitis viral tipo A en la sala de Gastroenterología del Hospital Militar "Luis Díaz Soto". Se estudiaron además, 97 muestras procedentes de un brote de hepatitis viral ocurrido en el Círculo Infantil "Juan Alvarado", del municipio La Lisa, en Ciudad de la Habana.

III.2.1.4.2 Toma de muestra y proceso de elución de los anticuerpos.

Se obtuvo por punción con lanceta estéril del pulpejo del dedo pulgar, previa limpieza de la zona. Se dejó absorber la sangre por el área indicada por el fabricante (Zona A, de 30 mm de largo y 5 mm de ancho) de forma uniforme y por ambos lados. Previamente cada papel de filtro había sido rotulado (Zona B, 18 mm de largo y 10 mm de ancho).

Una vez que la sangre fue absorbida, se dejó secar en posición vertical, con la Zona B hacia abajo a TA. En todos los casos se siguieron las siguientes instrucciones: evitar la exposición a temperaturas elevadas, a la luz solar directa y a gases tóxicos que pudieran inhibir la extracción del anticuerpo del papel de filtro. Posteriormente se guardó el papel de filtro a 4°C hasta el momento en que se realizó la elusión.

El papel de filtro tipo I está diseñado para absorber un volumen fijo de sangre en el área señalada y la elusión es el proceso que permite que los anticuerpos sean extraídos. El día anterior a la realización de la prueba serológica, el área de absorción sanguínea fue cortada con unas tijeras en 3-4 partes y colocada en 400 µl de PBS pH 7.2 en tubos eppendorf, los que fueron guardados a temperatura de 4°C toda la noche. Esta solución se corresponde con la dilución 1:10 del suero.

III.2.1.4.3 ELISA de Captura de IgM anti-VHA.

Se utilizó el ELISA de Captura de IgM-VHA, cuyo procedimiento se describe en el acápite III.2.1.3.2. Los eluados del papel de filtro se añadieron en 3 diluciones diferentes: 1:100, 1:500 y 1:1 000.

III.2.1.4.4 Análisis estadístico.

Se utilizó el Coeficiente de Correlación de Spearman (R).

III.2.1.5 Aplicación del ELISA de Captura IgM-VHA en el diagnóstico y la vigilancia de la hepatitis A.

III.2.1.5.1 Muestras

- Todas las muestras de sueros recibidas en el laboratorio de Referencia Nacional de Hepatitis viral para diagnóstico de hepatitis A en el período 1991-2003.
- 1266 muestras de sueros correspondientes a 129 brotes de HVA ocurridos en todo el país en un período de 11 años (1992-2003).
- 58 sueros de pacientes con diagnóstico de FHF (graves o fallecidos) procedentes de todo el país en un período de 7 años (1997-2003).

III.2.2 Detección de IgM anti-VHA en muestras de orina.

III.2.2.1 Muestras.

Para llevar a cabo el estudio se colectaron las siguientes muestras:

- 30 muestras pareadas de suero y orina de individuos sanos (controles sanos)
- 217 muestras pareadas de suero y orina procedentes de 6 brotes epidémicos de HVA y casos clínicos aislados.
- 60 muestras de orina colectadas en epidemias de HVA en los primeros 15 días de comenzado los síntomas o el movimiento de las enzimas aminotransferasas.

Se seleccionaron además, 29 muestras de orinas positivas (procedentes de uno de los brotes epidémicos en población cerrada) para el estudio de estabilidad de la IgM en el tiempo a diferentes temperaturas, de las cuales se almacenaron alicuotas a -70°C y a 4°C . Las mismas fueron analizadas cada un mes por un período de tres meses. Para el estudio de la cinética de la IgM en suero y orina a través del tiempo, se analizaron siete muestras procedentes de un brote en paralelo, determinándose la IgM a los dos y seis meses.

Condiciones de las muestras de orina: Las muestras de orina fueron tomadas en las primeras horas de la mañana y se colectaron en frascos completamente limpios y secos, almacenándose a 4°C hasta su posterior uso al igual que el suero.

III.2.2.2 Detección de la IgM anti-VHA.

Para la determinación de la IgM anti-VHA en ambas muestras se empleó el ELISA de Captura de IgM-VHA para muestras de suero (ver acápite III.2.1.3.2). Las muestras de orina se añadieron sin dilución previa, y los resultados de DO de las mismas se dividieron

por la media de las cuatro réplicas de los controles negativos de suero del ensayo (T:N, por las siglas en inglés *Test:Negative*), con el objetivo de disminuir el error interensayo, siguiendo los criterios de Perry y col., 1992.

III.2.2.3 Análisis estadístico.

Se utilizó el paquete estadístico “MS Estadística” instalado en una computadora personal Pentium 2, para realizar un ajuste de distribución mediante la prueba “Kolmogorov-Smirnov”, la prueba t de “Students” para muestras pareadas, análisis de varianza y la distribución de frecuencias de las respuestas mediante histograma. Se utilizó además, el programa Graph Pad Prism 2.0, 1995, instalado en una computadora personal Pentium 4.

III.2.3 Detección de IgA anti-VHA en suero (IgA sérica) y en saliva (IgA secretora).

III.2.3.1 Muestras.

Fueron estudiadas 175 personas de los cuales se extrajeron muestras de suero sanguíneo y en 109 de ellas muestras de saliva. De las 175 personas, se constituyeron dos grupos:

Grupo A: Formado por 97 pacientes sospechosos de padecer una infección por el VHA o sus contactos.

Grupo B: Formado por 78 personas sanas sin historia de haber estado en contacto reciente con pacientes infectados por el VHA.

De las 109 muestras de saliva, 93 se obtuvieron del grupo A y 16 del grupo B. Las muestras de suero y saliva fueron conservadas a - 20 °C por no más de una semana antes de ser analizadas.

III.2.3.2 Determinación de IgA específica al VHA.

Tanto para muestras de suero como de saliva, se utilizó un ELISA de Captura siguiendo una metodología similar a la usada para determinar IgM con algunas modificaciones (Duermeyer, 1980). Las placas de Cloruro de polivinilo (Dynatech, Alemania) se sensibilizaron con inmunoglobulinas de carnero anti-IgA purificadas por cromatografía de intercambio iónico suministrado por el CIE (concentraciones 1, 2, 5 y 10 µg/mL). Estas se diluyeron en buffer carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9.6 y se incubaron durante 20 horas a TA. Luego se lavó 3 veces con PBS-T al 0.05 %. Posteriormente se añadieron 50 µL de los controles (4 negativos y 2 positivos) y 50 µL de la muestra de suero diluida 1:100 o en caso de la muestra de saliva, esta se añadió pura, es decir, sin diluir. Se incubó

1 hora a 37 °C. Luego de tres lavados con PBS-T se añadió el antígeno de VHA (diluciones al doble desde 1:2 hasta 1:32). Después de 2 horas de incubación a 37 °C se lavó 4 veces con PBS-T. El próximo paso fue añadir el conjugado anti-VHA/peroxidasa diluido en PBS-T conteniendo 5 % SHN (diluciones 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 000 y 1:2 000). Se incubó a 37 °C y se lavó la placa 5 veces con PBS-T. El último paso fue añadir el sustrato compuesto por 5 mg de OPD, 5 ml de buffer fosfato-citrato 0.1 M pH 5.0 y 2 µl de peróxido de hidrógeno (30%) y se detuvo la reacción a los 30 minutos con ácido sulfúrico al 12.5 % utilizando 50 uL por pozo.

Determinación del valor de corte. El valor de corte se determinó multiplicando la media del valor de los controles negativos por la constante definida en el acápite III.2.1.1.4.

Criterio de positividad. Se consideraron positivas aquellas muestras cuyos valores de DO fueran iguales o mayores al valor de corte.

Para la determinación de las condiciones óptimas de los ensayos, se siguieron los criterios definidos en el acápite III.2.1.3.

III.2.4 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Inhibición para la detección de anticuerpos totales contra el VHA.

III.2.4.1 Muestras y sueros controles.

Para la normalización del ensayo se utilizó un suero control positivo procedente de un individuo convaleciente de Hepatitis A, cuyo cuadro clínico fue confirmado mediante la detección de IgM anti-VHA. Como control negativo se empleó un suero negativo a los marcadores del VHA. Los sueros controles fueron confirmados a través de un ELISA comercial, que detecta anticuerpos totales contra el VHA (Hepanostika anti-HAV, Organon Teknika).

Para la evaluación del ensayo se utilizó un panel de 38 sueros de población normal, cuya selección se basó en sueros cuyos porcentajes de inhibición cubrieran un amplio rango y que incluyera además sueros próximos al valor de corte.

Se analizaron 35 preparados de inmunoglobulinas (dos de ellas Igegam) producidos en el Centro de Hemoderivados, La Habana, Cuba.

Para la determinación del Límite de Detección se empleó una preparación de inmunoglobulina estándar de la OMS, la cual contiene 100 mUI/mL de inmunoglobulina

anti-Hepatitis A, donada gentilmente por el “*Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service*” de Holanda.

III.2.4.2 Procedimiento del ELISA de Inhibición.

Para la normalización del sistema se siguieron los criterios de Lamarca y col en 1991 y algunos parámetros del juego comercial Hapanostika anti-HAV con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos específicos presentes en la muestra de inhibir la unión del conjugado anti-VHA/peroxidasa. Las placas de poliestireno (Costar, EE.UU) fueron sensibilizadas con 100 uL por pocillo de inmunoglobulinas humanas anti-VHA a las concentraciones de 10, 15, 20 y 25 µg/mL en solución tamponada de carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.5. Se incubaron toda la noche a TA en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T. Se añadieron 50 uL de los sueros controles y de cada suero a analizar, diluidos 1:10 y 1:50 en PBS-T. Inmediatamente se añadió 50 uL de antígeno del VHA puro (P) y diluidos 1:2, 1:5 y 1:10 en tampón de dilución. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C ó 50 °C en cámara húmeda. Pasado este tiempo se lavaron cuatro veces con PBS-T y se le añadió 100 uL de conjugado anti-VHA / peroxidasa a las diluciones 1:500, 1:1 000, 1:1 500 y 1:2 000 en tampón de dilución. Se incubó durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y se lavó cinco veces con PBS-T. Posteriormente se añadió 100 uL de sustrato compuesto por 10 mg de OPD, 10 mL de buffer fosfato-citrato 0.1 M pH 5.0 y 4 µL de peróxido de hidrógeno (30%). La reacción se detuvo a los 15 minutos añadiendo 100 µL de ácido sulfúrico al 12.5 %. La lectura se realizó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 492 nm. Las muestras de suero que mostraban una inhibición mayor o igual al 50%, al ser comparadas con el suero control negativo, fueron consideradas positivas para anticuerpos anti-VHA totales. En la Figura 6 se muestra un esquema del ELISA de Inhibición.

Fórmula: % **Inhibición** = $(N - M) / (N - P) \times 100$, donde:

N = Media de los valores de DO de los Controles Negativos.

M = Media de los valores de DO de la Muestra.

P = Media de los valores de DO de los Controles Positivos.

Validez del ensayo: X_p debe ser menor de 0.2 y la relación negativo / positivo debe ser igual o mayor que 10, siguiendo los criterios de Voller et al., 1979 y Crowther, 1995.

III.2.4.3 Determinación de las condiciones óptimas de los ensayos.

La concentración óptima de saturación y la dilución del antígeno y conjugado se definieron de igual forma que en el acápite III.2.1.1.3, la determinación de la temperatura óptima de incubación de la muestra y el antígeno se definió como aquella que mayor discriminación entre los sueros controles positivos y negativos nos permitió establecer.

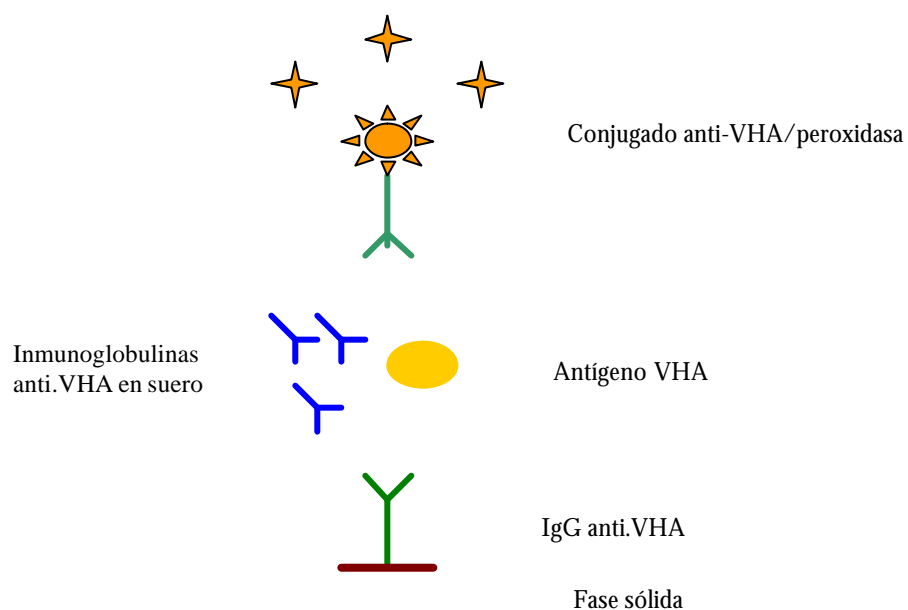


Figura 6: ELISA de Inhibición.

III.2.4.4 Límite de Detección y Dosis Cero.

Límite de Detección se define como la menor concentración del analito detectada por el ensayo. Estadísticamente es la menor concentración del analito excediendo la precisión de la dosis cero. **Dosis cero** es la dilución donde comienza la asíntota superior, o sea donde el ensayo no discrimina las variaciones de la concentración del analito (Porstmann y Kiesssig, 1992).

Se realizaron diluciones seriadas en base 2 de la preparación de inmunoglobulina estándar de la OMS en PBS-T con SHN al 10 % (Victor et al, 1994). Se utilizaron cuatro réplicas por cada dilución.

III.2.4.4 Análisis estadístico.

Los datos de absorbancia fueron ajustados mediante regresión no lineal, utilizando para ello una función logística de cuatro parámetros (Karpinski et al., 1987, Karpinski, 1990). La absorbancia en el límite de detección se estableció como la media de los valores de absorbancia de la dosis cero menos tres veces la desviación estándar.

Fórmula: **DO Límite = DO dosis cero - 3*** (Desviación estándar de la dosis cero).

III.2.5 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA tipo Sándwich o de doble anticuerpo para la detección del VHA en muestras clínicas de heces y en cultivos celulares.

III.2.5.1 Muestras.

Se recogieron 60 muestras de heces procedentes de casos clínicos de pacientes con sospecha de hepatitis viral aguda. Además, 346 muestras de heces y 372 muestras de sueros procedentes de 19 brotes de HVA ocurridos en Ciudad de la Habana en el período 1996-1998. De estos brotes seis ocurrieron en círculos infantiles, dos en escuelas (una primaria y una secundaria), cinco en prisiones, dos en población abierta, dos dentro de familias, una en una unidad militar y una en una brigada de la policía.

III.2.5.2 Procesamiento de las heces para la detección del VHA mediante ELISA.

Se realizó una suspensión al 20% (p/v) de las heces. En un tubo de centrífuga con 5 perlas de cristal en el fondo, se añadieron cinco mL de PBS y se agregaron un gramo de las heces a analizar. Se homogeneizó el contenido mediante agitación en zaranda a TA durante 20-30 minutos. Se centrifugó a 2 000 g durante 30 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en tubos eppendorf, el cual fue almacenado a temperatura de -70°C hasta su posterior análisis (Robertson y Bradley, 1995).

III.2.5.3 Controles

Como controles positivos se utilizaron tanto heces positivas al VHA determinadas por reactivos procedentes del IPEV, como antígeno de la hepatitis A, cepa M2 clon C5 producidas en células FRhK4, estabilizadas e inactivadas. Como controles negativos se utilizaron heces negativas y células FRhK4 sin inocular y procesadas de la misma manera que el antígeno específico.

III.2.5.4 Procedimiento del ELISA Sándwich o de doble anticuerpo.

Se siguieron los criterios de Duermeier, 1980. Las placas de poliestireno (Costar, EE.UU) fueron sensibilizadas con 100 μ L de inmunoglobulinas anti.VHA a las concentraciones de 1, 2.5, 5, 10 y 15 μ g/mL en tampón Carbonato/Bicarbonato 0.01 M pH 9.5 e incubadas toda la noche (18-24 horas) a TA. Después de 3 lavados con PBS-T se añadieron 100 μ L de los controles de la prueba (4 negativos y 2 positivos) y las suspensiones al 20% (p/v) de las heces a analizar (por duplicado). Para la incubación de la muestra se siguieron dos protocolos: 4 horas a 37 $^{\circ}$ C ó toda la noche a TA. Luego se realizaron 4 lavados con PBS-T y se añadió 100 μ L de conjugado anti-VHA/peroxidasa a las diluciones 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 000 y 1:2 000 en tampón de dilución y se incubó durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Se realizaron 5 lavados con PBS-T y se añadió el sustrato compuesto por 10 mg de OPD, 10 mL de buffer fosfato-citrato 0.1 M pH 5 y 4 μ L de peróxido de hidrógeno (30%). La reacción se detuvo a los 15 minutos añadiendo 100 μ L de ácido sulfúrico al 12.5 %. En la Figura 5 se muestra un esquema del ELISA Sándwich o de doble anticuerpo.

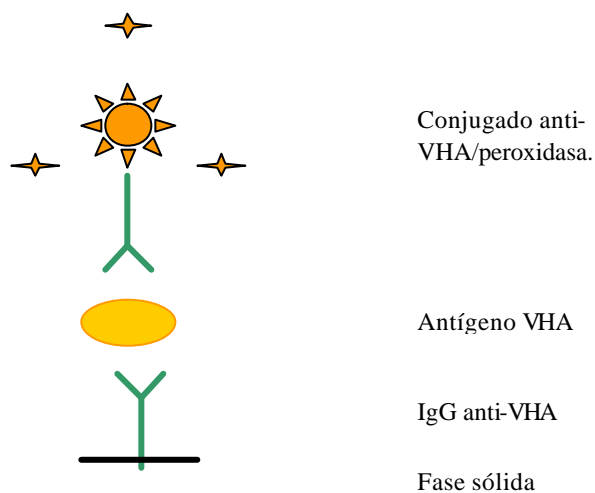


Figura 5: ELISA Sándwich o de doble anticuerpo

Criterios de validez del ensayo. X_n debe ser menor de 0.2 y la relación positivo / negativo debe ser igual o mayor que 10, siguiendo los criterios de Voller et al., 1979 y Crowther, 1995.

III.2.5.5 Determinación de las condiciones óptimas de los ensayos y los parámetros de validación.

La concentración óptima de saturación y la dilución del conjugado se definieron de igual forma que en el acápite III.2.1.3. El valor de corte se estableció siguiendo los criterios de Duermeyer, 1980, para la determinación de virus en muestras de heces, definiendo como valor de corte: $2.1 X_n$.

Donde 2.1 es una constante.

III.2.5.6 Inmunoensayo de Referencia.

Se utilizó un sistema de determinación del VHA en muestras de heces desarrollado por el IPEV

II.2.5.7 Titulación de la infectividad del VHA.

III.2.5.7.1 Virus y células.

Se utilizó como fuente de virus la cepa M2 clon C5 producida en células FRhK4. Después de 21 días de crecimiento, se descartó el medio, se lavó la monocapa 2 veces con PBS y se cosechó el virus intracelular, efectuándose siete ciclos de congelación y descongelación. Posteriormente, se dispensó en alícuotas, las cuales fueron conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al momento de su uso se descongeló un ampulla, se trató con igual volumen de cloroformo y se realizaron diluciones en base 10 (desde 1 hasta 8) en medio de mantenimiento. Se utilizaron las células FRhK4 a la concentración de 200.000 cel/mL en medio de mantenimiento.

III.2.5.7.2 Titulación viral.

Se siguieron los criterios de Krah, 1991 y Borovec y Unen, 1997, con algunas modificaciones. Se emplearon placas de 96 pocillos para cultivos celulares de fondo plano (Costar, EE.UU) en las cuales se añadieron 50 uL de las células. Posteriormente se añadieron 50 uL del virus (8 réplicas de cada dilución). Se incluyeron controles de células. Se homogeneizó la mezcla suavemente y se incubó en atmósfera de 5% de CO_2 durante 21 días. Semanalmente se añadieron 50 uL de medio de mantenimiento. Se realizó la cosecha viral a través de 7 ciclos de congelación y descongelación. Los resultados se revelaron mediante ELISA tipo Sándwich. El 50% de la dosis infectiva en cultivos celulares ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) se calculó utilizando el método descrito por Reed y Muench en 1938.

III.2.6 Conformación de un juego diagnóstico para la detección de IgM anti-VHA en suero. Descentralización del diagnóstico a otras regiones del país.

La conformación del juego diagnóstico estuvo dirigida a que su presentación fuera simple y conveniente. Además, que pudiera realizarse con condiciones y equipamiento mínimo de los laboratorios.

III.2.6.1 Preparación de los reactivos.

Placas de poliestireno: Compuestas por 12 tiras desmontables (MaxiSorp, F8 Nunc, desmontable en 12 tiras, Dinamarca) fueron sensibilizadas con anti-IgM humana (CIE, Habana, Cuba) diluidas en tampón Carbonato/Bicarbonato y mantenidas a 4 °C durante toda la noche.

Las placas fueron bloqueadas con albúmina y sacarosa. Después de lavadas se secaron y se guardaron selladas en sobres de aluminio.

Controles: Se utilizaron sueros positivos obtenidos de pacientes con hepatitis aguda tipo A y sueros negativos procedentes de pacientes sin esta enfermedad. Los sueros fueron analizados para la detección de VIH, HBsAg y VHC.

Antígeno: Se utilizó la cepa cubana M2 clon C5, estabilizada, inactivada, y congelada a -20 °C.

Conjugada Se utilizó conjugado anti-VHA / peroxidasa dispensado en predilución.

Sustrato: OPD en buffer fosfato-citrato liofilizado.

Se incluyeron además, tampón de lavado, SHN, peróxido de hidrógeno y Tween-20.

Todos los reactivos fueron probados, solos o combinados, a 4 °C y 37 °C. Los reactivos a 4 °C fueron probados durante un año y a 37 °C durante una semana, para observar la estabilidad de los productos.

III.2.6.2 Descentralización del diagnóstico.

Se realizó en los laboratorios del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Santiago de Cuba (CPHE-SC) y del IGE.

III.3 Otras técnicas comerciales utilizadas en el estudio.

1. UMELISA HBsAg PLUS (SUMA, CIE), para la detección del HBsAg en suero.
2. HBsAg CONFIRMATORY TEST (SUMA, CIE), para la confirmación del HBsAg en suero.

3. UMELISA HCV (SUMA, CIE), para la detección de anticuerpos contra el VHC en suero.
4. IgM anti-VHE (ELISA, MBC/AMRAD HEPATITIS E IgM DIAGNOSTIC KIT, Australia), para la detección de la IgM anti-VHE en suero.

III.4 Aspectos éticos de la investigación.

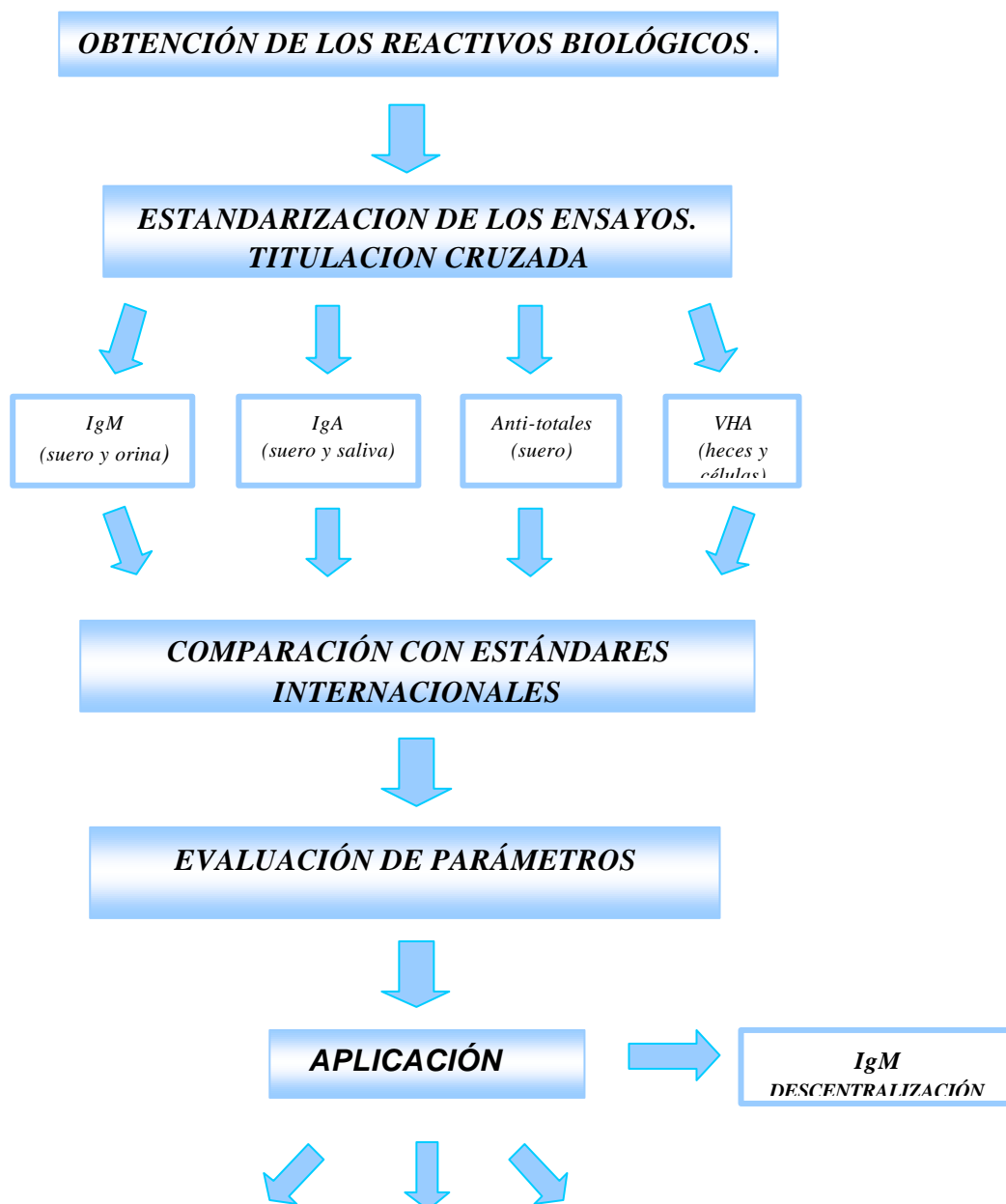
En los diferentes estudios descritos, primeramente se brindó la información y posteriormente se recogió el consentimiento informado verbal de los voluntarios participantes. Fue una premisa esencial la información de los resultados obtenidos.

III.5 Procesamiento estadístico general de los resultados.

Dada la amplitud de este trabajo, se describieron en cada procedimiento los métodos estadísticos específicos empleados. De forma general se utilizaron los métodos de estadística descriptiva para analizar y presentar los resultados obtenidos. Se determinaron los porcentajes de Sensibilidad, Especificidad, Concordancia, VPP y VPN, RP+ y RP- y el Índice de Kappa, así como los Intervalos de Confianza con un 95 % de confiabilidad (IC 95%) para comparar los sistemas ELISA desarrollados y las diferentes muestras utilizadas. Se utilizaron las tablas de contingencia 2 x 2.

III.6 Diagrama de flujo.

Para una mejor comprensión se muestra un diagrama de flujo que resume la estrategia seguida en cada ensayo.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Captura para la detección de anticuerpos IgM contra el VHA (IgM-VHA).

La variante de Captura de IgM se utiliza para detectar esta subclase de anticuerpos, impidiendo que otras inmunoglobulinas o el FR interfieran significativamente en el ensayo. En hepatitis A, ha sido la variante que mejor resultado ha tenido en cuanto a sensibilidad y especificidad. En esta enfermedad, la IgM se eleva al final del período de incubación y se mantiene positiva de tres a seis meses en prácticamente más del 99% de los individuos infectados, constituyendo el estándar del diagnóstico (Duermeyer, 1980, Lemon, 1997).

Una vez obtenidos los reactivos biológicos necesarios, se seleccionaron las concentraciones de los mismos y las condiciones de reacción mediante ensayos de titulación cruzada de estos. Finalmente, se escogieron aquellas que ofrecieron una adecuada discriminación entre los sueros de referencia utilizados y un grado de homogeneidad, rapidez y economía aceptable para los procedimientos propuestos.

IV.1.1 Evaluación del ELISA de Captura IgM-VHA utilizando como antígeno la cepa de referencia HAS-15.

IV.1.1.1 Determinación de la concentración de saturación, de la dilución óptima del antígeno, el conjugado, el suero y el valor de corte del ensayo.

En la Figura 7 se presentan los resultados obtenidos al graficar los valores de DO a diferentes concentraciones de la IgG anti-IgM humana, utilizando el suero diluido 1:1 000, el antígeno de referencia 1:8 y el conjugado 1:800. Como se observa, a partir de 5 µg/mL se alcanza la meseta de la curva, considerándose esta como la concentración óptima de saturación.

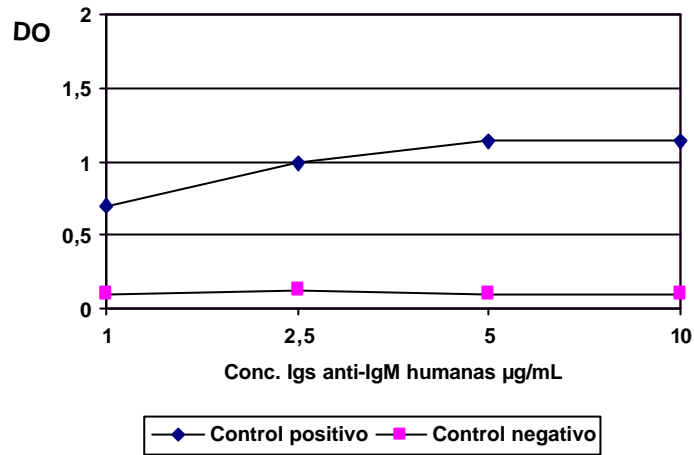


Figura 7: Determinación de la concentración óptima de saturación.

En la Figura 8 se observan los resultados obtenidos para las diferentes diluciones de antígeno, utilizando como concentración de saturación 5 µg/mL de anti-IgM y como dilución del conjugado 1:800. La mejor relación positivo / negativo se obtuvo para la dilución 1:8 del antígeno de referencia.

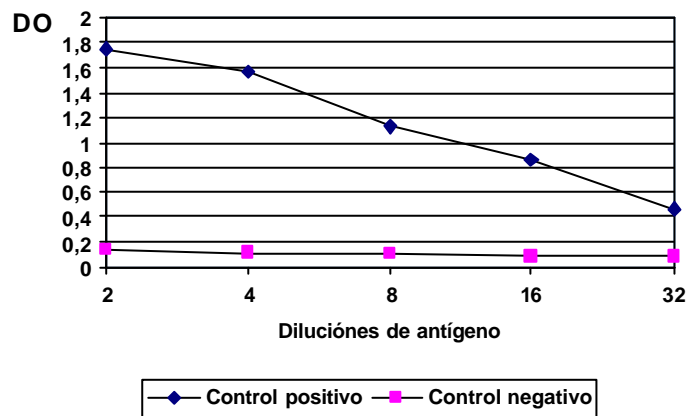


Figura 8: Determinación de la dilución óptima del antígeno.

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos al graficar las DO para las diferentes concentraciones del conjugado, al utilizar 5 µg/mL de anti-IgM, dilución 1:1 000 de los sueros y dilución del antígeno 1:8. Se observa que la mejor relación positivo / negativo se obtuvo a la dilución 1:800 del conjugado.

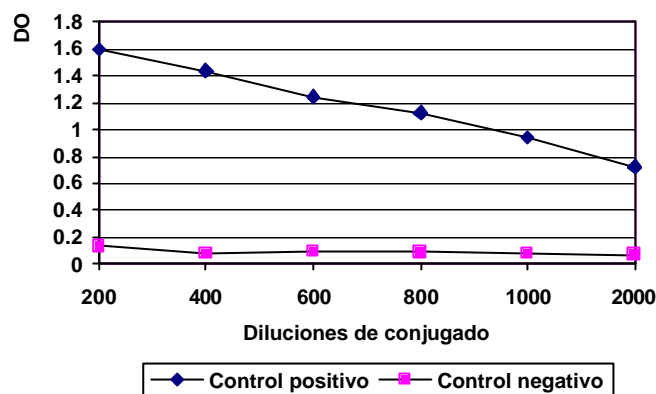


Figura 9: Determinación de la dilución óptima del conjugado.

Se estableció el valor 2.1 como la constante que multiplicado por la media de los controles negativos, nos definiría el valor de corte del ensayo.

En cuanto a los criterios de selección de cada una de las variables de estandarización, la concentración óptima de recubrimiento y las diluciones del antígeno y el conjugado fueron adecuadas, lográndose una buena discriminación entre los sueros controles positivos y negativos utilizados. Generalmente valores entre 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son suficientes para garantizar una buena saturación. Concentraciones elevadas pueden provocar disminución de la sensibilidad por formación de sobrecapas de moléculas débilmente adsorbidas que se eluyen en los pasos de lavados subsiguientes (efecto gancho) (Crowther, 1995, Ochoa et al., 2000b)

La dilución de la muestra de suero problema resultó adecuada con nuestras condiciones, otros autores, han utilizado también diluciones altas de las muestras de sueros para evitar el fenómeno de saturación y de interferencia con otras inmunoglobulinas (De Savigni y Voller, 1980).

El valor de corte que obtuvimos coincide con el obtenido por otros autores (Duermeyer, 1980, Kalashnikova et al., 1991). Se ha planteado que uno de los problemas fundamentales en la normalización de los ensayos tipo ELISA, es distinguir entre los bajos niveles de respuesta específica e inespecífica. En este sentido adquiere particular importancia la selección apropiada del criterio de corte de la prueba (Porstmann y Kiessig, 1992). El análisis y ajuste de distribución de las respuestas de los sueros negativos, ha

sido uno de los métodos recomendado para estos fines, evitando los inconvenientes de valores de corte predeterminados (Chan, 1996). La especificidad obtenida, comparada con los dos juegos comerciales (100 %) avala el uso del SHN y el Tween 20 al 0.05% para eliminar o minimizar las interacciones inespecíficas. Este último, ejerce además un efecto bloqueador al competir con otras moléculas por los sitios de unión (Crowther, 1995, Steinitz, 2000). La hemólisis y la turbidez presentes en algunas de las muestras, no fue un factor que interfirió en los resultados.

IV.1.1.2 Comparación del ensayo.

En el análisis de los sueros en estudio por ambos ensayos, el de prueba y el comercial Diag-A-Hep, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 3. De las 84 muestras estudiadas, resultaron positivas 21 y negativas 61 por ambas técnicas; hubo 2 muestras que fueron positivas por el ensayo comercial y negativas por el ELISA de prueba. Se obtuvo una Sensibilidad de un 91,3 % (IC 95% 79.7-102.8), una Especificidad de un 100 % y una Concordancia de un 97.61 %. Los VPP y VPN fueron de 100 % y 96.82% (IC 95% 92.49-101.15) respectivamente. La RP+ y RP- fueron de 91.3 y 0.087 (IC 95% 0.023-0.326) respectivamente. El índice K fue de 0.93 (IC 95% 0.85-1.02) representando una concordancia muy buena. El valor del coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue menor del 10%.

Tabla 3: Comparación entre el ensayo comercial Diag-A-Hep y el ELISA de prueba.

E	Diag-A-Hep	
	+	-
L	21	0
I		
S	2	61
A		

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK. **N=84**

La sensibilidad, la especificidad y la practicabilidad han sido siempre las características más importantes del ELISA para el usuario, unido, en el caso de la hepatitis A, al hecho de la utilización de un sólo suero de fase aguda. Los resultados alcanzados en la validación del ELISA de Captura de IgM, así como los parámetros obtenidos en cuanto a precisión, sensibilidad y especificidad analítica, se comportaron de acuerdo a lo reportado

por otros autores desde la introducción del ELISA en el diagnóstico de la hepatitis A a finales de la década de los 80s. Moller y Mathiesen en 1979, lograron elevada sensibilidad y especificidad y detectaron la IgM específica en virtualmente todos los pacientes con hepatitis A desde el primer día de la fase aguda. Locarnini y col. en ese mismo año, desarrollaron la técnica obteniendo resultados comparables al RIA. Duermeier en 1980 obtuvo resultados similares realizando además, la evaluación clínica de los casos positivos y negativos, estudio en donantes de sangre y como sistema de referencia seleccionaron la IME y el RIA. Barin y col. en 1983 obtienen también excelentes resultados al comparar Heganostika anti-HAV IgM con HAV-ABB-MEIA de la firma Abbot, así como Donetz y col. y Kalashnikova y col en 1988 y 1991 respectivamente, reportaron una elevada sensibilidad y especificidad del sistema "Diag-A-Hep" al compararla con el juego comercial "HAV-ABB-MEIA" de la firma Abbot. Otros autores reportan resultados satisfactorios con la detección de IgM (Chitambar et al., 1994, Hess et al., 1995).

El aislamiento y propagación del virus en cultivos celulares en 1979, significó sustituir el antígeno proveniente de heces o hígados infectados, por antígeno proveniente de cultivo celular, lo cual permitió una mayor homogeneidad y reproducibilidad de los ensayos, disminuir los costos y facilitar el trabajo (Chitambar et al., 1991, Kalashnikova et al., 1991, Chitambar et al., 1994, Hess et al., 1995). Se ha señalado que la obtención de antígeno del VHA sigue siendo el principal factor que frena el desarrollo y normalización de EIE (Lamarca et al., 1991), ya que como se ha reportado, el virus demora por lo general varias semanas en alcanzar títulos máximos de entre 10^6 y 10^9 TCID₅₀/mL en lisados de cultivos celulares (Hollinger y Emerson, 2001). Hess y col. en 1995, han puesto en evidencia el alto costo de los sustratos celulares para la producción de gran cantidad de partículas de VHA.

A partir de los resultados aquí presentados, el uso del antígeno crudo, el cual posee múltiples sitios antigénicos, no significó cambios en la sensibilidad o especificidad del ensayo desarrollado, asimismo, el método usado para la preparación del mismo, no afectó los epitopos con significación diagnóstica.

En este sentido, se ha reportado el uso de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos para sustituir el antígeno natural, en ensayos para detectar la IgM con resultados

alentadores (LaBrecque et al., 1998, Gomara et al., 2000a, Gomara et al., 2000b, Ternovoi et al., 2001, Delahanty et al., 2004).

También se han utilizado los anticuerpos monoclonales en inmunoensayos para detectar IgM, demostrando poseer elevada sensibilidad y especificidad (Razumov et al., 1998), así como el uso de oro coloidal para la detección de dicho marcador (Wu et al., 1999). En nuestra experiencia el uso de anticuerpos policlonales para la preparación de los conjugados no afectó los parámetros de desempeño de la prueba.

.De los dos sueros no coincidentes con el ELISA comercial Diag-A-Hep, en el primero de ellos, se recogen valores de DO muy cercanos al valor de corte utilizado en el ensayo comercial, puede ser que la cantidad de anticuerpo IgM presente en la muestra se afectó en el proceso de congelación y descongelación que medio en la realización del ELISA de prueba, ya que en ese caso ambas técnicas no se realizaron al mismo tiempo. Algunos autores han reportado que los anticuerpos de la clase IgM son muy sensibles a los cambios de temperatura, demostrable más aún en estos casos en que la IgM parece estar en bajas concentraciones (Meurman, 1983). Para la segunda muestra no se tiene explicación de la discrepancia. Estas dos muestras de sueros se correspondían con pacientes con cuadro clínico de HVA y la determinación del HBsAg resultó negativa en ambos casos. No se realizó determinación de marcadores para los VHC y VHE.

Comparando los resultados del laboratorio con el cuadro clínico y procedencia de las muestras, vemos que de los sueros IgM positivos, 18 (85.7%), se corresponden con casos con sintomatología de HVA (8 de ellos procedentes de brotes), 2 (9.5 %) presentaban solamente aumento de las cifras de la ALAT por encima de 100 UI y 1 (4.7%), que procedía de un brote en un Circulo Infantil se encontraba asintomático en el momento de la recogida de la muestra, la ALAT era de 40 UI y las heces fueron positivas al VHA. Posteriormente, el paciente desarrolló el cuadro clínico de la enfermedad. La IgM puede ser efectivamente detectada al final del período de incubación (Lemon, 1997). Los casos que resultaron IgM negativos fueron 61 (coincidentes por ambas técnicas), 37 (60.6%) procedían de pacientes con sospecha de HVA, ya sea por presentar un cuadro clínico sugestivo, síntomas generales inespecíficos o aumento de la enzima ALAT, 21 (34.4 %) procedían de brotes de hepatitis y 3 (5%) de pacientes con antecedentes de hepatitis crónica que eran objeto de estudio por agudización de sus síntomas y signos. La

determinación del HBsAg en estos casos fue negativa y no se realizó determinación de marcadores para los VHC o VHE. Las elevaciones de la ALAT se observan en diversos cuadros patológicos y pueden estar relacionadas con manifestaciones hepáticas en el curso de infecciones por otros agentes biológicos (Lacaille, 2001).

IV.1.2 Evaluación del ELISA de Captura de IgM utilizando como antígeno la cepa M2 clon C5.

IV.1.2.1 Determinación de la dilución óptima del antígeno y el conjugado.

En la Figura 10 se observan los resultados obtenidos para las diferentes diluciones de antígeno, utilizando como concentración de saturación 5 µg/mL de anti-IgM y como dilución del conjugado 1:1 000. La mejor relación positivo / negativo se obtuvo para la dilución 1:5 del antígeno.

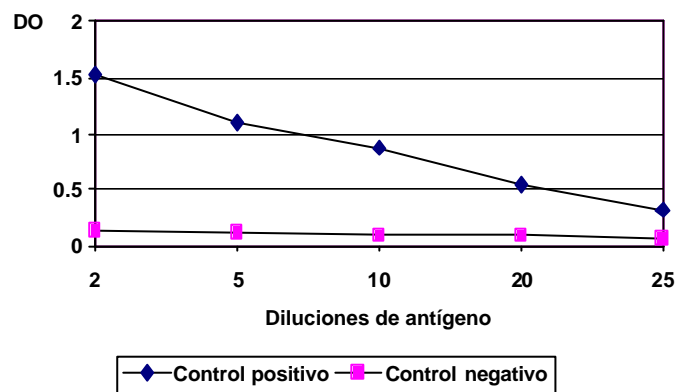


Figura 10: Determinación de la dilución óptima del antígeno.

En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos al graficar las DO para las diferentes concentraciones del conjugado, al utilizar 5 µg/mL de anti-IgM, dilución 1:1 000 de los sueros y dilución del antígeno 1:5. Se observa que la mejor relación positivo / negativo se obtuvo a la dilución 1:1 000 del conjugado.

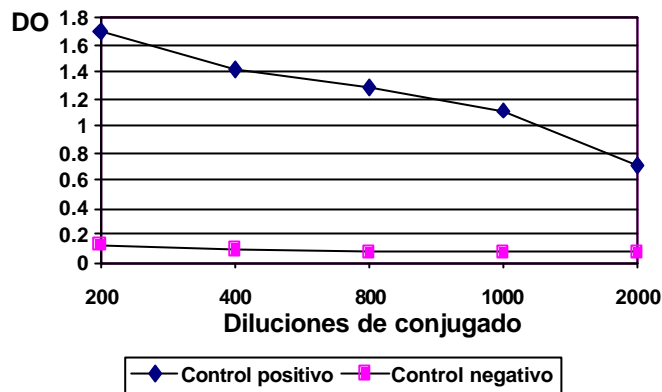


Figura 11: Determinación de la dilución óptima del conjugado.

IV.1.2.2 Comparación del ensayo.

Una vez hallado las diluciones óptimas de los reactivos, se procedió a comparar los resultados con el juego comercial Hapanostika IgM HAV. En 170 muestras procesadas, 52 fueron positivas y 118 negativas por ambos sistemas, obteniéndose un 100% de Sensibilidad, Especificidad y Concordancia. Los coeficientes de variación fueron menores del 10%.

Los parámetros de evaluación del ELISA desarrollado fueron excelentes. Valorando la elevación de la sensibilidad en la segunda validación, este podría estar relacionado con la purificación de las inmunoglobulinas antes y después de conjugarse. Se ha planteado con anterioridad, que la presencia de enzima libre en los EIE, especialmente en forma de polímeros, conduce a una disminución de la relación positivo / negativo debido a un incremento de la reacción de fondo. Las moléculas no marcadas, compiten con la enzima marcada por el enlace del analito, reduciéndose así la señal emitida por el inmunocomplejo. Es importante la purificación del conjugado, ya que para incrementar la sensibilidad del ensayo, es necesario separar las moléculas no marcadas del conjugado (Porstmann et al, 1981, Crowther, 1995). Asimismo, el aumento de la sensibilidad no parece estar relacionado con la utilización de un aislamiento autóctono como antígeno en el ELISA, ya que el VHA tiene un serotipo único y la utilización de cepas de diferente genotipo o lugar geográfico no afecta la reactividad del ensayo (Lemon, 1997). Hasta el momento no se han reportado diferencias morfológicas ni serológicas entre los diferentes aislamientos humanos del VHA. La respuesta inmune a la infección o a la vacunación esta

dirigida contra un sitio inmunodominante de la estructura viral, la cual esta altamente conservada en todos los genotipos, de ahí que la infección con este agente confiera inmunidad duradera, que protege contra reinfecciones subsecuentes. La caracterización proteica de la cepa cubana utilizada, no difiere en lo absoluto de las cepas mundiales circulantes (Díaz et al, 1996).

El coeficiente de variación obtenido en la estandarización de ambos ensayos fue bajo, es decir, excelente. El objetivo de toda prueba diagnóstica es proporcionar resultados altamente confiables y repetibles. Los ensayos tipo ELISA, debido a sus múltiples pasos y a la complejidad de la reacción antígeno / anticuerpo y enzima / sustrato introducen errores, de ahí que se necesite una alta precisión del ensayo. Hay múltiples factores que influyen en la variación de los resultados, como son: las características adsorptivas de las microplacas, las fluctuaciones del pH y la temperatura de las soluciones, errores en la preparación de los reactivos, variabilidad en los procedimientos de lavados y tiempos de incubación, en la dilución de las muestras, etc. La variabilidad afecta el impacto del sistema en varios niveles diferentes, siendo la identificación y eliminación de estos a menudo difíciles ya que provienen de diferentes fuentes. Varios métodos han sido sugeridos para detectar, controlar y eliminar o reducir dicha variación, entre ellos: detener la reacción enzimática cuando la DO del suero de referencia toma un determinado valor, expresar los resultados como una proporción de la DO de la muestra y la DO del suero de referencia, etc (Malvano et al., 1986, Whittington, 1992, Tijssen, 1999, Fossceco y Curtis, 2003). En nuestra experiencia, se le prestó esmerada atención a los procedimientos técnicos básicos del laboratorio, para minimizar los errores instrumentales e individuales, logrando siempre un coeficiente de variación menor del 10%.

IV.1.3 Reducción de los tiempos de incubación del ELISA IgM-VHA (24 horas).

Se utilizaron las mismas diluciones óptimas del ensayo anterior. En este caso la atención se centró en lograr una temperatura estricta de 37 °C en la incubadora y en la cámara húmeda.

Se obtuvo un 100 % de Concordancia con el ELISA de Captura siguiendo el protocolo de 48 horas. En los 100 sueros comparados, con el protocolo de 48 horas (C1) la media de las DO fue de 0.390 (DS 0.353, valor mínimo 0.061 y valor máximo 1.17) y con el protocolo de 24 horas (C2) la media de las DO fue de 0.381 (DS 0.341, valor mínimo

0.060 y valor máximo 1.122). El coeficiente de correlación R fue de 0.978 (Figura 12). Como se observa, con la disminución de los tiempos de incubación, prácticamente se comportan de manera similar, con fluctuaciones insignificantes de la DO, lo cual avala su uso en el diagnóstico de la hepatitis A. El Coeficiente de Correlación es excelente, lo que nos demuestra tendencias similares entre ellos.

Todos los sueros positivos a los virus de la rubéola y dengue, resultaron negativos a IgM anti-VHA, lo que indica que no hay reactividad cruzada entre sueros positivos a estas patologías.

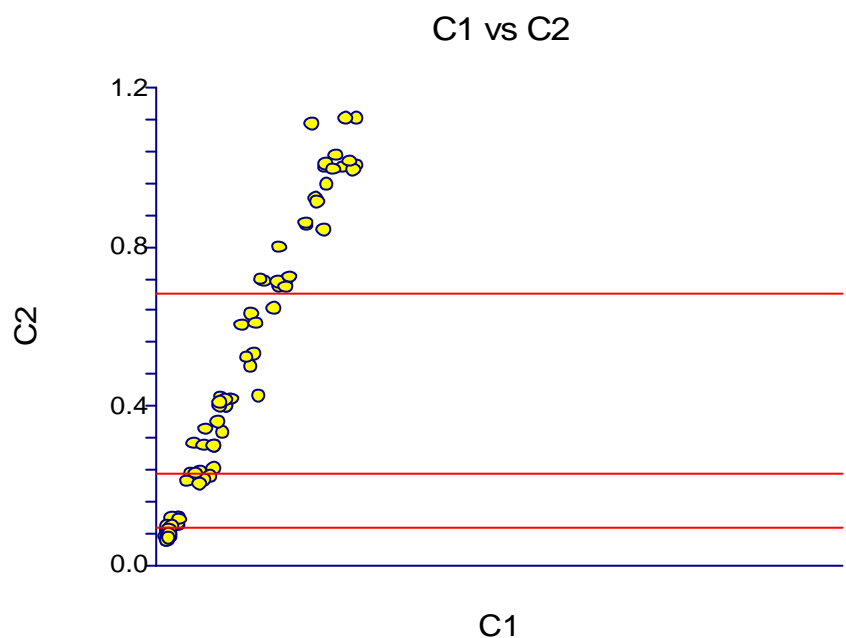


Figura 12: Correlación entre los valores de DO usando el protocolo de 48 (C1) y 24 horas (C2).

El propósito de acortar los tiempos de incubación obteniendo los resultados en un día, sin perder la sensibilidad y especificidad lograda, fue acelerar el diagnóstico, hacerlo más dinámico, simple, conveniente y mucho más atrayente para los futuros usuarios fuera de la institución. El acortamiento del tiempo de incubación elevando la temperatura (en el caso del antígeno) ha sido usado en la estandarización de numerosas técnicas con resultados satisfactorios. Lo más utilizado es la incubación estacionaria a 37 °C, durante una a tres

horas. Otros métodos no estacionarios, por ejemplo la rotación, permiten reducir el tiempo a 30 minutos, sin perder la sensibilidad (Duermeyer, 1980, Lamarca et al., 1991, Crowther, 1995).

Los resultados obtenidos en el análisis de la reactividad cruzada con otros agentes virales eran esperados, ya que este ensayo utiliza una dilución de la muestra problema alta. No existe reactividad serologica cruzada entre el VHA y otros agentes virales ya sean hepatotropos o no (Ticehurst, 1995).

IV.1.4 Toma de muestra de sangre adsorbida en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM contra el VHA.

Exceptuando el proceso de elución de la muestra de sangre total colectada en papel de filtro, las condiciones requeridas para la determinación de la presencia de anticuerpos IgM mediante el ELISA de Captura fueron iguales a las utilizadas para los sueros. Ambos tipos de muestras se analizaron en paralelo, o sea, en la misma placa de reacción, con las mismas condiciones para una y otra muestra. De las 168 muestras de sueros analizadas, 50 resultaron positivas (29.76 %) y 118 negativas (70.23 %). En la Tabla 4 se muestran los resultados comparativos entre ambas muestras.

Tabla 4: Comparación de la detección de IgM antiVHA en muestras de sueros y sangre adsorbida en papel de filtro a diferentes diluciones

Diluciones PF	1:100	1:500	1:1 000
Sensibilidad (IC 95%)	100 %	100 %	98.03 % (IC 95% 94.11-101.88),
Especificidad (IC 95%)	99.15 % (IC 95% 97.49-100)	100 %	100 %
Concordancia	99.40 %	100 %	99.40 %
Coefficiente de Correlación (R).	0.661	0.895	0.886

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

N=168

Con la dilución 1:100 de la sangre adsorbida en papel de filtro, una muestra de suero negativa, resultó positiva al utilizar el papel de filtro, con una DO muy cercana al valor de

corte. Estos resultados arrojaron una Sensibilidad del 100%, una Especificidad del 99.15 % (IC 95% 97.49-100) y una Concordancia de un 99.40 %. El valor de R fue de 0.661. Esto puede ser debido a un falso positivo del papel de filtro y no un falso negativo del suero, ya que la muestra en papel de filtro se trabajó a una dilución menor que la del suero, por lo que podrían quedar contaminantes que afecten la especificidad del ensayo. Con la dilución 1:500 no se obtuvieron muestras discordantes, lo que condujo a una Sensibilidad, Especificidad y Concordancia de un 100%. El valor de R fue de 0.895.

Con la dilución 1:1 000, un suero resultó positivo, mientras su homólogo recogido en papel de filtro fue negativo. La DO de este suero estuvo muy cercana al valor de corte. La Sensibilidad fue de un 98.03 % (IC 95% 94.11-101.88), Especificidad de un 100% y Concordancia de 99.40 %. En esta dilución R tuvo un valor de 0.886. En este caso pensamos en un falso negativo del papel de filtro, ya que los valores de DO del suero estaban cercanos al valor de corte, lo que parece indicar que la concentración de IgM en el suero era baja, y por tanto, en el papel de filtro, impidiendo esto que alcanzara el criterio de positividad de la prueba. Aunque algunos autores han planteado que la IgM es altamente lábil cuando las muestras son tomadas en papel de filtro y conservadas (Vázquez et al., 1996), no es explicable este resultado, basándonos en la pérdida de la IgM a través del tiempo, ya que las muestras fueron procesadas de 1 a 2 días después de su colecta, y en algunos casos el mismo día.

Una vez definida la dilución 1:500 como la óptima, se aplicó satisfactoriamente en el estudio de casos clínicamente sospechosos de hepatitis viral y en el diagnóstico de un brote de hepatitis viral. En la Tabla 5 se recogen los resultados, el 100% de los casos clínicos sospechosos fue positivo a la detección de IgM anti-VHA, mientras que 13 muestras (13.4%) del brote fueron positivas a este mismo marcador.

La utilidad de la toma de muestra de sangre total en papel de filtro ha sido reportada por varios autores, demostrando ser un proceder sencillo, fácil y aplicable en el diagnóstico de múltiples enfermedades infecciosas virales. Los trabajos realizados en la normalización del uso del papel de filtro en la serología de dengue, por ejemplo, tanto para la determinación de anticuerpos IgM e IgG, lo demuestran (Vázquez et al., 1996).

Tabla 5: Resultados de la detección de IgM anti-VHA utilizando la toma de muestra en papel de filtro.

PROCEDENCIA	Positivos		Negativos		Total
	No	%	No	%	
<i>Casos clínicos</i>	4	100	0	0	4
<i>Brote</i>	13	13.4	84	86.6	97

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

Particularmente en hepatitis A, Adler y Shouval desarrollaron un método simple de detección de anticuerpos totales mediante la colecta de sangre en discos de papel, con una concordancia de un 100% con el suero homólogo (Adler y Shouval, 1993).

Gil y col. en 1997, reportaron la utilidad de la colecta de muestra en discos de papel de filtro para la detección cualitativa de anticuerpos totales anti-VHA. Encontraron una sensibilidad y especificidad de 91.3 y 99.3 respectivamente, mientras que las RP+ y RP- fueron 91 y 0.09 respectivamente. Estos mismos autores en 1999 y De Almeida y col. también en ese mismo año, reportan su uso en estudios epidemiológicos (De Almeida et al., 1999, Gil et al., 1999). Chitambar y Chadha en el 2000, no encontraron diferencias entre los valores de DO y la neutralización en muestras almacenadas durante 10 días, tampoco entre los resultados de la muestra de suero y papel de filtro almacenado por 2 meses. Concluyen que es útil para la vigilancia de la hepatitis A.

Los resultados aquí presentados avalan la introducción de este tipo de colecta de muestra en el diagnóstico de la Hepatitis A, recomendándose fundamentalmente en el estudio de brotes, sobre todo, en niños pequeños, en los que se dificulta la obtención de sangre venosa, y aquellos que ocurren en concentrados militares y colectivos de difícil acceso, donde la lejanía y la falta de personal especializado, hacen atrayente este tipo de toma de muestra.

IV.1.5 Aplicación del ELISA IgM al diagnóstico y la vigilancia de la hepatitis viral.

En el período 1991-2003 se analizaron un total de 11 946 muestras de sueros, distribuidas

por años como se expone en la Tabla 6. Esta técnica constituyó una herramienta fundamental en el diagnóstico de los casos de hepatitis virales del país, siendo hasta 1999, la única existente en la red de laboratorios de servicios. Permitió un ahorro de divisas al país por concepto de compra de juegos diagnósticos.

Tabla 6: Distribución por años de las muestras analizadas por IgM-VHA. 1991-2003.

AÑOS	SUEROS
<i>1991</i>	<i>786</i>
<i>1992</i>	<i>61</i>
<i>1993</i>	<i>18</i>
<i>1994</i>	<i>60</i>
<i>1995</i>	<i>270</i>
<i>1996</i>	<i>531</i>
<i>1997</i>	<i>1 397</i>
<i>1998</i>	<i>1 691</i>
<i>1999</i>	<i>662</i>
<i>2000</i>	<i>658</i>
<i>2001</i>	<i>2 342</i>
<i>2002</i>	<i>2 016</i>
<i>2003</i>	<i>1 454</i>
TOTAL	<i>11 946</i>

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

Los estudios de factibilidad realizados demuestran que los reactivos y protocolos elegidos fueron adecuados. El desempeño del ensayo propuesto (IgM-VHA), y su evaluación de acuerdo con los parámetros establecidos internacionalmente, nos permitieron emplearla como herramienta diagnóstica confiable y concluir que la estrategia seguida fue adecuada

En la Tabla 7 se presentan los brotes de HVA que se han estudiado en un período de 11 años. De 129 epidemias, 120 fueron causadas por el VHA, mientras que 9 resultaron negativas a la IgM. Estos brotes fueron analizados para otros virus de las hepatitis, siendo 2 de ellos positivos al HBsAg, 5 al VHE y 2 no pudieron clasificarse con las herramientas analíticas que estaban disponibles en el laboratorio.

Tabla 7: Resultados del estudio de epidemias de HVA: Cuba 1992-2003.

BROTOS	POSITIVOS		NEGATIVOS	
	NO	%	NO	%
129	120	93.02	9	6.97

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

La vigilancia aporta conocimientos insustituibles al control de las enfermedades transmisibles: cambios en el comportamiento epidemiológico, cambios en la circulación de las cepas, etc. El estudio de los brotes de HVA permitió un mejor conocimiento de la enfermedad en Cuba, además, permitió conocer que otro agente viral hepatotrofo, en este caso el VHE co-circulaba conjuntamente con el VHA, que luego fue confirmado (datos no mostrados). Muchas clases de patógenos excretados en heces son capaces de provocar epidemias, entre ellos los VHA y VHE, de forma separada o combinada, fundamentalmente en los países tropicales (Leclerc et al., 2002, Yayli et al., 2002).

En el estudio etiológico de los casos graves y fallecidos por FHF recibidos en el laboratorio durante el período 1997-2003, se observó que de los 58 sueros recibidos de todas las provincias del país con este criterio, en 34 (58.62%) de ellos se pudo conocer la etiología del cuadro, el resto (24) fueron clasificados como hepatitis No A No E o de etiología no precisada.

En la Tabla 8 se muestran los resultados en las 34 muestras clasificadas. El VHB fue el agente que mayor positividad obtuvo con 14/34 (41.17%) seguido del VHA con 12/34 (35.29%), los VHC y VHE aportan el 2.94 y 5.88% respectivamente. La combinación VHB + VHE fue la más observada aunque sólo en 2/34 (5.88%). La asociación de tres agentes solamente se recogió en un caso. Si buscamos la positividad del VHB sólo o en combinación con otros agentes, encontramos que este virus aporta el 52.94% de los casos (18/34), en el caso del VHA este se incrementa al 41.17% (14/34). Es decir, el VHB y el VHA aportan el 91.17 % de la positividad en casos graves o fallecidos por hepatitis viral.

Tabla 8: Clasificación etiológica de los casos graves y fallecidos por FHF. Cuba. 1997-2003.

ETIOLOGIA	POSITIVOS	
	NO	%
VHA	12	35.29
VHB	14	41.17
VHC	1	2.94
VHE	2	5.88
VHA + VHE	1	2.94
VHB + VHE	2	5.88
VHB + VHC	1	2.94
VHA + VHB + VHE	1	2.94
TOTAL	34	100

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

Una de las vertientes de la vigilancia de la hepatitis viral se basa en el estudio etiológico de la mortalidad. El FHF es causado por diferentes agentes, ya sean infecciosos, tóxicos o medicamentosos. Todos los virus hepatotropos pueden causar FHF, pero, varía entre países desarrollados y subdesarrollados, siendo un evento raro, a pesar de la exposición común en grupos de alto riesgo. A nivel mundial, la etiología indeterminada (No A no E), compite con la hepatitis B, como la causa presumida más común (Fagan y Harrison, 2000).

La mortalidad por hepatitis viral ha sido estudiada y reportada por numerosos autores, incorporando nuevas herramientas diagnósticas clásicas o moleculares según la disponibilidad de los laboratorios. No obstante, en muchos de ellos aún no se puede precisar la etiología del cuadro. Por ejemplo, Poddar y col. encontraron marcadores virales en el 94% de los niños con FHF, Moreira-Silva y col. reportan un 13.1% de negatividad a los agentes estudiados, Artica y col. refieren no precisar etiología en el 37.9% de los casos y Bendre y col. precisan etiología en el 61.1% de los casos (Artica et al., 1998, Bendre et al., 1999, Moreira-Silva et al., 2002, Poddar et al., 2002). Los virus hepatotropos que más frecuentemente han sido encontrados son los VHA y el VHB. En el año 2002, Poddar y

col. en la India encontraron la mayor positividad al VHA, seguido del VHE y de la combinación VHA + VHE, encontrándose el VHB en el 8% de los casos. También, en ese país en el año 1999, Bendre y col. encuentran al VHA solo o en combinación con el VHE y el VHB el responsable de hasta el 50 % de los casos estudiados. De igual manera Moreira-Silva y col. en Brasil, encontró al VHA como el responsable del 82.6% de los casos y Artica y col. en Perú reporta al VHA como el más frecuentemente encontrado con un 44.4% (Artica et al., 1998, Moreira-Silva et al., 2002). Otros reportes en Japón y en Shanghai apuntan al VHB o al VHA y al VHB como los responsables de los casos graves y fallecidos por hepatitis viral (Cooksley, 2000, Fujiwara y Mochida, 2002).

Teniendo en cuenta las asociaciones virales encontradas, se refuerza la necesidad de vacunar contra la hepatitis A y B a personas con enfermedad hepática crónica, recomendado por otros autores a nivel internacional (Almasio y Amoroso, 2003).

Los resultados de la mortalidad han permitido confirmar virológicamente el papel de cada uno de los virus de las hepatitis estudiados.

IV.2 Detección de IgM anti-VHA en muestras de orina.

Debido a que el objetivo inicial era evaluar la factibilidad de la muestra de orina en el diagnóstico de brotes de HVA, utilizando para ello un ELISA de Captura de IgM normalizado para muestras de sueros, primeramente, se trató de demostrar que el cambio de muestra, no afectaba la especificidad de dicho ensayo, utilizando para ello 30 muestras de suero y orina de pacientes sanos ó sin patología relacionada con Hepatitis A, como controles negativos. Con los resultados obtenidos se realizó la prueba de “Kolmogorov-Smirnov”, demostrando que ambas muestras se ajustan a una distribución normal sin diferencias significativas. La comparación de las medias, no arrojó diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$).

Seguidamente se calculó la Potencia del ensayo obteniéndose un valor del 85 %, por lo cual se trabajó como si los controles negativos de orina y suero tuvieran el mismo comportamiento, por tanto, se utilizó este último en todos los ensayos. Con los valores T:N de 30 muestras de orina de individuos infectados y 30 de individuos no infectados (confirmados por la detección de IgM anti-VHA en suero), se construyó un histograma y se estimó el valor de corte en 1.2, el cual teóricamente discriminaría las muestras positivas y negativas con una Sensibilidad de 96.6% y una Especificidad de 93.3 %.

IV.2.1 Comparación entre la muestra de orina y de suero.

Al analizar las 217 muestras del estudio de forma comparativa se obtuvo una Sensibilidad, Especificidad y Concordancia de un 88.98 % (IC 83.33-94.63), 92.92 % (IC 87.87-97.97) y 90.78 % respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados de la detección de IgM en muestras de suero y orina.

	S	U	E	R	O
O		+		-	
R	+	105		7	
I					
N	-	13		92	
A					

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK. **N=217**

Obtuvimos un VPP y un VPN de un 93.75% (IC 95% 89.26-98.23) y 87.61% (IC 95% 81.31-93.91) respectivamente. La RP+ y RP- fueron de 12.56 (IC 95% 6.14-25.77) y 0.11 (IC 95% 0.070-0.198) respectivamente. El valor K fue de 0.81 (IC 95% 0.73-0.89), representando una concordancia muy buena.

Se encontraron 20 resultados discordantes entre muestras de orina y suero (Tabla 10). 13 muestras fueron positivas en el suero y negativas de acuerdo a los resultados de orina. Sin embargo, seis de los 13 resultados en la orina estaban localizados en la zona gris, la cual fue definida como el 10% por debajo del valor de corte. Las restantes 7 muestras discordantes fueron positivas en las muestras de orina, pero negativas en su respectivo suero.

Tabla 10: DO y valores T:N en muestras de suero y orina de 20 pacientes discordantes.

Muestras	Valores DO		Valores T:N	Resultados
	Suero	Orina	Orina	Discordantes Suero/Orina
1	1.869	0.085	1.16*	(+/-)
2	0.771	0.101	1.13*	(+/-)
3	0.665	0.051	0.57	(+/-)
4	0.339	0.068	0.77	(+/-)
5	1.603	0.090	0.71	(+/-)
6	0.488	0.094	0.74	(+/-)
7	0.554	0.098	0.77	(+/-)
8	0.696	0.089	0.70	(+/-)
9	1.089	0.122	0.97*	(+/-)
10	0.525	0.105	1.1*	(+/-)
11	0.29	0.14	1.05*	(+/-)
12	1.61	0.11	0.84	(+/-)
13	0.360	0.093	1.13*	(+/-)
14	0.113	0.698	9.56	(-/+)
15	0.091	0.111	1.52	(-/+)
16	0.079	1.556	21.32	(-/+)
17	0.141	0.415	5.68	(-/+)
18	0.082	0.099	1.37	(-/+)
19	0.078	0.182	2.49	(-/+)
20	0.15	0.31	2.46	(-/+)

* Resultados del T/N en orina localizados en la zona gris.

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

En el estudio de 3 brotes de HVA, que según el cuadro clínico, los resultados de las enzimas aminotransferasas y las características epidemiológicas de cada uno, se tenía

sospecha de la enfermedad (Tabla 11) un total de 50 muestras (83,3 %) de orina fueron positivas y 10 (16,7 %) negativas. Estos resultados confirman fuertemente la etiología de dichos brotes epidémicos.

Tabla 11: Resultados del estudio de tres epidemias de HVA utilizando la orina como única muestra de análisis.

BROTOS	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL
	#	%	#	%	
<i>Población cerrada</i>	13	86,6	2	13,4	15
<i>Población Abierta</i>	16	88,8	2	11,2	18
<i>Tropas</i>	21	77,7	6	22,3	27
TOTAL	50	83,3	10	16,7	60

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

El hecho de que las muestras de orina y suero se ajusten a una distribución normal de frecuencias, así como el uso de controles de suero, fue una premisa esencial al comienzo del análisis. El propósito inicial no fue normalizar un ELISA para muestras de orina, sino tratar de evaluar el ELISA de Captura establecido en el laboratorio a la nueva muestra de estudio. Algunos autores han usado suero como controles en EIE de orina (Perry et al., 1992, Takahashi et al., 1998).

Aunque el valor de corte estimado nos discriminaría las muestras positivas y negativas con una sensibilidad pre-establecida de 96.6% y una especificidad de 93.3 %, nuestras expectativas sólo se lograron en la especificidad (93.3 % versus 92.85 %), quedando la sensibilidad por debajo de lo esperado (96.6 % versus 88.98 %), entonces, *¿como explicaríamos esta disminución de la sensibilidad?* Esto puede deberse a las siguientes razones: i) que las muestras estén tomadas fuera de tiempo (no se conoce con exactitud la cinética de la IgM en orina), ii) presencia de inhibidores de la reacción inmunoenzimática en la orina, ya que no se controló la ingestión de medicamentos o debido a los tóxicos que se excretan normalmente con la orina (recordemos que la muestra se añade sin diluir), iii) diferencias en la ingestión de líquidos por cada persona, lo que provoca fluctuaciones en

la concentración de las Inmunoglobulinas en orina y iv) el hecho de que la IgM excretada por la orina sea monomérica, lo cual puede disminuir su capacidad de unión en el ensayo (Perry et al., 1992, Acker et al., 1993, Tencer et al., 1998).

De los 13 casos falsos negativos, seis de ellos se encuentran en la zona gris, lo cual analíticamente refuerza nuestros criterios expresados anteriormente.

¿A que podría deberse entonces, los siete casos falsos positivos?, pueden deberse al efecto del pH urinario, a una posible contaminación bacteriana de la orina, presencia de sedimentos, células o productos tóxicos de la orina que indiscutiblemente pueden interferir o bloquear la reacción inmunoquímica del ensayo.

No obstante, se encontró una buena concordancia (90.78 %) entre los resultados del suero y la orina en 217 individuos procedentes de casos esporádicos y epidemias, así como los VPP y VPN, las RP+ y RP- y el índice K. Además, la concordancia entre los resultados de la orina y los datos clínico-epidemiológicos en casos de epidemias fueron muy buenos (93.33 %).

Perry y col. (1992) usando un RIA de Captura de IgM en orina, obtuvo una sensibilidad de 95.8 % y una especificidad de 99.6 %, además, ellos analizan 200 uL de cada muestra de orina e incuban el antígeno y el conjugado mucho más tiempo. Otro grupo de investigadores ha obtenido 100 % de sensibilidad en un ensayo de ELISA de detección de IgG anti-rubeola en orina desarrollado con ese propósito (Takahashi et al., 1998). Joshi y col. (2002) han obtenido un 95.65 % y 100 % de sensibilidad y especificidad respectivamente en su estudio comparativo entre el suero y la orina usando un EIE de detección de IgM anti-VHA.

Por otra parte, Kato y col. (2001) han reportado una sensibilidad y especificidad de 85.4% y 95.5% respectivamente, al utilizar un ELISA indirecto comercial de detección de IgG anti *Helicobacter pylori* en orina y compararlo con el suero, estos resultados a pesar de usar protocolos diferentes al nuestro, se comportan de igual manera. Ellos plantean su uso para estudios epidemiológicos a gran escala.

Nuestro trabajo estuvo encaminado a evaluar la utilidad del ELISA para muestras de orina con solo mínimas modificaciones del protocolo original. Consideramos que es importante contar con un ELISA para analizar orina y suero proveniente de epidemias de HVA, sobre

todo por ser un país en vías de desarrollo, ya que la orina es fácil de recoger y no necesita ningún tratamiento en el laboratorio para ser analizada.

Todos estos resultados proveen evidencias que apoyan la utilidad de la muestra de orina para el diagnóstico de la hepatitis A, siempre y cuando la venipuntura sea inconveniente, difícil o inaceptable, además, sugiere la utilidad de la muestra de orina para dar una rápida respuesta en casos de situaciones epidemiológicas urgentes, sin embargo, en casos clínicos esporádicos la interpretación del diagnóstico debe ser realizada cuidadosamente, debido a las características de la orina discutida anteriormente.

IV.2.2 Estabilidad de la muestra de orina

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de la IgM en el tiempo, con 16 muestras de orina, comparando los resultados de una misma muestra almacenada a 4 °C y a -70 °C al mes, dos meses, tres meses y seis meses. Se observó un comportamiento cualitativo uniforme tanto en las almacenadas a 4 °C como a -70 °C en los primeros 3 meses, sin embargo, a los 6 meses, 5 (31.25 %) de las muestras almacenadas a 4 °C se convirtieron en negativas, no ocurriendo así en las conservadas a -70 °C. Se demostró que no existía diferencia significativa en los valores medios de DO de las muestras de orina conservadas a 4 °C y a -70 °C a los 6 meses ($p > 0.05$) (Tabla 12).

Recomendamos almacenar las muestras de orina a 4 °C, por espacio de tres meses, sin que sufra cambio significativo la IgM anti-VHA, y por intervalo de seis meses a -70 °C, Perry y col. en 1992, reportan que el almacenamiento de la muestra de orina a temperatura de 4 °C y -25 °C después de un mes y medio de colectada, tienen efectos negativos en la detección del marcador. Este resultado adquiere gran importancia ya que ellos no recomiendan usar la muestra de orina como control de los EIE. Este resultado permite sugerir que en los primeros seis meses después de colectada la orina y conservada a -70 °C, si podrían servir como controles, ya que los valores de DO se mantienen en valores similares en este período de tiempo. Algunos autores han recomendado añadir azida sódica al 0.1% a la muestra de orina como preservante (Kato et al., 2001). Otros, han planteado que la muestra de orina mantiene su actividad en condiciones normales de transporte y almacenaje y que no necesariamente requiere preservantes. Se ha demostrado que los anticuerpos contra el VIH en orina son estables durante 55 días a TA ó 1 año a temperatura entre 2-8 °C y que no es recomendado la congelación, ya que puede ocasionar

falsos positivos (Urnovitz et al., 1996). Con propósitos prácticos, podemos sugerir que las muestras de orina que han estado conservadas en el refrigerador (4 °C) por una o dos semanas todavía son útiles para ser analizadas.

Tabla 12: Valores T:N en 16 muestras de orina almacenadas a 4°C y -70°C en un período de seis meses.

Muestras orina	Tiempo 0	1mes		2meses		3 meses		6 meses	
		4°C	-70°C	4°C	-70°C	4°C	-70°C	4°C	-70°C
1	4.8	3.3	3.91	5.29	4.51	4.8	3.15	3.2	3.7
2	2.5	3.51	1.62	4.6	2.49	3.9	1.75	1*	2.9
3	5.6	4.84	4.53	5.31	6.05	5.8	5.47	5	6.8
4	5.03	3.38	2.83	3.16	3.78	2.9	2.5	3.5	3.2
5	5.8	4.21	3.85	5.11	4.53	6.4	4.6	1.7	4.0
6	6.7	3.46	4.2	5.21	6.18	4.7	4.9	7	5.0
7	6.8	4.8	4.29	4.41	5.67	6.04	3.3	5	6.5
8	3.1	2.47	2.12	3.68	2.74	2.8	1.5	4.2	7.5
9	5.9	4.68	4.69	6.01	6.36	5.7	5.9	7.5	9.2
10	6.2	4.6	4.57	5.89	6.11	6.8	6.03	0.7*	2.1
11	4.8	3.24	3.29	4.42	4.47	4.5	3.5	0.9*	1.4
12	3.6	2.84	2.39	3.6	4.23	3.3	2.1	6.5	7.0
13	3.09	1.92	1.76	2.5	2.66	2.3	1.8	0.6*	1.9
14	2.5	2.5	2.59	3.15	2.43	2.23	3.12	2.5	3.4
15	6.03	6.03	8.5	1.21	5.37	0.75	8.9	0.6*	3.3
16	7.47	7.47	7.19	4.13	5.2	4.07	7.72	4.2	8.2
Media	5.00	3.95	3.90	4.23	4.55	4.19	4.14	3.38	4.76
DS	1.46	1.42	1.73	1.31	1.21	1.65	2.09	1.85	2.35

* Muestras de orina negativas después de 6 meses de almacenadas a 4°C.

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

IV.2.3 Cinética de la IgM anti-VHA en orina.

El estudio preliminar acerca de la cinética de la IgM en orina fue realizado en siete muestras pareadas de suero y orina, debido principalmente a lo difícil del seguimiento de un paciente en el tiempo durante el transcurso de la enfermedad, obteniéndose los resultados presentados en la Figura 13. Los resultados fueron medidos dos y seis meses después del momento de la infección. Los pacientes provenían de una epidemia ocurrida en una unidad cerrada a partir de una fuente común. El tiempo cero se determinó de forma retrospectiva basándose en criterios clínicos y epidemiológicos. Los valores T:N de la orina fueron más altos que los del suero dos meses post infección, sin embargo, seis meses después, la relación T:N del suero mostró el mayor valor. A los seis meses todas las muestras de suero fueron positivas, mientras que 4 (57.14%) de las 7 muestras de orina se convirtieron en negativas, pero con la particularidad de que todas estaban muy cerca del valor de corte. Al comparar los valores T:N de las muestras de suero a los 2 y 6 meses, se recoge una diferencia estadísticamente muy significativa ($p = 0.0023$), en el caso de la orina esta diferencia es altamente significativa ($p = 0.0006$).

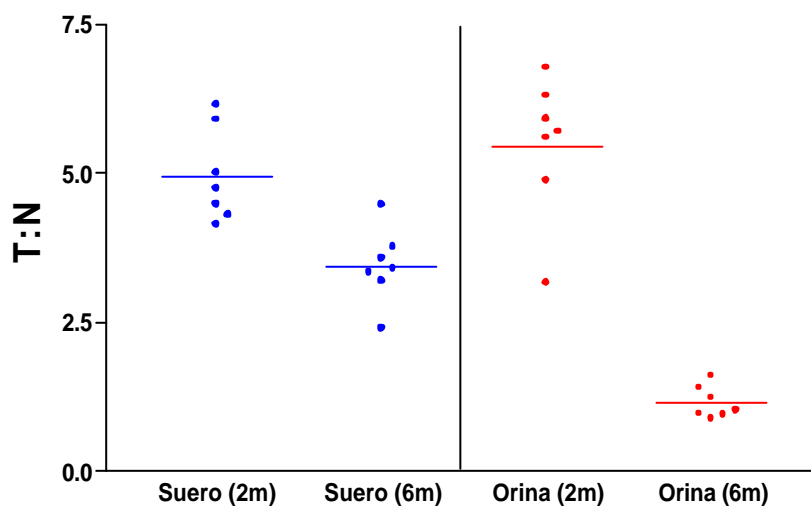


Figura 13. Valores T:N de la IgM en suero y orina 2 y 6 meses post infección.

Nuestros resultados preliminares han mostrado que el nivel de IgM anti-VHA parece decrecer gradualmente, pero, este decrece más rápido en orina que en suero, resultado

esperado si tenemos en cuenta la baja concentración de dicha proteína en la orina (la concentración de las inmunoglobulinas en orina es de 10 – 20 000 veces menos que en el plasma y 10-20 veces menos que en la saliva) y su baja permeabilidad a través de la membrana glomerular, la cual sólo permite el paso de la IgM monomérica (Perry et al., 1992, Tencer et al, 1998). Es conocido que la IgM en suero desaparece 3-6 meses después del comienzo de la enfermedad, puede persistir por más de 6 meses en el 25 % de los pacientes, en tanto que, su persistencia más allá de los 12 meses es inusual (Koff, 1998). Si bien el número de muestras es pequeño, estos resultados respecto a la cinética de la IgM en orina permiten recomendar la orina como una muestra útil en el diagnóstico actual y reciente, es decir, después de comenzado el cuadro clínico y hasta dos meses después con una elevada confiabilidad.

Urnovitz y col. en 1996, en una revisión del tema ha dejado claro la utilidad de la muestra de orina en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, además, ha planteado que los estudios en orina sugieren que los anticuerpos a los productos de genes virales endógenos, pueden estar involucrados en la patogenia de las enfermedades crónicas de etiología viral. Los resultados reportados aquí sugieren: i) la utilidad de los ensayos de Captura en detectar anticuerpos virus-específicos en fluidos orgánicos que contienen bajas concentraciones de inmunoglobulinas, ii) que la muestra de orina es útil en el estudio de brotes epidémicos de hepatitis A y iii) que aunque macromoléculas de gran tamaño como la IgM no pasan el filtro glomerular en condiciones normales, si pueden ser utilizados como elemento diagnóstico de gran utilidad práctica.

La muestra de orina parece ser una alternativa factible para la confirmación de brotes de Hepatitis A en lugares de difícil acceso o cuando la toma de sangre de torne difícil o traumática como por ejemplo, en niños muy pequeños, personal movilizado o reclutado. Además, es una muestra que no necesita preparación ni dilución previa en su utilización en el laboratorio.

IV.3 Detección de IgA anti-VHA en suero (IgA sérica) y en saliva (IgA secretora).

IV.3.1 Determinación de la concentración óptima de saturación, dilución óptima del antígeno y el conjugado.

En la Figura 14 se presentan los resultados obtenidos al graficar los valores de DO a diferentes concentraciones de la IgG anti-IgA humana, utilizando el suero diluido 1:100, el antígeno de referencia HAS-15 a la dilución 1:8 y el conjugado 1:1 000. Como se observa, a partir de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se alcanza la meseta de la curva, considerándose esta como la concentración óptima de saturación.

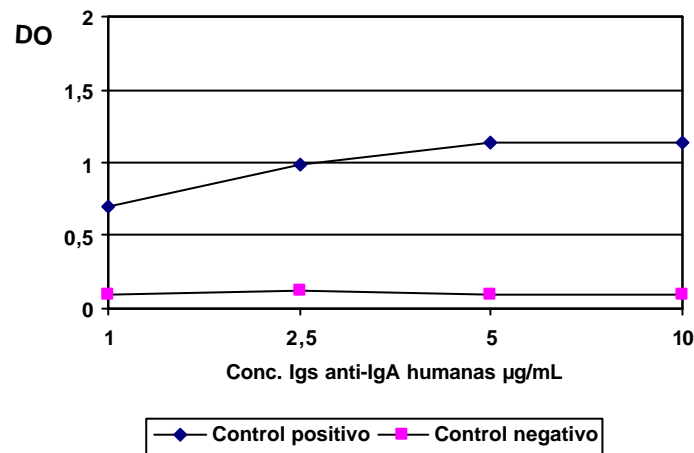


Figura 14: Determinación de la concentración óptima de saturación.

En la Figura 15 se observan los resultados obtenidos para las diferentes diluciones de antígeno, utilizando como concentración de saturación 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-IgA, sueros controles diluidos 1:100 y como dilución del conjugado 1:1 000. La mejor relación positivo / negativo se obtuvo para la dilución 1:8 del antígeno de referencia.

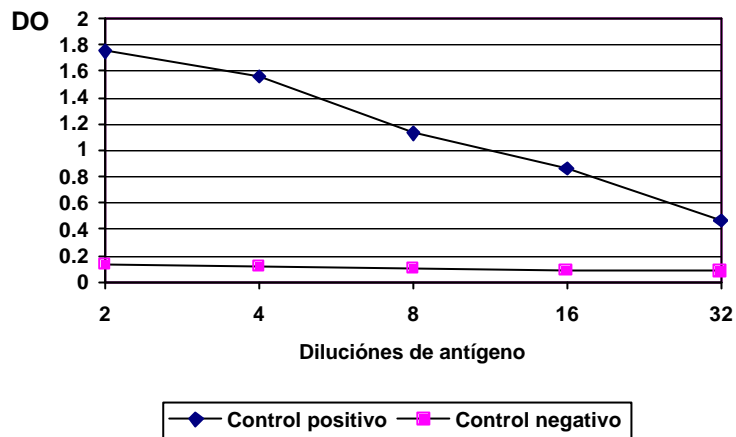


Figura 15: Determinación de la dilución óptima del antígeno.

En la Figura 16 se presentan los resultados obtenidos al graficar las DO para las diferentes concentraciones del conjugado, al utilizar 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-IgA, dilución 1:100 de los sueros controles y dilución del antígeno de referencia 1:8. Se observa que la mejor relación positivo / negativo se obtuvo a la dilución 1:1 000 del conjugado.

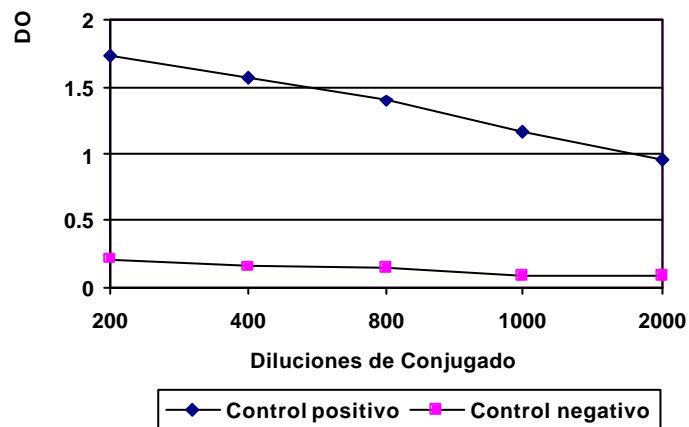


Figura 16: Determinación de la dilución óptima del conjugado.

IV.3.2 Comparación entre la IgM y la IgA séricas.

En la Tabla 13 se comparan los resultados obtenidos en la determinación de la IgM e IgA séricas específicas al VHA. De los 175 sueros procesados hubo Concordancia en 173 (98.8 %). Todas las muestras positivas a IgM procedían de pacientes con un cuadro clínico compatible con la enfermedad o sus contactos. La Sensibilidad de la IgA sérica para detectar una infección actual o reciente por el VHA fue del 96.87 % (IC 95% 92.61-101.13), la Especificidad de un 100 %. En dos casos en que se encontró discrepancia en los resultados de la IgM e IgA séricas, se correspondían con pacientes con un cuadro clínico compatible con una infección por el VHA, donde la muestra se obtuvo tempranamente. No obstante ser negativa a la IgA, los valores de la DO del ELISA estuvieron muy cercanos al valor de corte en ambos casos.

El VPP y VPN fueron de 100 % y 98.23 % (IC 95% 95.79-100.66) respectivamente y la RP+ y RP- fueron de 96.8 y 0.031 (IC 95% 0.007-0.122) respectivamente. El índice K fue de 0.97 (IC 95% 0.94-1.00) representando una concordancia muy buena.

Tabla 13: Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de IgM e IgA séricas anti-VHA.

		IgM	
		+	-
IgA Ser.	+	62	0
	-	2	111

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK. N=175

La IgM y la IgA anti-VHA proveen inmunidad en fases tempranas e intermedias de la infección, mientras que la IgG lo hace en una fase posterior. Trotta y col. en 1984 detectan IgA sérica por ELISA en pacientes con infección reciente, la cual fue detectable por lo menos seis meses después, Angarano y col. un año más tarde señalaron que es posible detectar la IgA anti-VHA sérica más allá de seis meses, pero menos de dos años

post infección, esos resultados fueron importantes para diferenciar casos prolongados de hepatitis A, con hepatitis no A no B.

La alta positividad de la IgA sérica anti-VHA en pacientes con hepatitis A confirmada por la determinación de la IgM específica al virus, sugiere que su hallazgo es indicador de una infección actual o reciente con este agente. Una alta prevalencia de IgA sérica específica viral ha sido reportada también en pacientes con infección primaria por CMV (Minochkin et al., 1999), en personas con infección primaria reciente por el virus de la rubeola (Gutiérrez et al., 1999), en infecciones por enterovirus (Muir et al., 1990) o después de la vacunación con la vacuna oral de la poliomielitis (Herremans et al., 2002) y además, ha sido un importante marcador de infección reciente en dengue (Balmaseda et al., 2003, Koraka et al., 2001). La no-determinación de IgA sérica específica al VHA en 111 muestras que tampoco mostraron positividad a la IgM y entre los cuales se encontraban niños y adultos, sugieren que la IgA en nuestra casuística se comporta como indicador confiable de infección reciente.

Es conocido que durante una infección reciente, los clones de células B vírgenes son los primeros en activarse por el virus produciendo IgM, la cual, en los siguientes días cambia a los isotipos IgG e IgA. La regulación del cambio a isotipo esta inducido por las células T y esta dirigido por citocinas. Altos niveles de IgA están relacionados con altos niveles de TGF-beta 1 (Transforming Growth Factor) el cual es un factor en el cambio de IgA (Min y Kim, 2003).

IV.3.3 Comparación entre la IgM en suero y la IgA secretora

En la Tabla 14 se comparan los resultados de la IgA secretora y de la IgM en suero. Se obtuvo una Sensibilidad de un 40.9 % (IC 95% 20.36-61.45), Especificidad de un 100 % y Concordancia de un 88.1%. El VPP y el VPN fueron de 100 % y 87 % (IC 95% 87-93) respectivamente. La RP+ y la RP- fueron de 40.9 y 0.591 (IC 95% 0.41-0.83) respectivamente. El índice K fue de 0.52 (IC 95% 0.29-0.75) representando una concordancia moderada.

Tabla 14: Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de IgM en suero y la IgA secretora anti-VHA.

		IgM	
		+	-
IgA	+	9	0
	Sec.	13	87

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK. **N=109**

La baja prevalencia de IgA secretora encontrada en las muestras de saliva al compararla con la IgM sérica, no consideramos sea explicado por el método utilizado para su determinación, pues ello hubiera influido también en la IgA sérica donde existió buena correlación con la IgM, a pesar de estar la muestra de suero diluida 100 veces, mientras la de saliva se utilizó pura. Tampoco podría explicarse por la acción de las enzimas de la saliva sobre la IgA durante el tiempo de conservación, ya que esta inmunoglobulina es particularmente resistente a esta acción, ya que resiste la hidrólisis de las proteasas del intestino (Fagarasan y Honjo, 2003). Se ha comprobado la utilidad de la muestra de saliva independientemente del momento de la toma de muestra, ingestión de alimentos o cepillado de dientes (O'Farrell et al., 1997).

La detección de la IgA secretora específica presente en la saliva fue solamente de un 40.9 % (9 de 22 casos). Stapleton y col. al estudiar la inmunidad intestinal en la hepatitis A de forma experimental en monos y en infecciones naturales en el hombre, encontraron que solamente dos de ocho monos infectados por vía intragástrica desarrollaron anticuerpos neutralizantes detectados en las heces obtenidas 88 días después de la inoculación, mientras que todos los mostraron en el suero a los 33 días. Asimismo, sólo uno de tres voluntarios humanos infectados experimentalmente y uno de 15 de forma natural mostraron anticuerpos neutralizantes en extractos de heces. También reportan que sólo dos de 19 pacientes mostraron anticuerpos en la saliva (Stapleton et al., 1991b). El porcentaje más alto encontrado por nosotros podría ser explicado por una mayor sensibilidad del método de ELISA utilizado en nuestro trabajo, aún cuando se reportan cifras más elevadas, por

ejemplo Oba y col. encontraron que la IgA en saliva posee un 80.8% de sensibilidad y 100 % de especificidad cuando se compara con el suero (Oba et al., 2000). Tilzey y col. también han encontrado una pobre respuesta de IgA en saliva y líquido parotídeo de personas que han sido inmunizadas con vacuna inactivada del VHA (Tilzey et al., 1992). Los bajos porcentajes de IgA en saliva encontrados por otros autores y nosotros en infectados con VHA, contrastan con la alta prevalencia de estos anticuerpos inducidos por cepas virulentas o atenuadas de otros miembros de la familia Picornaviridae como ocurre con los poliovirus (Muir et al., 1990, Stapleton et al., 1991b). El valor de la IgA en saliva también ha sido reportada para determinar la seropositividad a los virus del sarampión, rubéola y parotiditis (Garrido et al., 1997) y del CMV humano (Sarid et al., 2002).

Nuestros resultados sugieren que se produce una respuesta de IgA en saliva transitoria y poco frecuente. Es conocido que el desarrollo y persistencia de la IgA secretora parece estar relacionada con la cantidad de antígeno presentado al tejido linfoide del TGI y presumiblemente refleje la expansión clonal de las células secretoras de anticuerpos (Iijima et al., 2001). Durante la infección por el VHA, grandes cantidades de virus pasan del hígado al intestino, facilitando que el virus infecte las células intestinales. La falta de anticuerpos encontrados por algunos autores y nosotros (Stapleton et al., 1991b), evidencia indirectamente que el VHA se replica poco o nada en el TGI, pero, hay evidencias de que el VHA se replique en la orofaringe, aunque esto parece ser limitado y su papel en la patogenia es incierto (Cohen et al., 1989). De esto se deduce que las vacunas disponibles actualmente, probablemente no induzcan niveles significativos de anticuerpos secretores.

Recientemente se ha encontrado una fuerte respuesta tipo IgA en las células de la mucosa, fundamentalmente en los linfocitos de la lámina propia (que se conoce que es la principal fuente de IgA secretora) y en el suero, cuando se inmunizan ratones por vía rectal con dosis pequeñas de vacuna antihepatitis A. Se produce una respuesta de tipo TH2, la cual favorece la respuesta de IgA (Mittchel y Galun, 2003).

Los resultados obtenidos sugieren que la IgA sérica específica al VHA parece ser una alternativa para el diagnóstico de una infección actual o reciente con este virus, sobre todo en aquellos casos de infección recurrente donde la IgM ya se ha negativizado, y que

la IgA secretora no parece jugar un papel relevante en los mecanismos de inmunidad humoral contra este virus.

IV.4 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA de Inhibición para la detección de anticuerpos totales contra el VHA.

Se determinaron las concentraciones óptimas de cada reactivo mediante titulación cruzada, seleccionándose aquellas condiciones y criterios que permitieran una adecuada discriminación entre los sueros controles utilizados. La selección apropiada de los dos sueros controles, así como el ajuste al nivel de respuesta adecuado de cada reactivo biológico y sus condiciones de reacción, unido a la disponibilidad en calidad de lotes, constituyeron aspectos importantes a tener en cuenta.

IV.4.1 Determinación de las diluciones óptimas de la inmunoglobulina de recubrimiento, del antígeno y del conjugado.

En la Figura 17 se puede apreciar que a partir de los 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se alcanza la meseta en la curva. Esta concentración garantiza una saturación de forma estable, por lo que se selecciona 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inmunoglobulinas anti-VHA como la concentración óptima para el recubrimiento de las placas.

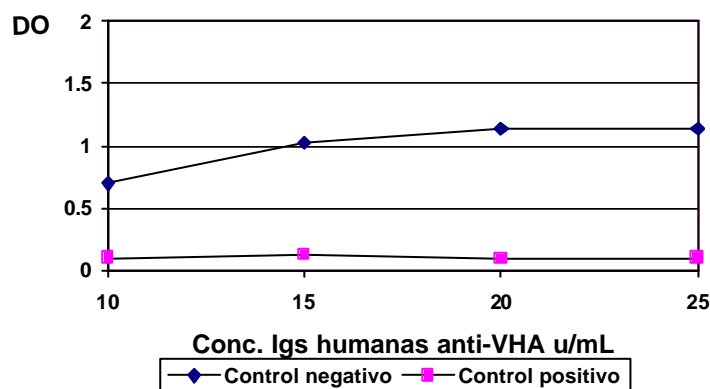


Figura 17: Determinación de la concentración óptima de saturación.

Para la selección de la dilución óptima del antígeno y el conjugado se tuvo en cuenta como criterio de concentración óptima la que brindara una relación negativo / positivo mayor o igual a 10, que brindara una DO del negativo cercana a 1 y que a su vez permitiera una buena economía de los reactivos. Se seleccionaron como concentraciones óptimas la dilución de antígeno de 1:5 y conjugado 1:1 000 (Figuras 18 y 19).

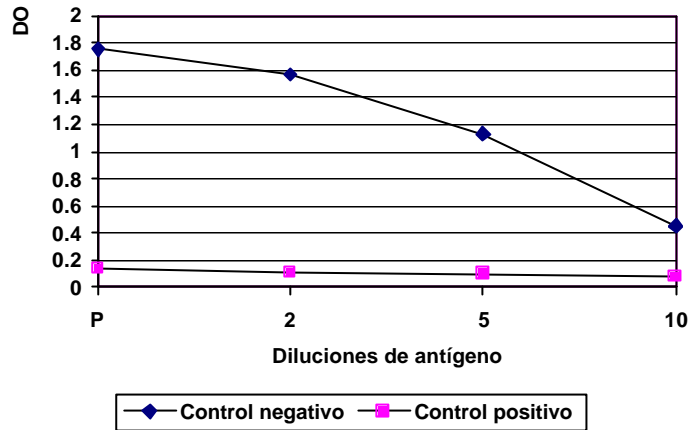


Figura 18: Determinación de la dilución óptima del antígeno.

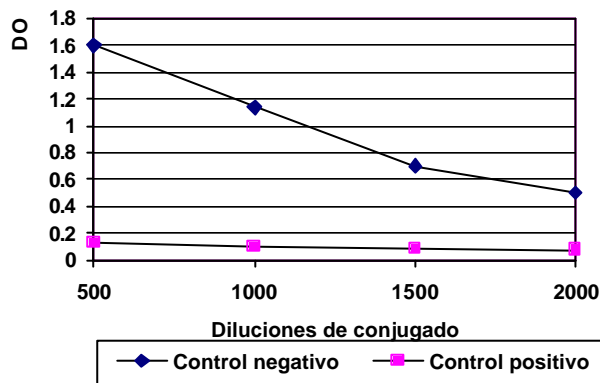


Figura 19: Determinación de la dilución óptima del conjugado

IV.4.2 Determinación de la dilución óptima de los sueros y de la temperatura de incubación.

El procedimiento usado por nosotros sigue el mismo principio que el sistema comercial Heganostika anti-HAV, y se diferencia en lo referente a la técnica operatoria en cuanto a la dilución de trabajo de los sueros y a la temperatura de incubación con la muestra y el antígeno. Para ello evaluamos mediante titulación cruzada estos dos parámetros (Tablas 15 y 16).

Tabla 15: Comparación de las diluciones del suero a la temperatura de 37 °C.

<i>Dilución del suero</i>	<i>DO control negativo</i>	<i>DO control positivo</i>	<i>Relación N/P*</i>
<i>1:10</i>	<i>1.250</i>	<i>0.091</i>	<i>13.9</i>
<i>1:50</i>	<i>1.540</i>	<i>0.165</i>	<i>9.3</i>

* Relación negativo/positivo. Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

Tabla 16: Comparación de las diluciones del suero a la temperatura de 50 °C.

<i>Dilución del suero</i>	<i>DO control negativo</i>	<i>DO control positivo</i>	<i>Relación N/P*</i>
<i>1:10</i>	<i>0.546</i>	<i>0.112</i>	<i>4.9</i>
<i>1:50</i>	<i>0.833</i>	<i>0.141</i>	<i>5.9</i>

* Relación negativo/positivo. Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

Se seleccionó para el análisis cualitativo como dilución de trabajo del suero 1:10 y la temperatura de incubación con la muestra y el antígeno de 37 °C, ya que estos parámetros en las condiciones ensayadas permitieron la mejor discriminación entre negativo / positivo.

IV.4.3 Evaluación del ensayo.

Una vez normalizada la técnica se comparó cualitativamente con el ensayo comercial “Hepanostika anti-HAV“. Para ello se evaluaron un total de 38 muestras de sueros, de las cuales, 18 fueron positivas y otras 18 negativas por ambas técnicas. Solamente 2 muestras resultaron discrepantes, las cuales fueron positivas por el ensayo comercial y negativas por el ELISA desarrollado. El ELISA de Inhibición mostró una Sensibilidad del 90 % (IC 95% 76.87-103.14), Especificidad del 100 % y Concordancia del 94.7 % (Tabla 17).

Tabla 17: Comparación de los resultados obtenidos con el ELISA comercial Hepanostika anti HAV.

E	Hepanostika anti-HAV	
	+	-
L	18	0
I		
S	2	18
A		

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK. **N=38**

Los VPP y VPN fueron de 100% y 90% (IC 95% 76.85-103.14) respectivamente. La RP+ y RP- fueron de 90 y 0.099 (IC 95% 0.026-0.37) respectivamente. El índice K fue de 0.89 (IC 95% 0.75-1.03) representando una concordancia muy buena.

Los dos sueros discordantes presentaban valores de absorbancia cercanos al valor de corte. Por el ELISA desarrollado, estas presentaban porcentajes de inhibición de 37 % y 42 % respectivamente; mientras que por el ELISA Hepanostika anti-HAV presentaban porcentajes de inhibición de 55 % y 63 % respectivamente.

El aumento de la temperatura provoca un aumento de la velocidad de difusión, y por tanto un aumento de la interacción entre biomoléculas, siendo la temperatura más usada la de 37 °C. A pesar de que sistemas comerciales como Hepanostika anti-HAV empleen temperaturas de incubación de 50 °C, temperaturas superiores a 37 °C pueden producir desnaturalización de las proteínas y efectos deletéreos en el antígeno (Crowther, 1995). En cuanto a las dilución óptima de los sueros, algunos autores, utilizando esta variante de ELISA han seleccionado la dilución 1:10 como la óptima (Lamarca et al., 1991, Víctor et al., 1994), sin embargo, Duermeyer en 1980, seleccionó la dilución 1:100 para disminuir el número de falsos positivos.

Generalmente son suficientes concentraciones de saturación de las placas entre 1 y 10 µg/mL, sobre todo en los sistemas de Inhibición para lograr una buena sensibilidad y detectabilidad, no obstante, deben estimarse en cada caso y valorar cada situación particular (Porstmann y Kiessig, 1992, Crowther, 1995, Ochoa et al., 2000b). En nuestro

ensayo la meseta y mejor discriminación entre los sueros negativos y positivos se logró con la concentración de 20 µg/mL, garantizando una saturación de forma estable. No se utilizaron agentes bloqueadores, igualmente a lo reportado por Duermeier en 1980, aunque otros autores han usado gelatina al 1% (Leentvaar-Kuijpers et al, 1992)

En cuanto a la sensibilidad obtenida, la misma puede estar influenciada por varios factores extrínsecos e intrínsecos. Dentro de los factores extrínsecos tenemos: que los sueros con valores de absorbancia muy cercanos al valor de corte se encuentran dentro de la llamada zona gris, por lo que a veces dan positivos y otras veces negativos, además, el período de conservación de los sueros que también puede influir. Dentro de los factores intrínsecos están: que el ensayo puede presentar una menor detectabilidad que el sistema comercial (Crowther, 1995).

La sensibilidad de los ensayos de inhibición también depende de la afinidad de los anticuerpos presentes en la muestra. Debido a que los sueros policlonales presentan diferente avidéz, se incrementa la posibilidad de que ocurran reacciones falsas negativas (Porstmann y Kiessig, 1992). Para incrementar la sensibilidad de los ELISA de Inhibición se puede bajar el valor de corte a un 20% de inhibición, o se puede valorar el incremento del volumen de suero a analizar (Just y Berger, 1992).

El ELISA desarrollado se aplicó en el análisis de 35 lotes de preparados de Inmunoglobulinas, estimándose su título por "titulación a punto final". Todos los preparados de inmunoglobulinas presentaron títulos anti-VHA entre 1:1200 y 1:25000 (promedio 1:5294). Los preparados de inmunoglobulinas humanas a base de sueros de donantes, provenientes de regiones de alta endemicidad al VHA como la nuestra, donde un gran porcentaje de la población llega a la adultez siendo inmune, es de esperar que contengan altos títulos de inmunoglobulinas contra este virus. Los resultados obtenidos aquí, coinciden con las evidencias epidemiológicas. .

IV.4.4 Límite de detección y dosis cero

Después de realizar diluciones seriadas del suero de referencia internacional de la OMS, de modo que se pudiera estimar con la mayor exactitud posible las asintotas superior e inferior, se ajustaron los datos experimentales. La dosis cero comenzó a partir de la dilución que se corresponde con X igual a 8 (Figura 20). Esto es dado porque a partir de esta dilución la curva presenta un comportamiento asintótico con una pendiente igual a

cero, por lo que en este rango el ensayo no discrimina las variaciones de la concentración del analito, dando una misma respuesta (valores de absorbancia similares) ante diferentes concentraciones del analito.

La función logística de cuatro parámetros mostró un excelente ajuste de los datos experimentales con un coeficiente de regresión no lineal de 0.996. El ensayo desarrollado presentó un Límite de Detección de 124 mUI/mL.

La representación de la DO como una función logística de 4 parámetros, con la estimación llevada a cabo en una escala logarítmica, es el procedimiento más apropiado para determinar la concentración de antígenos y anticuerpos por el método de ELISA. La utilización de una curva patrón en los ensayos de ELISA, para la cuantificación de los niveles de inmunoglobulinas, ha aportado ventajas prácticas con relación a la utilización de diluciones seriadas de las muestras de sueros (Karspinski et al, 1987, Karpinski, 1990, Fossceco y Curtis, 2003). En estos ensayos la concentración de anticuerpos puede determinarse con una curva de calibración, transformando los valores de absorbancia auxiliándose de modelos matemáticos, así, los resultados son expresados en títulos de anticuerpos por Unidades internacionales. Además, simplifica el costo y la ejecución de los ensayos, ya que incrementa el número de determinaciones por placa. Por otro lado, mejora la reproducibilidad del ensayo. La disponibilidad del patrón de la OMS de Hepatitis A posibilitó la obtención de resultados comparables desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, aunque algunos autores han planteado que aún cuando los ensayos se estandaricen con el mismo suero de referencia, los títulos dependen en gran proporción del método empleado (Riedermann et al., 1992, Berger et al., 1993).

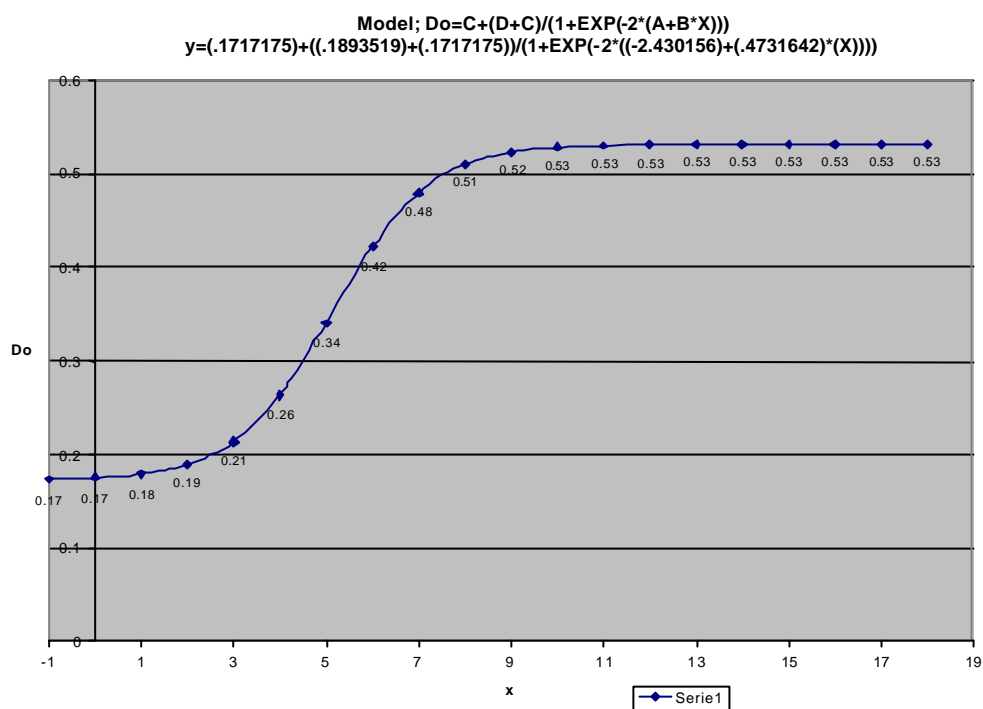


Figura 20: Curva patrón del suero de referencia de la OMS, utilizada en el cálculo del Límite de Detección

Entre los ELISAs comerciales más sensibles se encuentran: el HAVAB IMX (Abbott) con un límite de detección de 18–25 mUI/mL y el ENZIMUN anti-VHA (Boehringer) que detecta 22 mUI/mL. Otras firmas, como Smith Kline y Roche han logrado desarrollar ensayos capaces de detectar 20 mUI/mL. Sin embargo, el HAVAB RIA con un límite de detección de 100-150 mUI/mL es el ensayo utilizado en la estandarización del suero de referencia internacional (Robbins et al., 1991, Delem, 1992, Berger et al., 1993, Lemon, 1993, Hess et al., 1995, Wiedmann et al., 2003).

Los estudios de seroprevalencia en hepatitis A, son muy importantes, en el sentido de que la mayoría de las infecciones en edades tempranas de la vida son asintomáticas o subclínicas y la incidencia varía con amplias diferencias entre países y aún dentro de una misma comunidad (Fiore, 2004). Teniendo en consideración que la respuesta producto de la infección natural por el VHA es cuantitativamente mucho mayor que la respuesta de anticuerpos post-vacunales (Lemon, 1993), podemos afirmar que el ELISA desarrollado puede ser una herramienta útil para estudios epidemiológicos de seroprevalencia, además,

podría ser utilizado para la preparación uniforme de los lotes de inmunoglobulinas anti-hepatitis A producidos en nuestro país para la inmunización pasiva en el control de focos y para la evaluación de sueros positivos y negativos útiles para la preparación de reactivos. Debido a su alta reproducibilidad, constituye una técnica analítica importante en la investigación de la hepatitis A.

IV.5 Desarrollo, evaluación y aplicación de un ELISA tipo Sándwich o de doble anticuerpo para la detección del VHA en muestras clínicas y en cultivos celulares.

Una vez obtenidos los reactivos necesarios, se seleccionaron las concentraciones de los reactivos biológicos, escogiéndose aquellos que ofrecieran una adecuada discriminación entre las muestras positivas y negativas utilizados.

IV.5.1 Determinación de la concentración de saturación y de la dilución óptima del conjugado.

En la Figura 21 se presentan los resultados obtenidos al graficar los valores de DO a diferentes concentraciones de la IgG anti-VHA humana, utilizando una suspensión de heces positivas y negativas al 20 %, antígeno del VHA producido en células FRhK4 e inactivado diluido 1:10 y células FRhK4 sin inocular a igual dilución y el conjugado anti-VHA diluido 1:1 000. Como se observa, a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se alcanza la meseta de la curva, considerándose esta como la concentración óptima de saturación.

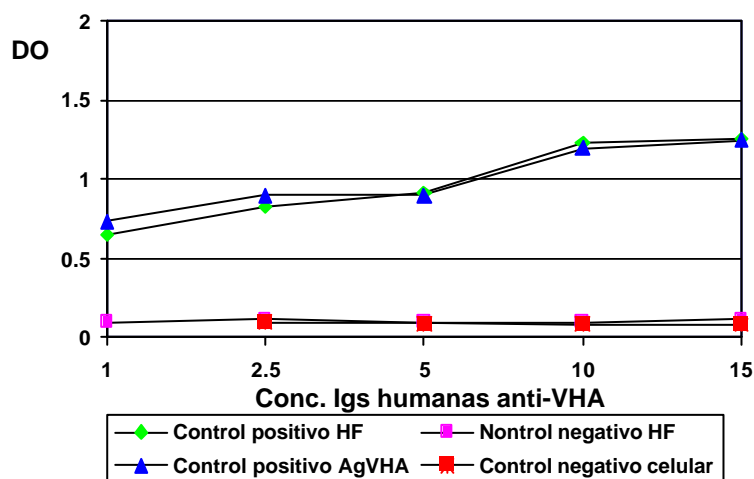


Figura 21: Determinación de la concentración óptima de saturación

En la Figura 22 se presentan los resultados obtenidos al graficar las DO para las diferentes concentraciones del conjugado, al utilizar 10 µg/mL de IgG anti-VHA humano, suspensiones de heces positivas y negativas al 20%, antígeno del VHA producido en células FRhK4 e inactivado diluido 1:10 y células FRhK4 sin inocular. Se observa que la mejor relación positivo/negativo se obtuvo a la dilución 1:1 000 del conjugado.

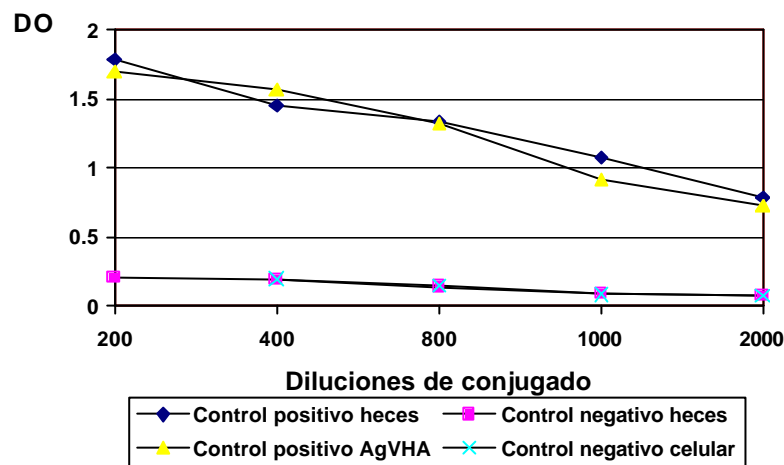


Figura 22: Determinación de la dilución óptima del conjugado.

En 53 muestras negativas analizadas por este EIE y el control negativo de células FRhK4 sin inocular, la relación (DO muestra negativa / DO media de los controles negativos) fue siempre menor de 2.0, resultados que avalan el uso del valor de corte establecido para el ensayo (Xn por la constante 2.1).

IV.5.2 Comparación del ensayo.

Se obtuvo un 100 % de Concordancia entre los resultados obtenidos por los reactivos procedentes del IPEV y los reactivos preparados en el laboratorio. De las 60 muestras analizadas, 7 (11.66%) resultaron positivas y 53 negativas. No hubo diferencias en los dos tiempos usados para la incubación de la muestra: 4 horas a 37°C o toda la noche a TA.

A partir de la década de los años 70, se reportaron numerosas técnicas para la detección del VHA en muestras crudas de heces: IME, FC, HIA, RIA y ELISA (Feinstone et al., 1973, Miller et al., 1975, Provost et al., 1975, Coursaget et al., 1980, Duermeier, 1980, Nadala y Loh, 1990b). Se han utilizado anticuerpos monoclonales para la captura del VHA o sueros policlonales humanos, ambos con resultados satisfactorios (Coulepis et al.,

1985). En nuestra experiencia la selección de anticuerpos de la misma especie (humano) para la sensibilización de las placas y la preparación de los conjugados enzimáticos, no ofreció desventajas prácticas relacionadas con la reacción de fondo, resultado planteado con anterioridad en la literatura revisada (Crowther, 1995).

El valor de corte utilizado en nuestras condiciones fue adecuado, otros autores han usado como valor de corte la media de los controles negativos más 3 desviaciones estándar con similares resultados (Coulepis et al., 1985).

A pesar de no existir diferencias entre los resultados utilizando ambas temperaturas de incubación de la muestra, se escogió el protocolo de 4 horas a 37 °C, debido a que esta es la temperatura más usada y además cuando se utiliza la TA, hay que monitorear las posibles variaciones de temperatura del laboratorio (Crowther, 1995). Por otro lado, este protocolo permitía un esquema de trabajo más conveniente y rápido.

IV.5.3 Aplicación del ELISA de detección del VHA en muestras de heces procedentes de brotes.

Durante el período 1996-1998 se estudiaron 19 brotes de HVA procedentes de diversas instituciones cerradas y población abierta de C de la Habana. El objetivo del análisis de las heces fue tratar de aislar cepas autóctonas del VHA en cultivos celulares continuos (FRhK4) y diploides (MRC-5) y así contar con cepas candidatas a la obtención de una vacuna inactivada. En la Tabla 18 se observan los resultados obtenidos en cada uno de los brotes estudiados, que analizaremos a continuación. De los 19 brotes, en 15 de ellos se pudo recoger ambas muestras para estudio (heces y sueros). De un total de 346 muestras de heces, 60 (17.34%) fueron positivas al VHA, mientras que de 372 muestras de sueros recogidos, 140 (37.63%) resultaron positivos a la IgM anti-VHA.

Se pudo confirmar que el VHA fue el agente responsable del brote en 15 de ellos (78.94%). De estos 15 brotes, en 11 (73.33%) los marcadores en muestras de heces y sueros fueron positivos, mientras que por heces positivas se diagnosticó un sólo brote (6.66%), y por sueros positivos se confirmaron 3 brotes (20%).

El VHA es comúnmente transmitido por vía fecal-oral. Estudios iniciales usando IME realizados después del descubrimiento del VHA en los años 70s, sugirieron que poco o ningún virus era excretado después del pico de la ALAT o la aparición de la ictericia (Dienstag et al, 1975). Usando técnicas más sensibles (RIA y EIE) encontraron que la

eliminación fecal puede persistir hasta tres semanas después del comienzo de la ictericia (Coulepis et al, 1980). Estudios recientes usando RCP han indicado que los niños y adultos infectados excretan el VHA por tres meses o más (Yotsuyanagi et al., 1996). Sin embargo, estudios posteriores han indicado que sólo las suspensiones de heces altamente reactivas (EIE positivas) desarrollan infección por el VHA en monos tamarins (Polish et al., 1999).

En un estudio similar al nuestro, realizado en Ciudad de la Habana en el año 1991, Balmaseda y col reportan un 7.2% de positividad del VHA en muestras de heces, así como un 27.8% de positividad a la IgM en suero, resultados algo más bajos a los obtenidos por nosotros (Balmaseda et al., 1994). Coulepis y col en 1980 reportan positividad al VHA en heces por RIA e IME, en 59 de 200 (29.5%) pacientes con hepatitis A admitidos en un hospital.

Los cuatro brotes que no pudieron confirmarse, pensamos que pudieran ser ocasionados por otro agente hepatotropo de transmisión entérica, el VHE, que conocemos circula en nuestro país (Lemos et al., 2000). También pudiera deberse a que las muestras fueron tomadas fuera de tiempo o en malas condiciones.

Tabla 18: Resultados del análisis de muestras de heces y sueros de 19 brotes de HVA.
Ciudad de la Habana. 1996-1998.

BROTOS	HECES		SUEROS	
	NO	+	NO	IGM +
1	13	1	13	5
2	12	5	0	0
3	11	2	1	1
4	6	0	6	0
5	25	0	0	0
6	6	0	2	1
7	9	0	0	0
8	10	0	0	0
9	84	3	129	16
10	2	0	2	1
11	14	1	5	4
12	8	5	12	10
13	2	1	3	2
14	12	3	71	34
15	26	3	47	2
16	34	3	28	14
17	7	3	29	26
18	28	0	16	16
19	37	30	8	8
TOTAL	346	60 <i>(17.34%)</i>	372	140 <i>(37.63%)</i>

Fuente: Laboratorio de Hepatitis virales/IPK.

Nuestros resultados permiten concluir que el anticuerpo IgM es el de mayor importancia diagnóstica, además, el trabajo con heces requiere del procesamiento previo de la muestra, mientras que el suero solo necesita diluirse adecuadamente para su análisis. Si bien la detección del VHA en heces no es de utilidad diagnóstica, su positividad es señal inequívoca de infección actual y que la persona es altamente contagiosa para sus contactos y la comunidad. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura (Duermeier, 1980, Lemon, 1997, Polish et al., 1999).

IV.5.4 Aplicación del ELISA de detección del VHA en cultivos de células. Titulación de la infectividad viral.

Es conocido que el VHA no posee ECP en los cultivos celulares infectados, de ahí que se necesiten sistemas adicionales que permitan monitorear la replicación viral. El ELISA Sándwich o de doble anticuerpo constituyó una herramienta indispensable para este propósito. La cepa cubana M2 clon C5 producida en FRhK4 alcanzó el máximo título por ELISA entre los 18 y 21 días post inoculación.

La estandarización de la titulación de la infectividad viral, usando el ELISA se desarrolló con resultados satisfactorios. La cepa cubana M2 clon C5 alcanzó una TCID₅₀/mL en células FRhK4 de entre 10⁴ y 10⁶ (recíproco de la dilución del virus).

En la Figura 23 se muestra la titulación de la infectividad viral en células FRhK4 mediante ELISA Sándwich o de doble anticuerpo. Las diluciones seriadas (en base 10) del virus fueron inoculadas en células FRhK4 (8 replicas por dilución) e incubadas durante 21 días. La cosecha viral se realizó mediante ciclos de congelación / descongelación. El sobrenadante fue analizado mediante ELISA Sándwich o de doble anticuerpo.

Se observa que a la dilución 1:10, el rendimiento de virus infeccioso disminuye, sin embargo, a diluciones más altas (de 10² a 10⁴) aumenta la infectividad viral. La cepa cubana M2 clon C5 producida en FRhK4, alcanzó el máximo título por ELISA entre los 18 y 21 días post inoculación; este resultado ha sido igualmente reportado en la literatura, planteándose que el pico de infectividad viral oscila entre 18 y 25 días (Krah, 1991, Lamarca et al., 1991, Hou et al., 1999).

Se observó que con diluciones entre 10² a 10⁴ aumenta la infectividad viral, estos resultados refuerzan lo planteado en la literatura que, para producir virus para la producción de vacunas y antígeno para ELISA se requieren inóculos a altas diluciones., mientras que para la producción de virus-semilla es mejor utilizar bajas diluciones (Robertson y Bradley, 1995). En nuestra experiencia, para la producción de virus, se utiliza la dilución 1.50 o 1:100 con un buen rendimiento.

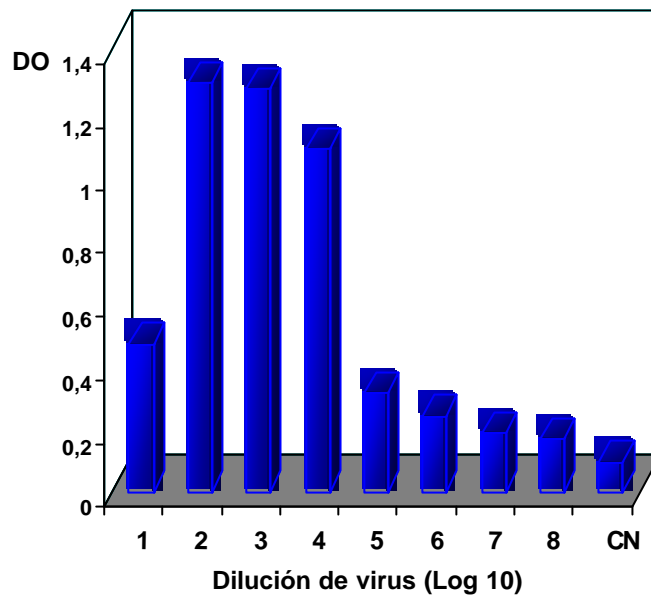


Figura 23: Titulación de la infectividad viral en células FRhK4 mediante ELISA Sándwich o de doble anticuerpo.

El uso de células FRhK4 en suspensión demostró ser muy eficiente en nuestros resultados, similares a los planteados por Beales y col en 1996, así como el uso de SFB al 2% en el medio, aunque, algunos autores han planteado que la unión del VHA ocurre más eficientemente en medios libres de suero (Zajac et al, 1991).

El ensayo de infectividad viral ($TCID_{50}/mL$) provee una medida cuantitativa de la cantidad de virus infeccioso en cultivos celulares, siendo su utilidad limitada en la práctica diagnóstica (Robertson y Bradley, 1995). Varios ensayos han sido desarrollados para medir la infectividad viral utilizando diferentes métodos de detección. Se ha usado el ELISA (Yap y Lamb, 1994, Borovec y Unen, 1997), la fluorescencia (Nadala y Loh, 1990a), o utilizando un anticuerpo radioyodado (Krah, 1991). Más recientemente, el uso de cepas citopáticas, han permitido el desarrollo de ensayos utilizando una sobrecapa de carboximetilcelulosa al 1% (Beales et al., 1996).

A diferencia de los EIE "in situ", el propuesto aquí requiere de la liberación y transferencia del antígeno hacia una placa separada para la detección por EIE, que si bien es más trabajoso, ha probado ser útil y confiable, además, la titulación de la infectividad es una técnica que no se usa de rutina en nuestro laboratorio.

La determinación del título infectivo viral es de gran importancia en la producción de vacunas, para los ensayos de Potencia de preparados vacunales (Peetermans, 1992, Poirier et al., 2000), para validar la eficacia de procedimientos de inactivación viral (Pellegrini et al., 1993, Wang et al., 1995, Borovec y Unen, 1997) y para la estandarización de la técnica de neutralización (Zahn et al., 1984), entre otros.

IV.6 Conformación del juego de reactivos IgM-VHA. Descentralización del diagnóstico a otras regiones del país.

El juego de reactivos para la detección de anticuerpos IgM contra el virus de la hepatitis A (IgM-VHA) se conformó para realizar un total de 180 determinaciones, ya sea en placas completas o como mínimo con 4 tiras desmontables, correspondientes a un total de 26 muestras.

IV.6.1 Componentes del ensayo.

1. *Buffer de lavado y dilución de las muestras (PBS, 25X) (100 ml).*

Para preparar el buffer de dilución del antígeno y el conjugado: una vez preparado el PBS con el Tween (PBS-T), se adiciona el SHN al VHA al 5%.

2. *Suero control positivo (Listo para usar) (1 ml).*

3. *Suero control negativo (Listo para usar) (1.5 ml).*

4. *Antígeno del VHA, cepa cubana M2 clon C5 (2 frascos X 1 ml).* Se utiliza a la dilución 1:5 en buffer de dilución.

5. *Conjugado anti-VHA/peroxidasa prediluido (1.2 ml).* Se utiliza a la dilución 1: 10 en buffer de dilución.

6. *Suero humano negativo a los marcadores del VHA (1.2 ml).*

7. *Peróxido de Hidrógeno (100 ul).*

8. *Tween 20 (1.25 ml).*

9. *Sustrato (liofilizado, se reconstituye con 5 ml de agua destilada) (6 frascos).*

10. *2 placas sensibilizadas con anti-IgM humana (180 determinaciones).*

El antígeno del VHA se incluye inactivado con formaldehído 1:2 000, 3 días a 37 °C, los controles positivos, negativos y el SHN son no reactivos a los virus VIH 1 y 2, HBsAg y VHC, no obstante se recomienda manejarlos con precaución.

IV.6.2 Procedimiento.

- Retirar del estuche las placas o tiras a utilizar según el número de muestras a procesar. Se recomienda confeccionar un protocolo de trabajo previo, identificando correctamente la posición de las muestras y los controles.
- Añadir las muestras a analizar diluidas 1:1000 en PBS-T. Se deben colocar como mínimo 2 controles positivos y 4 controles negativos (preferentemente en las posiciones 1C, 1D, 2C y 2D), los controles no deben diluirse ya que se ofertan listos para usar. En todos los casos dispensar 50µL/pocillo.
- Incubar 1 hr a 37 °C en cámara húmeda (CH).
- Lavar 4 veces con PBS-T 1X, utilizando un volumen de 250-300 uL por pozo. Si se dispone de lavador automático seguir un procedimiento similar. Secar la placa invirtiéndola sobre papel de filtro
- Dispensar 50µL/pocillo del antígeno del VHA diluido 1:5 (el buffer de dilución consiste en PBS-T mas suero humano negativo a los marcadores del VHA al 5%). Se incuba a 37 °C, 2 horas en CH.
- Lavar 4 veces con PBS-T como se explica en el paso 4.
- Añadir el conjugado anti-VHA/peroxidasa a la dilución 1:10 (50µL/pocillo) en un buffer de dilución igual al anterior. Incubar 1 hora a 37 °C en CH.
- Lavar 5 veces con PBS-T como se explica en el paso 4.
- Agregar 50µL/pocillo del sustrato. Cada frasco debe reconstituirse con 5 ml de agua destilada. Homogeneizar suavemente y añadir 2 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Incubar a TA en CH durante 15 minutos. Proteger de la luz.
- Detener la reacción adicionando 50 µL/pocillo de una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 12.5% en el mismo sentido en que se añadió el sustrato.
- Medir la DO de cada pocillo, utilizando un lector de ELISA con filtro de 492 nm. En caso de no poseer lector, existe la posibilidad de la lectura visual del ensayo, comparando la coloración de los controles con los de cada prueba individual

IV.6.3 Cálculo de los resultados y validez de la prueba.

- Calcular la media de la DO de los controles negativos (Xn).
- Calcular la media de la DO de los controles positivos (Xp).

- Los controles negativos con DO iguales o superiores a 0.2 deben ser eliminados. Si más de la mitad de los controles negativos son eliminados, la prueba no será válida.
- El ensayo será válido si la relación X_p/X_n es mayor de 5.
- El valor de corte se calcula como X_n por la constante 2.1.

IV.6.4 Interpretación de los resultados:

Se consideran positivos los valores de absorbancia iguales o superiores al valor de corte y negativos los inferiores al mismo.

IV.6.5 Almacenaje y estabilidad.

Cuando no se encuentren en uso, los reactivos deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C, excepto el antígeno VHA que debe almacenarse congelado a -20 °C. Los reactivos y placas así conservados, tendrán una estabilidad garantizada durante 6 meses.

IV.6.6 Medidas de bioseguridad.

Al manipular sueros humanos para su análisis mediante la prueba deben observarse las precauciones requeridas por bioseguridad en laboratorios BSL 2 (*Biological Safety Level*), para evitar infecciones por el VIH, VHB, VHC u otros agentes similares.

IV.6.7 Descentralización del diagnóstico.

En el año 1999 se propuso poner en marcha del diagnóstico de la hepatitis A en otras regiones del país. El objetivo de la descentralización del diagnóstico fue estudiar el papel del VHA en las siguientes situaciones: brotes de HVA, fallecidos por FHF, casos agudos de hepatitis viral con HBsAg positivo y menores de 24 años de edad y embarazadas con cuadros de HVA. Se escogieron 4 centros de salud ubicados en tres regiones del país: occidental, central y oriental. Estos centros fueron: Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de la Habana (CPHE-CH), IGE, Laboratorio SUMA de Sancti Spiritus y Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Santiago de Cuba (CPHE-SC). Para este fin, se realizó un curso de entrenamiento en el IPK, dirigido al personal encargado de la realización de la técnica en cada centro. En el período 1999-2003, se han entregado un total de 4416 determinaciones de IgM anti-VHA (CPHE, 768, IGE, 2304, CPHE-SC, 1344). En la evaluación de los resultados de los ensayos, el promedio de la DO de los controles positivos fue 0.905, mientras que para los controles negativos fue de 0.153, el cual fue satisfactorio. Los resultados obtenidos están acorde con los criterios de

validez de los ensayos y en general se observa uniformidad en los valores de DO de los controles en cada laboratorio analizado. La utilización de paneles de referencia sería una de las medidas encaminadas a garantizar el buen funcionamiento y calidad del juego diagnóstico.

IV.7. Consideraciones generales

La hepatitis viral tipo A es una enfermedad endemo-epidémica en Cuba, constituyendo del 80 al 90 % del total de los casos reportados de HVA. El VHA es capaz de generar anticuerpos como primera línea de defensa, de tipo IgM, IgA e IgG, los cuales poseen variedad de afinidad y pueden ser detectados a través de EIE, siendo de gran utilidad para el diagnóstico. A la altura del conocimiento de las diversas formas de hepatitis, la clasificación de las mismas, siguiendo el criterio clínico o epidemiológico se considera obsoleta, siendo la determinación de la IgM anti-VHA una herramienta imprescindible en el algoritmo diagnóstico de la hepatitis viral. En nuestro estudio hemos comprobado la utilidad de los EIE en el estudio de la hepatitis viral tipo A. Los EIE y en particular el ELISA, debido a su sensibilidad, especificidad, rapidez y facilidad de ejecución, ha devenido en un potente instrumento analítico en el diagnóstico virológico, superando íntegramente a otros métodos. La combinación de la especificidad de las reacciones inmunológicas con la amplificación enzimática da como resultado una unión perfecta de gran aplicabilidad en el diagnóstico clínico.

Las respuestas a las autoridades de Salud Pública, de la necesidad de contar con el diagnóstico confirmatorio de la hepatitis A se han respondido con la normalización de técnicas tipo ELISA en nuestras condiciones y su evaluación frente a estándares internacionales.

La profundización en el conocimiento de los aspectos bioquímicos e inmunológicos del VHA, así como definir desde el comienzo los objetivos a alcanzar y realizar un exhaustivo examen de la literatura, fue una premisa importante en nuestro trabajo.

Las reglas para el desarrollo de un ensayo son: factibilidad, validación y estandarización y control de calidad. Un paso importante fue contar con la primera cepa cubana aislada en Cuba, ya que nos garantizaría libertad absoluta en la preparación de los reactivos, unido a una experiencia previa en la estandarización de técnicas tipo microELISA en diferentes enfermedades infecciosas.

La culminación de un ensayo diagnóstico, con la robustez necesaria, debe comenzar desde la etapa de investigación (determinación de las condiciones óptimas de los ensayos), el cual garantizará la consistencia de los resultados y la transferencia de la tecnología si la hubiera. En este sentido, adquiere particular importancia la validación del mismo. Los métodos de validación incluyen todos aquellos procedimientos requeridos para demostrar que un método en particular es confiable para la aplicación propuesta, y por tanto, asegura que el ensayo es aplicable al estudio problema, siempre y cuando se garantice que los lotes subsiguientes tengan similares características. La comparación de los ensayos diseñados con los estándares internacionales demostró su utilidad y la calidad de los mismos para ser usados en la práctica diagnóstica diaria y en la investigación de la hepatitis A, así como la confiabilidad de los resultados.

El ELISA de Captura de IgM desarrollado, obtuvo una evaluación excelente, acorde a los parámetros internacionales, la calidad y sencillez del mismo hizo posible un desempeño diagnóstico adecuado en nuestras condiciones. No sólo permitió resolver un problema de salud nacional, sino que permitió aportar nuevos conocimientos en esta enfermedad y el rol que juega la infección de la hepatitis A en el amplio campo de las hepatitis virales. Particularmente, confirma a la IgM anti-VHA como el marcador diagnóstico universal en esta enfermedad, detectado al final del período de incubación hasta tres a seis meses post infección. Este mismo marcador puede ser efectivamente determinado en otros fluidos orgánicos con bajas concentraciones de inmunoglobulinas como la orina, también, puede ser detectado si la sangre se colecta en papel de filtro, muy útil para el estudio de epidemias ocurridas en niños o en poblaciones de difícil acceso.

El rápido desarrollo de los países, la población y la industrialización ha resultado en la urgente demanda de métodos nuevos, simples y baratos para diagnosticar las enfermedades infecciosas. En este sentido, la utilización de muestras alternativas al suero y no invasivas (saliva u orina), donde efectivamente puedan detectarse sustancias que revelen el estatus de salud o enfermedad de un individuo, es un aspecto a tener en cuenta en la actualidad. La emergencia de nuevas tecnologías, como combinación de la miniaturización y los nuevos descubrimientos en el campo de la ciencia, con la creación de analizadores portátiles diminutos, que puedan realizar múltiples operaciones en paralelo y en lugares diferentes al laboratorio, también, requerirán de mínimas cantidades

de fluidos corporales, tomadas rápidamente por personal no especializado. Esta tecnología devendrá en un positivo impacto en las nuevas estrategias de terapéutica y prevención de las enfermedades infecciosas. Por otro lado, se demuestra la efectiva utilidad de la muestra de orina en el estudio de brotes de HVA, aunque el criterio clínico debe ser muy cuidadoso en casos aislados. Además, se reporta un estudio de la estabilidad de este tipo de muestra y de la cinética preliminar del mismo, aportando nuevos datos, no precisados hasta el momento, del uso de la orina como elemento diagnóstico.

La IgA detectada en suero puede considerarse un marcador de fase aguda, al comportarse igual que la IgM, no obstante, debido a su persistencia más allá de seis meses y su desaparición hacia los dos años posterior a la infección, debe valorarse con extremo cuidado. Su utilidad para aquellos cuadros prolongados o recurrentes, cuando la IgM se ha negativizado es indudable. En contraste, la pobre respuesta de IgA secretora detectada en saliva, permiten sugerir que este isotipo de inmunoglobulina juega un papel secundario en la protección a nivel de mucosas, aspecto a tener en cuenta en el diseño de candidatos vacunales.

Los anticuerpos totales, mayormente formados por IgG, confieren inmunidad de por vida. Son útiles para estudios epidemiológicos y de evaluación de vacunas, cuando se usan en paralelo con el estándar de referencia de la OMS. Este ensayo fue particularmente útil para la evaluación de lotes de sueros que pudieran servir para obtener inmunoglobulinas específicas y suero negativo para los ensayos. Por otro lado, permitió conocer que los lotes analizados de gamma globulina humana, usada para el control de focos de brotes epidémicos de HVA, contienen títulos elevados de inmunoglobulinas anti-hepatitis A.

El antígeno en heces es un marcador que prácticamente va desapareciendo una vez que el paciente solicita atención médica, su utilidad diagnóstica es limitada, no obstante, su positividad es señal inequívoca de infección actual y aun más importante de eliminación del agente al medio ambiente, y por tanto, creando fuentes potenciales de contaminación.

La introducción del diagnóstico confirmatorio de la hepatitis A, ha permitido conocer la magnitud de la infección por los virus de las hepatitis en los casos de FHF. Si bien era conocida la importancia de estos, esta es la primera información confirmada del papel de

los mismos, asimismo, ha permitido suponer que otros agentes de transmisión fecal-oral están incidiendo en la ocurrencia de brotes epidémicos en el país.

Nuestra experiencia coincide con los planteamientos de Ochoa y col. en el 2000a, donde señala que la estandarización de un EIE es un `proceso dinámico, en el que las fronteras entre este procedimiento y el de validación no están claramente definidos`.

Estos resultados refuerzan la utilidad de EIE tipo Captura, Sándwich e Inhibición, los cuales, incorporados al Programa Nacional de Hepatitis virales, han contribuido al desarrollo del diagnóstico, la investigación y la vigilancia de la hepatitis A en Cuba, permitiendo además, establecer el diagnóstico en otras zonas del país. Lo anteriormente expresado corrobora la hipótesis planteada.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1. La obtención de adecuados parámetros de validación, avala el uso de los ensayos ELISA tipo Captura, Inhibición y Sándwich o de doble anticuerpo desarrollados, en el diagnóstico, la investigación y la vigilancia de la hepatitis A.
2. Se demostró que las muestras de sangre obtenidas y conservadas en papel de filtro son útiles para la detección de IgM anti-VHA.
3. El VHB seguido del VHA son los responsables etiológicos de los casos de FHF analizados en el laboratorio.
4. La detección de IgM en muestras de orina es útil para el diagnóstico de brotes epidémicos de HVA.
5. La IgA sérica es útil como marcador diagnóstico alternativo de la hepatitis A, mientras que la IgA secretora no parece jugar un papel relevante en los mecanismos de inmunidad humoral contra este virus.
6. El ELISA de Inhibición desarrollado presentó un Límite de Detección de 124 mUI/mL
7. El ELISA tipo Sándwich para la detección del VHA constituye un método útil para la estandarización de la titulación de la infectividad viral.
8. En estudios de brotes de HVA, el anticuerpo IgM en suero es de mayor importancia diagnóstica, que la detección del VHA en muestras de heces.
9. El ELISA de detección de IgM anti-VHA fue la base para la preparación de un juego diagnóstico, el cual mantuvo su funcionalidad y permitió descentralizar el diagnóstico a otras zonas del país
10. Los ensayos desarrollados se han convertido en una herramienta imprescindible en el diagnóstico de las hepatitis virales, estando potencialmente disponibles para su extensión.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

1. Aumentar el número de muestras para determinar la cinética de la IgM en orina.
2. Mejorar el Límite de detección del ELISA de Inhibición para la detección de anti-VHA totales.
3. Desarrollar la técnica de neutralización del VHA en cultivos celulares.
4. Evaluar nuevos métodos de conservación del antígeno a 4 °C, utilizado en el juego diagnóstico.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acker van BAC, Stroomer MKJ, Gosselink MAHE, Koomen GCM, Koopman MG, Arisz L. Urinary protein excretion in normal individuals, diurnal changes, influence on orthostasis and relationship to the renina-angiotensin system. *Contrib Nephrol* 1993;101:143-50.
- Adler R, Shouval D. A finger-stick assay for determination of immunity to hepatitis A: A preliminary report. *J Hepatol* 1993;18(Suppl e):S27-S31.
- Agol VI. The 5 untranslated region of picornaviral genome. *Adv Virus Res* 1991;40:103-80.
- Almasio PL, Amoroso P. HAV infection in chronic liver disease: a rationale for vaccination. *Vaccine* 2003;21(19-20):2238-41.
- Andre FE. Approaches to a vaccine against hepatitis A: development and manufacture of an inactivated vaccine. *J Infect Dis* 1995;171(Suppl 1):S33-S39.
- Angarano G, Trotta F, Monno L, Santantonio T, Pastore G. Serum IgA anti-hepatitis A virus as detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Diagnostic significance in patients with acute and protracted hepatitis A. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1985;3(6):521-3.
- Artica G, Rivera J, Marquez S, Del Carpio F. Fulminant Hepatic Failure in Children. *Rev Gastroenterol Perú* 1998;18(3):250-8.
- Arús E. Clínica y terapia de las hepatitis virales. En: Padrón G, Ed. Bases moleculares para el diagnóstico de las hepatitis virales. La Habana, Elfos Scientiae, 1998; 43-77.
- Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial. Medidas de Concordancia para variables cualitativas, 2003. [citado 13/01/04]. Disponible en URL: <http://www.seh-lelha.org/concor2.html>.
- Averhoff F, Shapiro CN, Bell BP, Hyams I, Burd L, Deladisma A, et al. Control of hepatitis A through routine vaccination of children, *JAMA* 2001;286(23):2968-73.
- Avrameas S, Grulbert B. A method for quantitative labeled antibodies. *Eur J Immunol* 1971b;1:394-6.

- Avrameas S, Grulbert B. Dosage enzymo-immunologique de proteines a l'aide d'immunosorbants et d'antigenes marques aux enzymes. CR Acad Sci. (Paris) 1971a ;273 :2705-7.
- Avrameas S, Ternunck T, Guesdon JL. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. Scand J Immunol 1978;8.
- Balayan MS. Natural hosts of hepatitis A virus. Vaccine 1992;10(Suppl.1):S27-S31.
- Balmaseda A, Guzman MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Tellez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. Clin Diag Lab Immunol 2003;10(2):317-22.
- Balmaseda A, Más P, Delgado G, Ribas M, Rodriguez L. Estudio de brotes de hepatitis A ocurridos en C de la Habana en el año 1991. Rev Cubana Med Trop 1994;46(1):42-5.
- Barin F, Lesage G, Dubois F, Yvonnet B, Coursaget P, Goudeau A. Detection of IgM anti-hepatitis A antibodies by immunoenzyme technic. Interpretation of results and comparison of 2 tests (Havab-M EIA and Hepanostika anti-HAV IgM. Pathol Biol (Paris) 1983;31(10):825-8.
- Bassu A, Gangodkar SV, Joshi MS, Chitambar SD. Electron microscopy of buffalo green monkey kidney cells persistently infected with hepatitis A virus and immunolocalization of HAV antigens. Indian J Pathol Microbiol 2000;43(4):409-15.
- Beales LP, Wood DJ, Minor PD, Saldanha JA. A novel cytopathic microtitre plate assay for hepatitis A virus and anti-hepatitis A neutralizing antibodies. J Virol Methods 1996;59(1-2):147-54.
- Bendre SV, Bavdekar AR, Bhave SA, Pandit AN, Chitambar SD, Arankalle A. Fulminant hepatic failure: etiology, viral markers and outcome. Indian Pediatr 1999;36(11):1107-12.

- Beneduce F, Ciervo A, Kusov Y, Gauss-Muller V, Morace G. Mapping of protein domains of hepatitis A virus 3AB essential for interaction with 3CD and viral RNA. *Virology* 1999;264(2):410-21.
- Beran J, Beutels M, Levie K, Van Damme P, Dieussaert I, Gillet M, et al. A single dose, combined vaccine against typhoid fever and hepatitis A: consistency, immunogenicity and reactogenicity. *J Travel Med* 2000;7(5):246-52.
- Berger R, Just M, Althaus B, Struck MM. Time course of hepatitis A antibody production after active, passive and active/passive immunization: the results are highly dependent on the antibody test system used. *J Virol Methods* 1993;43:287-98.
- Bergmann EM, Cherney MM, McKendrick J, Frommann S, Luo C, Malcolm B A, et al. Crystal structure of an inhibitor complex of the 3C proteinase from hepatitis A virus (HAV) and implications for the polyprotein processing in HAV. *Virology* 1999;265(81):153-63.
- Bishop NE, Anderson DA. Early interactions of hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of pH and calcium ions. *Arch Virol* 1997;142(11):2161-78.
- Bishop NE, Anderson DA. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid proteins in provirions of hepatitis A virus. *Virology* 1993;197:616-23.
- Bishop NE. Effect of low pH on the hepatitis A virus maturation cleavage. *Acta Virol* 1999;43(5):291-6.
- Blumer G. Infectious jaundice in the United States. *JAMA*, 1923; 81:353-358.
- Boggs JD, Melnick JL, Conrad ME, Felsher BF. Viral hepatitis: clinical and tissue culture studies. *JAMA* 1970;214:1041-6.
- Borovec S, Uren E. Single-antibody in situ enzyme immunoassay for infectivity titration of hepatitis A virus. *J Virol Methods* 1997;68(1):81-7.
- Bovier PA, Bock J, Loutan L, Farinelli T, Glueck R, Herzog C. Long-term immunogenicity of an inactivated virosome hepatitis A vaccine. *J Med Virol* 2002;68(4):489-93.

- Bradley DW, Maynard JE, Hindman SH, Hombeck CL, Fields HA, Mc Caustland KA, Serodiagnosis of viral hepatitis A: detection of acute phase immunoglobulin M anti-hepatitis a virus by radioimmunoassay. *J Clin Microbiol* 1977;5:521-30.
- Brown DWG, Ramsay MEB, Richards AF, Miller E. Salivary diagnoses of measles: a study of notified cases in the United Kingdom, 1991-1993. *British Med J* 1994;308:1015-7.
- Bunch DS, Rocke DN, Harrison RO. Statistical design of ELISA protocols. *J Immunol Methods* 1990;132:247-54.
- Butler JE, Hamilton RE. Quantitation of specific antibodies: methods of expression, standards, solid phase considerations and specific considerations. In: Butler JE (ed). *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*. Florida, CRR Press, Inc, 1991:173-201.
- Cao JY, Liang MF, Guo KJ, Meng QL, Shang D, Li DX, et al. Human Fab antibodies derived for phage display library neutralize hepatitis A virus in vitro. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2000;14(4):313-6.
- Casas N, Sunen E. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. *Microbiol Res* 2002;157(3):169-75.
- Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis Surveillance. Report Number 57, September 2000. 1-31.
- Chan DW, Ed. *Immunoassay automatitation: an update guide to system*. San Diego. Academic Press, 1996:309.
- Ching KZ, Nakano T, Chapman LE, Demby A, Robertson BH Genetic characterization of wild-type genotype VII hepatitis A virus. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 1):53-60.
- Chironna M, Grottola A, Lanave C, Villa E, Barbuti S, Quarto M. Genetic analysis of HAV strains recovered from patients with acute hepatitis from Southern Italy. *J Med Virol* 2003;70(3):343-9.
- Chitambar SD, Arankalle VA, Banerjee K. Detection of IgM against hepatitis A virus using tissue culture derived antigen. *Indian J Med Res* 1991;93:19-21.

- Chitambar SD, Chadha MS. Use of filter paper disks for hepatitis A surveillance. *Indian J Gastroenterol* 2000;19(4):165-7.
- Chitambar SD, Murthy-Grewal S, Bokil M, Arankalle VA, Gore MM, Banerjee K. Indigenous anti-hepatitis A virus IgM capture ELISA for the diagnosis of hepatitis A. *Indian J Med Res* 1994;99:243-51.
- Cianciara J. Hepatitis A shifting epidemiology in Poland and Eastern Europe. *Vaccine* 2000;18(Suppl 1):S68-S70.
- Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q J Med* 1912;6:1-28.
- Coelho C, Heinert AP, Simoes CM, Barardi CR. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2003;66(3):507-11.
- Cohen JI, Feinstone M, Purcell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee; duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 1989;160:887-90.
- Cohen JI, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. *J Virol* 1987;61:50-9.
- Cooksley WG. What did we learn from the Shanghai hepatitis A epidemic?. *J Viral Hepat* 2000;7(Suppl 1):S1-S3.
- Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Pérez-Bercoff R, Casane D, Colina R, et al. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol* 2002a;76(18):9516-25.
- Costa-Mattioli M, Ferre V, Casane D, Pérez-Bercoff R, Coste-Burel M, Imbert-Marcille BM, et al. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology* 2003;311(1):51-9.
- Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, Billaudel S, Ferre V. Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR. *J Viral Hepat* 2002b;9(2):101-6.

- Cotter SM, Sansom S, Long T, Koch E, Kellerman S, Smith F, et al. Outbreak of hepatitis A among men who have sex with men: implications for hepatitis A vaccination strategies. *J Infect Dis* 2003;187(8):1235-40.
- Coulepis A, Veale M, MacGregor A, Kornitschuk M, Gust ID. Detection of hepatitis A virus and antibody by solid phase radioimmunoassay with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1985;22(1):119-124.
- Coulepis AG, Locarnini SA, Lehmann NI, Gust ID. Detection of hepatitis A virus in the feces of patients with naturally acquired infections. *J Infect Dis* 1980;141:151-156.
- Coursaget P, Maupas P, Hibon P, Lesage G, Hubert M. Hepatitis A diagnosis in man: Radioimmunoassay for Hepatitis A antigen detection in Faeces. *J Med Virol* 1980;6:53-60.
- Crowther JR. ELISA: Theory and Practice. New Jersey: Humana Press; 1995. *Methods in Molecular Biology* 42.
- Cuba. Ministerio de Salud Pública. Departamento de Estadística Nacional, MINSAP, 2002.
- D'Hondt E. Possible approaches to develop vaccines against hepatitis A. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1):S49-S52.
- Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun* 1981;32:388-393.
- De Almeida LM, Azevedo RS, Guimaraes AA, Coutinho Eda S, Struchiner CJ, Massad E. Detection of antibodies against hepatitis A virus in eluates of blood spotted on filter-paper: a pilot study in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93(4):401-4.
- De Chastonay J, Siegl G. Effect of three known antiviral substances on hepatitis A virus replication. In: Zuckerman AJ, ed, *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R Liss, 1988;956-60.

- De Paula VS, Baptista ML, Lampe E, Niel C, Gaspar AM. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 2002;66(1):22-7.
- De Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenez LL, Niel C, Gaspar AM. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J Clin Virol* 2004;29(4):254-9.
- De Savigni D, Voller A. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *J Immunoassay* 1980;1:105.
- Delahanty A, Valdivia I, Trujillo J, Hernández M, Gómez I, Ventura J et al. Respuesta de anticuerpos IgM contra epítomos inmunogénicos del virus de la hepatitis A. *Rev Biomédica* 2004;15(1):11-6.
- Delem AD. Comparison of modified HAVAB and ELISA for determination of vaccine-induced anti-HAV response. *Biologicals* 1992;20:289-291.
- Demicheli V, Tiberti D. The effectiveness and safety of hepatitis A vaccine: a systematic review. *Vaccine* 2003;21(19-20):2242-5.
- Díaz B, Sariol C, Martínez R, Rodríguez L. Genomic classification and genetic relationship of a new variant of HAV isolated in Cuba. *Rev Memorias do Oswaldo Cruz* 1999;94(3):361-3.
- Díaz BI, Sariol CA, Normann A, Rodríguez L, Flehmig B. Genetic relatedness of Cuban HAV wild-type isolates. *J Med Virol* 2001;64:96-103.
- Díaz, B., Sariol, C., Rodríguez, L, Más, P. Purificación y caracterización parcial de una cepa cubana de Hepatitis A. *Rev Cubana de Med. Trop* 1996;8(2):123-129.
- Dienstag JI, Kapikian AZ, Feinstone SM, Purcell RH, Boggs JD, Conrad ME. Fecal shedding of hepatitis A antigen. *Lancet* I 1975;765-7.
- Diwan AH, Stubbs JR, Carnahan GE. Transmission of hepatitis A via WBC-reduced RBCs and FFP from a single donation. *Transfusion* 2003;43(4):536-40.
- Donets MA, Nelga IV, Grishina GK, Kusov I, Balaian MS. Trial of a Soviet diagnostic kit for determining class M immunoglobulins to the hepatitis A virus by

immunoenzyme analysis (an anti-HAV IgM test system). *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1988;(1):61-5.

- Dotzauer A, Feinstone SM, Kaplan G. Susceptibility of non primate cell lines to hepatitis A virus infection. *J Virol* 1994;68(9):6064-8.
- Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Gottke U, Kracke A, Mages J, et al. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol* 2000;74(23):950-7.
- Dubois E, Agier C, Traore O, Hennechart C, Merle G, Cruciere C, et al. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J Food Prot* 2002;65(12):1962-9.
- Duermeyer W. Application of ELISA for the diagnosis and epidemiology of hepatitis A. [Tesis doctoral]. Amsterdam. Utrecht University. School of Medicine 1980:41-151.
- Duke University Medical Center Library. Evidence Based Medicine (EBM). Appraising Evidence. Diagnosis. Likelihood Ratios. [citado 12/01/04]. Disponible en: URL : <http://www.mcilibrary.duke.edu/respub/guides/ebm/ratios.html>.
- Durand F: Clinical forms of hepatitis A. *Rev Med Inter* 2000;21(1):50-7.
- Elsana S, Sikuler E, Yaaril A, Avnil YS, Abu-Shakra M. HCV antibodies in saliva and urine. *J Med Virol* 1998;55:24-27.
- Emerson SU, Huang YK, Mc Rill C, Lewis M, Shapiro M, London WT, et al. Molecular basis of virulence and growth of hepatitis A virus in cell culture. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1): S36-S39.
- Emerson SU, Huang YK, Nguyen H, Brockington A, Govindarajan S, St Claire M, et al. Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. *J Virol* 2002;76(17):8551-9.
- Engvall E, Perlman P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8:71-4.

- Fabri M, Klasnja B, Mudric V, Preveden T. Interferon alpha in the treatment of prolonged hepatitis A virus infection. *Med Pregl* 1997;50(9-10):384-6.
- Fagan EA, Harrison TA. *Viral hepatitis*. Springer-Verlag New York Inc. BIOS Scientific Publishers Limited. 2000.
- Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: Regulation of front-line body defenses. *Nature Reviews Immunol* 2003;3:63-62.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 1973;182:1026-1028.
- Fiore A: Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Dis* 2004;38:705-15.
- Flehmig B. Hepatitis A virus in cell culture. I. Propagation of different hepatitis A virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (FRhK-4). *Med Microbiol Immunol* 1980;168:239-248.
- Flehmig B. Hepatitis A virus particles in stools of patients from a natural outbreak in Germany. *Med Microbiol Immunol* 1977;163:209-214.
- Flehmig B. Hepatitis A. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 1990;4(3):707-720.
- Fossecoco SL, Curtis NA. Exploring Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) Data with the SAS® Analyst Application. [citado 09/09/03] Disponible en: URL: <http://www.ats.ucla.edu/sta/sas/library/analystelisa.pdf>.
- Franco E, Giambi C, Ialacci R, Coppola RC, Zanetti AR. Risk groups for hepatitis A virus infection. *Vaccine* 2003 2;21(19-20):2224-33.
- Fujiwara K, Mochida S. Indications and criteria for liver transplantation for fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 13):S74-S77.
- Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H. PCR-SSCP analysis of 5'-nontranslated region of hepatitis A viral RNA: comparison with clinicopathological features of hepatitis A. *Dig Dis Sci* 2000;45(12):2422-7.
- Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, et al. Analysis of the genotype-determining region of hepatitis A viral RNA in relation to disease severities. *Hepatol Res* 2003;25(2):124-134.

- Garrido M, Blanco A, Garrote JA, Telleria JJ, Arranz E. Value of salivary antibodies to assess seropositivity against measles, rubella and mumps in children and adults. *Ann Esp Pediatr* 1997;47(5):499-504.
- Gil A, González A, Dal-Re R, Domínguez V, Astasio P, Aguilar L. Detection of antibodies against hepatitis A in blood spots dried on filter paper. Is this a reliable method for epidemiological studies? *Epidemiol Infect* 1997;118(2):189-91.
- Gil A, González A, Dal-Re R, Domínguez V, Ortega P, Barrio JL, et al. Prevalence of hepatitis A in an institution for the mentally retarded in an intermediate endemicity area: influence of age length of institutionalization. *J Infect* 1999;38(2):120-3.
- Glikson M, Galum E, Oren R, Tur-Kaspa Rm, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine* 1992;71:14-23.
- Gomara MJ, Ercilla G, Alsina MA, Haro I. Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology. *J Immunol Methods* 2000a;246(1-2):13-24.
- Gomara MJ, Riedermann S, Vega I, Ibarra H, Ercilla G, Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods* 2000b;234(1-2):23-34.
- Gorbunov MA, Pavlova LI, Rozhkov SD, Kukharev AI, Novikov VI, Karpovich LG, et al. Hep-A-in-Vac, a Russian cultured concentrated inactivated vaccine against hepatitis A. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1998 (1):50-4.
- Goswami BB, Burkhardt W 3rd, Cebula TA. Identification of genetic variants of hepatitis A virus. *J Virol Methods* 1997;65(1):95-103.
- Graff J, Normann A, Feinstone SM, Flehmig B. Nucleotide sequence of wild-type Hepatitis A virus GBM in comparison with two cell cultures-adapted variants. *J Virol* 1994;68:548-554.
- Gust ID, Coulepis AG, Feinstone SM, Locarnini SA, Moritsugu Y, Najera R, et al. Taxonomic classification of hepatitis A. *Intervirology* 1983;20:1-7.

- Gutiérrez J, Rodríguez MJ, De Ory F, Piedrola G, Maroto MC. Reliability of low-avidity IgG and of IgA in the diagnosis of primary infection by rubella virus. *J Clin Lab Anal* 1999;13(1):1-4.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*. Nueva York. Interamericana Mc Graw – Hill, 1996:343-360.
- Haro I, Perez S, Garcia M, Chan WC, Ercilla G. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic lipophilic multiple antigenic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. *FEBS Lett* 2003;540(1-3):133-40.
- Haro I, Pinto RM, González-Dankaart JF, Pérez JA, Reig F, Bosch A. Anti-hepatitis A virus antibody response elicited in mice by different forms of a synthetic VP1 peptide. *Microbiol Immunol* 1995;39(7):485-90.
- Herremans T, Kimman TG, Conyn-Van Spaendonck MA, Buisman A, de Melker H, Abbink F, et al. Immunoglobulin A as a serological marker for the (silent) circulation of poliovirus in an inactivated poliovirus-vaccinated population. *Clin Infect Dis* 2002;34(8):1067-75.
- Hess G, Faatz E, Melchior W, Bayer H. Analysis immunoassays to detect antibodies to hepatitis a virus (anti-HAV) and anti-HAV immunoglobulin M. *J Virol Methods* 1995;51:221-8.
- Hollinger FB, Bradley DW, Maynard JE, Dreesman JR, Melnick JL. Detection of hepatitis A viral antigen by radioimmunoassay. *J Immunol* 1975;115:1464-6.
- Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In: Knipe DM y Howley PM eds. *Fields Virology*. Fourth edition. Vol. 1. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:799-840.
- Hou Z, Yan J, Long R. In situ enzyme immunoassay for detection of hepatitis A virus. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 1999;13(4):362-4.
- Hu NZ, Hu YZ, Shi HJ, Liu GD, Qu S. Mutational characteristics in consecutive passage of rapidly replicating variants of hepatitis A virus strain H2 during cell culture adaptation. *World J Gastroenterol* 2002;8(5):872-8.

- Iijima H, Takahashi I, Kimono H: Mucosal immune network on the gut for the control of infectious diseases. *Rev Med Virol* 2001;11:117-33.
- Jacobson SK, Buttery R, Parry JV, Perry KR, Wreghitt TG. Investigation of a hepatitis A outbreak in a primary school by sequential salivary sampling. *Clin Diag Virol* 1995;3:173-180.
- Jaeck D, Boudjema K, Audet M, Chenard-Neu MP, Simeoni U, Meyer C, et al. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT) in the treatment of acute liver failure. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 13):S88-S91.
- Jansen WR, Siegl G, Lemon SM. Molecular epidemiology of human hepatitis A defined by an antigen-capture/polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2867-71.
- Jean J, Blais B, Darveau A, Fliss I. Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system. *J Virol Methods* 2002;105(1):123-32.
- Jean J, Vachon JF, Moroni O, Darveau A, Kukavica-Ibrulj I, Fliss I. Effectiveness of commercial disinfectants for inactivating hepatitis A virus on agri-food surfaces. *J Food Prot* 2003;66(1):115-9.
- Johnson KL y Sarnow P. Viral RNA sintesis. En: Rotbart HA Eds. *Human Enterovirus infection*. Washington DC: ASM Press, 1995:95-112.
- Joines RW, Blatter M, Abraham B, Xie F, De Clerq N, Baine Y, et al. A prospective, randomized, comparative US trial of a combination hepatitis A and B vaccine (Twinrix) with corresponding monovalent vaccines (Havrix and Engerix B) in adults. *Vaccine* 2001;19:4710-9.
- Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, Chadha MS. Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis A. *Clin Diag Lab Immunol* 2002;9(4):840-845.
- Just M, Berger R. Reactogenicity and immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1):S110-S113.

- Kabrane-Lazizi Y, Emerson SU, Herzog C, Purcell RH. Detection of antibodies to HAV 3C proteinase in experimentally infected chimpanzees and in naturally infected children. *Vaccine* 2001;19:2878-83.
- Kalashnikova TV, Karpovich LG, Nikitiuk NM, Gorbunov MA, Evreinova EE, Nelga IV, et al. A comparative study of the sensitivity and specific activity of an immunoenzyme test system for determining class-M antibodies to the hepatitis A virus. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1991;(5):36-8.
- Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J* 1996;15:4282-96.
- Karayiannis P, McGarvey MJ, Fry MA, Thomas HC. Detection of hepatitis A RNA in tissues and feces of experimentally infected tamarins by cDNA-RNA hybridization. In: Zuckerman AJ, ed. *Viral hepatitis and liver disease*. New York: Alan R Liss, 1988;117-20.
- Karpinski KF, Hayward S, Thyphonas H. Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulins levels using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods* 1987;103:189-94.
- Karpinski KF. Optimality assessment in the enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Biometrics* 1990;46(2):381-90.
- Kato S, Tachikawa T, Ozawa K, Konno M, Okuda M, Fuisawa T, et al. Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* 2001;107(6):87-92
- Kenneth L, Herrman MD, Dean D. Diagnosis by serologic assays. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 7th ed. Washington DC: American Public Health Association 1995:124-5.
- Ketzinel-Gilad M. Development of edible vaccine against hepatitis A virus in transgenic tomato plants. [citado 26/06/03]. Disponible en URL: http://www.hadassah.org.il/departments/gen_ther/sca_tomato.htm.

- Klinger MH, Kammerer R, Hornei B, Gauss-Muller V. Perinuclear accumulation of hepatitis A virus proteins, RNA, and particles and ultrastructural alterations in infected cells. *Arch Virol* 2001;146(12):2291-307.
- Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998;351(9116):1643-9
- Koopmans M, Sánchez MD, Patton J, Stewart J. Evaluation of antigen and antibody detection in urine specimens from children with congenital human cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 1995;46(4):321-8.
- Koraka P, Suhatri C, Setiati TE, Mairuhu AT, Van Gorp E, Hack CE, et al. Kinetics of Dengue virus-specific serum immunoglobulin classes and subclasses correlate with clinical outcome of infection. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4332-8.
- Krah DL, Amin RD, Nalin DR, Provost PJ. A simple antigen-reduction assay for the measurement of neutralizing antibodies to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1991;163(3):634-7.
- Krah DL. A simplified multiwell plate assay for the measurement of hepatitis A virus infectivity. *Biologicals* 1991;19(3):223-7.
- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200:365-73.
- Kukavica-Ibrulj I, Darveau A, Fliss I. Immunofluorescent detection and quantitation of hepatitis A virus in sewage treatment effluent and on agri-food surfaces using scanning confocal microscopy. *J Virol Methods* 2003;108(1):9-17.
- Kusov I, Fleer GP, Zavodova TI, Panina LI, Donets MA. Accumulation of the infectious virus and the viral antigen during the multiplication of the hepatitis A virus in an embryonic kidney cell culture of the rhesus macaque (FRhK-4). *Vopr Virusol* 1987;32(3):307-12.
- Kwon OS, Byun KS, Yeon JE, Park SH, Kim JS, Kim JH, et al. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(9):1043-7.

- La Brecque FD, La Brecque DR, Klinzman D, Perlman S, Cederna JB, Winokur PL, et al. Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. *J Clin Microbiol* 1998;36(7):2014-8.
- Lacaille F. Differential diagnosis of elevated transaminases. *Arch Pediatr* 2001;8(5):535-8.
- Lamarca C, Coimbra AM, Fumiko C. Two competitive immunoassays for the detection of IgG class antibodies to hepatitis A antigen. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1991;24(2):79-85.
- Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Med Assoc* 2002;68(3):170-4.
- Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial agents associated with water borne diseases. *Crit Rev Microbiol* 2002;28(4):371-409.
- Leentvaar-Kuijpers A, Coutinho RA, Brulein V, Safary A. Simultaneous passive and active immunization against hepatitis A. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1):S138-S141.
- Leggitt PR, Jaykus LA. Detection methods for human enteric viruses in representative foods. *J Food Prot* 2000;63(12):1738-44.
- Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1983;148:1033-9.
- Lemon SM, Chao SF, Jansen RW, Binn LN, LeDuc JW. Genomic heterogeneity among human and non-human strains of hepatitis A virus. *J Virol* 1987;61:735-42.
- Lemon SM, Jansen RW, Brown EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine* 1992;10(Suppl.1):S40-S44.
- Lemon SM, Murphy PC, Provost PJ, Chalikonda I, Davide JP, Shofield TL, et al. Immunoprecipitation and virus neutralization assays demonstrate qualitative differences between protective antibody responses to inactivate hepatitis A vaccine and passive immunization with immune globulin. *J Infect Dis* 1997;176(1):9-19.

- Lemon SM, Murphy PC, Shield PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, et al. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol* 1991;65:2056-65.
- Lemon SM, Robertson BH. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Semin Virol* 1993;4:285-95.
- Lemon SM. Hepatitis A virus: Current concepts of the molecular virology, immunobiology, and approaches to vaccine development. *Rev Med Virol* 1992;2:73-87.
- Lemon SM. Immunologic approaches to assessing the response to inactivated hepatitis A vaccine. *J Hepatol* 1993;18(Suppl.2):S15-19.
- Lemon SM. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* 1997;8(B):1494-9.
- Lemos G, Jameel S, Panda S, Rivera L, Rodríguez L, Gavilondo JV. Hepatitis E virus in Cuba. *J Clin Virol* 2000;16:71-5.
- Li JW, Xin ZT, Wang XW, Zheng JL, Chao FH. Mechanisms of inactivation of hepatitis a virus by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(10):4951-5.
- Liu J, Su Y, Dai C, Guo R. Expressing poliovirus (type I) and hepatitis A virus antigens by recombinant vaccinia virus. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 1996;18(3):209-13.
- Locarnini SA, Coulepis AB, Stratton AM. Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A specific immunoglobulin M. *J Clin Microbiol* 1979;9(4):459-64.
- López SI, Seia J, Roy A, Cuarterolo M, Canero V, Maria C, et al. Anti-actin antibodies in acute viral hepatitis A in children. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1998;28(3):261-4.
- Mac Callum FO, Bradley WH, van Rooyen CE, Sheehan HL. Infective hepatitis and allied conditions. In: Cope Z, ed. *History of the Second War World: medicine and pathology*. vol. 2 London: HMSO, 1952:257-67.

- Mac Callum FO. Homologous serum jaundice. *Lancet* 1947;2:691-2.
- Madar R, Straka S, Baska T. Detection of antibodies in saliva-an effective auxiliary method in surveillance of infectious diseases. *Bratisl Lek Listy* 2002,103(1):38-41.
- Malvano R, Boniolo A, Masseyeff RF. Problems in standardization of enzyme-immunoassays for antibodies. In: Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. 3th ed. Vol X. VCH, Germany, 1986:2-11.
- Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. The Italian Collaborative Group. *Ann Int Med* 1994;20:1-7.
- Margolis HS, Nainan OV. Identification of virus components in circulating immune complexes isolated during hepatitis A virus infection. *Hepatology* 1990,11(1):31-7.
- Más P, Balmaseda A, Delgado G, Castillo A, Comellas M, Palomera R. Aislamiento del virus de la hepatitis A. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43(3):206-7.
- Mast EE, Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis. *Seminars in Virology* 1993;4:273-83.
- Mbayed VA, Sookoian S, Alfonso V, Campos RH. Genetic characterization of hepatitis A virus isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Med Virol* 2002;68(2):168-74.
- Mc Donald S. Acute yellow atrophy. *Edinburgh Med J* 1908;15:208.
- Meurman O. Detection of antiviral IgM antibodies and its problems: a review. En: Bachman PA, ed. *Current topics in Microbiology and Immunology*. New developments in diagnostic virology. Berlin Heidelberg. New York: Springer-Verlag, 1983;101-31.
- Migne J-P. *Patrologiae cursus completus*. Ser Latina Prior Parisina 1863; 89 :950-4.
- Miller WJ, Provost PJ, McAleer WJ, Ittensohn OL, Villarejos VM, Hilleman MR. Specific immune adherence for human hepatitis A antibody, applications to

diagnostic and epidemiologic investigations. *Pro Soc Exp Biol Med* 1975;149:254-61.

- Min KM, Kim PH. Macrophage derived TGF-beta 1 induces IgA isotype expression. *Mol Cells* 2003;16(12):245-50.
- Minochkin PI, Tepolova SN, Rusanova NN, Fintse AB, Maslennikova NV, Kudriashova NM. Immunoenzyme analysis and polymerase chain reaction in the diagnosis of an intrauterine infection in newborn infants with cerebral lesions. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1999;Nov-Dec (6):74-6.
- Mitchell LA, Galun E. Rectal immunization of mice with hepatitis A vaccine induces stronger systemic and local immune responses than parenteral immunization. *Vaccine* 2003;21(13-14):1527-38.
- Moller AM, Mathiesen LR. Detection of immunoglobulin M antibodies to hepatitis A virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1979;10:628-32.
- Morace G, Aulicino FA, Angelozzi C, Constanzo L, Donadio F, Rapicetta M. Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Applied Microbiol* 2002;92:828-36.
- Moreira-Silva SF, Frauches DO, Almeida AL, Mendonca HF, Pereira FE. Acute liver failure in children: observations in Vitoria, Espirito Santo State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(5):483-6.
- Muir P, Singh NB, Banatvala JE. Enterovirus specific serum IgA antibody responses in patients with acute infections, chronic cardiac disease and recently diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *J Med Virol* 1990;32(2):236-42.
- Murray R. Viral hepatitis. *Bull NY Acad Med* 1955 ;31:341-58.
- Nadala ECB, Jr, Loh PC. A nitrocellulose-enzyme immunoassay method for the detection of hepatitis A virus. *J Virol Methods* 1990b;28:155-64.
- Nadala ECB, Jr, Loh PC. Immunofluorescence and immunoperoxidase assays for the titration of infectious hepatitis A virus (HAV). *J Virol Methods* 1990a;28:117-24.

- Nakane PK, Kawoi A. Peroxidase-labeled antibodies. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 1974;22:1084.
- Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol* 2004;72(1):10-6.
- Oba IT, Spina AM, Saraceni CP, Lemos MF, Senhoras R, Moreira RC, et al. Detection of hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000;42(4):197-200.
- Ochnio JJ, Scheifele DW, Ho M, Mitchell LA. New, ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J Clin Microbiol.* 1997;35(1):98-101.
- Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, et al. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad en vacunas. *Vaccimonitor* 2000a;9(1):17-20.
- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *Vaccimonitor*.2000b;9(3):13-8
- O'Farrell BJ, Rajan E, Albloushi SS, Courtney MG, Fielding J, Shattock AG. The reliability of saliva as a sample for the detection of hepatitis A immunoglobulins under various sampling conditions. *Clin Diagn Virol* 1997;7(3):153-7.
- O'Grady JG. Fulminant hepatitis in patients with chronic liver disease. *J Viral Hepat* 2000;7(Suppl 1):S9-S10.
- Otero W, Pineda LF, Beltrán LH. Utilidad de la razón de verosimilitud (Likelihood Ratio) en la práctica clínica. *Rev Colomb Gastroenterol* 2001;16:33-6.
- Pak SG, Volchkova EV, Umbetova KT. Clinico-pathogenetic features of viral hepatitis A course. *Ter Arkh* 1999;71(11):8-10.
- Parry JV. Simple and reliable salivary tests for HIV and hepatitis B virus diagnose and surveillance. *Nn NY Acad Sci* 1993;694:216-33.

- Peetermans J. Production, quality control and characterization of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1):S99-S101.
- Pellegrini V, Fineshi N, Matteucci G, Marsili I, Nencioni L, Puddu M, et al. Preparation and immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1993;11(3):383-7.
- Perry KR, Parry JV, Vandervelde ME, Mortimer PP. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis a and hepatitis B core antigen. *J Med Virol* 1992;38:265-20.
- Peterman JH. Immunochemical considerations in the analysis of data from non-competitive solid-phase immunoassays. In: Butler JE (ed). *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*. Florida. CRR Press Inc, 1991:173-201.
- Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of scape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol* 1992;66:2208-16.
- Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Sharma AK, Singh K. Natural history and risk factors in fulminant hepatic failure. *Arch Dis Child* 2002;87(1):54-6.
- Poirier B, Morgeaux S, Variot P, Fushs F. In vitro potency assay for hepatitis A virus vaccine: development of a unique economical test. *Biologicals* 2000;2884:247-56.
- Polish LB, Robertson BH, Khanna B, Krawczynski K, Spelbring J, Olson F, et al. Excretion of hepatitis A virus (HAV) in adults: Comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in Tamarins. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3615-7.
- Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* 1992;150:5-21.
- Porstmann T, Porstmann B, Schmechta H, Nugel E, Seifert R, Grunow R. Effect of IgG-horseradish peroxidase conjugates purified on Con A-Sepharose upon sensitivity of enzyme immunoassay. *Acta Biol Med Germ* 1981;40:849.
- Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979;160:213-21.

- Provost PJ, Wolanski BS, Miller WJ, Ittensohn OL, McAleer WJ, Hilleman MR. A specific complement-fixation test for human hepatitis A employing CR 326 virus antigen: diagnosis and epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;148:962-9.
- Purcell RH, Emerson SU: Animal models of hepatitis A and E. *Ilar J* 2001;42(2):161-77.
- Purcell RH, Feinstone SM, Ticehurst JR, Daemer RJ, Baroudy DM. Hepatitis A virus. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis and liver disease*. Orlando, Florida: Grune & Stratton, 1984;9-22.
- Purcell RH, Wong DC, Moritsugo Y, Dienstag JL, Routenberg JA, Boogs JD. A solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J Immunol* 1976;116:349-56.
- Racaniello UR. Picornaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe DM y Howley PM eds. *Fields Virology* Fourth edition. Vol 1, New York. Lippincott Williams & Wilkins, 2001:685-722.
- Rachow A, Gauss-Muller V, Probst C. Homogenous Hepatitis A Virus Particles: Proteolytic release of the assembly signal 2a from procapsids by factor Xa. *J Biol Chem* 2003;278(32):44-51.
- Racin-Poon A, Welhs C, Smith AFM. Estimation of relative Potencia with sequential dilutions errors in radioimmunoassay. *Biometrics* 1991;47:1235-46.
- Razumov IA, Tumanov IuV, Kazachinskaia EI, Tiunnikov GI, Loktev VB. Monoclonal antibodies in human hepatitis A virus immunoenzyme diagnosis *Vestn Ross Akad Med Nauk* 1998;(3):9-13.
- Reed LI, Muench H. A single method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
- Renge RL, Dani VS, Chitambar SD, Arankalle VA. Vertical transmission of hepatitis A. *Indian J Pediatr* 2002;69(6):535-6.
- Richards GP, Watson MA. Immunochemiluminescent focus assays for the quantitation of hepatitis A virus and rotavirus in cell cultures. *J Virol Methods* 2001;94(1-2):69-80.

- Riedemann S, Reinhardt G, Frosner GG. Placebo-controlled efficacy study of hepatitis A vaccine in Valdivia, Chile. *Vaccine* 1992;10(Suppl. 1):S152-S155.
- Robbins DJ, Krater J, Kiang W, Alcade X, Helgesen S, Carlos J. Detection of total antibodies against hepatitis A virus by an automated microparticle enzyme immunoassay. *J Virol Methods* 1991;32:255-63.
- Robertson BH, Averhoff F, Cromeans TL, Han X, Khoprasert B, Nainan OV, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. *J Med Virol* 2000;62(2):144-50.
- Robertson BH, Bradley DW. Enterically transmitted hepatitis. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET editors. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7th Edition. Cap 21 Washington DC. American Public Health Association, 1995, p 361-73.
- Robertson BH, Jansen WR, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. *J Gen Virol* 1992;10(Suppl 1):S40-S44.
- Robertson BH, Jia XY, Tian H, Margolis HS, Summers DF, Ehrenfeld E. Antibody response to nonstructural proteins of hepatitis A following infection. *J Med Virol* 1993;40:76-82.
- Ruchti F, Siegl G, Weitz M. Identification and characterization of incomplete hepatitis A virus particles. *J Gen Virol* 1991;72:2159-66.
- Sánchez G, Caballero S, Guix S, Bosch A, Pinto RM: Antigenic hepatitis A virus structures may be produced in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(3):1840-3.
- Sánchez G, Pinto RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4148-55.
- Sarid O, Anson O, Yaari A, Margalith M. Human cytomegalovirus salivary antibodies as related to stress. *Clin Lab* 2002;48(5-6):297-305.

- Scheuer PJ, Davies SE, Dhillon AP: Histopathological aspects of viral hepatitis. *J Viral Hepat* 1996;3(6):277-83.
- Schiodt FV, Atillasay E, Shakil AO, Schiff ER, Caldwell C, Kowdley KU et al. Etiology and outcome for 295 patients with acute liver failure in the United States. *Liver Transp Surg* 1999;5:29-34.
- Schofield DJ, Satterfield W, Emerson SU, Purcell RH. Four chimpanzee monoclonal antibodies isolated by phage display neutralize hepatitis a virus. *Virology* 2002; 5;292(1):127-36.
- Scholz E, Heinrich U, Flehmig B. Acid stability of hepatitis A virus. *J Gen Virol* 1989;70:2481-5.
- Seelig R, Renz M, Seelig HP. PCR in the diagnosis of viral hepatitis. *Annl of Medicine* 1992; 24:225-30.
- Serret A, Rosales I. Validación de métodos analíticos. Segundo Taller Nacional de Validación. Ciudad de la Habana. Grupo Nacional de Validación, 1997.
- Siegl G, Lemon SM. Recent advances in hepatitis A vaccine development. *Virus Res* 1990, 17:75-92.
- Siegl G, Weitz M. Pathogenesis of hepatitis A: persistent viral infection as basic of an acute disease?. *Microb Pathog* 1993;14:1-8.
- Silveira Carneiro J, Bucci M, Pierangeli A, Equestre M, Pagnotti P, Perez Bercoff R. Increased infectivity of hepatitis A virus cDNA clones with engineered 5'-terminal extra-cistronic sequences. *New Microbiol* 1998;21(4):321-7.
- Sjogren MH. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology Clinics of North America* 1994;3(3):457-77.
- Stapleton JT, Frederick J, Meyer B. Hepatitis A virus attachment to cultured cell lines. *J Infect Dis* 1991a;164:1098-1103.
- Stapleton JT, Lange DK, LeDuc JW, Binn LN, Jansen RW, Lemon SM. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 1991b;163:7-11.

- Stapleton JT, LeDuc JW, Binn LN, Lemon SM. Lack of neutralizing activity in fecal extracts following experimental hepatitis A virus (HAV) infection in man and owl monkeys. *J Med Virol* 1987;21:17.
- Stapleton JT, Raine V, Winokur PL. Antigenic and immunogenic properties of recombinant hepatitis A virus 14S and 17S subviral particles. *J Virol* 1993;67:1080-5.
- Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1995;171(Suppl.1):S9-S14.
- Steinitz M. Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. *Analytical Biochemistry* 2000; 282:232-8.
- Summers PL, Dubois DR, Cohen WH, Macarthy PO, Binn LN, Sjogren MH, et al. Solid-phase antibody capture hemadsorption assay for detection of hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol* 1993;31(5):1299-302.
- Takahashi S, Mashikawa F, Noda A, Oda T, Tashikawa T. Detection of immunoglobulin G and antibodies to rubella virus in urine and antibodies responses to vaccine-induced infection. *Clin Diag Lab Immunol* 1998;5:24-7.
- Tallo T, Norder H, Tefanova V, Ott K, Ustina V, Prukk T, et al. Sequential changes in hepatitis A virus genotype distribution in Estonia during 1994 to 2001. *J Med Virol* 2003;70(2):187-93.
- Tencer J, Frick IM, Oquist BM, Alm P, Rippe B. Size selectivity of the glomerular barrier to high molecular weight proteins: upper size limitations of shunt pathways. *Kidney Int* 1998;53(3):709-15.
- Ternovoi VA, Bondarenko TIu, Bondarchuk VB, Maidaniuk AG, Netesov SV. Expression of hepatitis A virus recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2001 Mar-Apr(2):76-80.
- Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Chatchatee P, Chongsrisawat V, Mokmula M, Poovorawan Y. Molecular characterization of hepatitis-A-virus infections, in the context of two outbreaks in southern Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96(7):727-34.

- Ticehurst J. Hepatitis E virus. In: Murray PR, Baron EJ, Phaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology 1995;1056-67.
- Tijssen P. Outline of the strategies for enzyme immunoassays. En: Burdon RH, Van Knippenberg PH editors. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*. London, Elsevier, 1999:9-20.
- Tilzey IJ, Palmer SJ, Barrow S, Perry KR, Tyrrell H, Safary A et al. Clinical trial with inactivated hepatitis A vaccine and recommendations of its use. *BMJ* 1992;304(6837):1272-6.
- Tokushige K, Hasegawa K, Yamauchi K, Hayashi N. Analysis of natural killer cells and interleukin-15 in patients with acute and fulminant hepatitis *Hepatol Res* 2002;23(1):31-7.
- Totsuka A, Moritsugu Y. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology* 1999;42(2-3):63-8.
- Troisi CL, Hollinger FB, Krause DS, Pickering LK. Immunization of seronegative infants with hepatitis A vaccine (HAVRIX; SKB): A comparative study of two dosing schedules. *Vaccine* 1997;15:1613-7.
- Trotta F, Angarano G, Santantonio T, Pastore G. Immunoenzyme determination of IgA specific anti-HAV in the serological diagnosis of hepatitis A] *Boll Soc Ital Biol Sper* 1984;60(5):961-6.
- Tsarev SA, Emerson SU, Balayan MS, Ticehurst J, Purcell RH. Simian hepatitis A virus strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with others HAV strains. *J Gen Virol* 1991;72:1677-83.
- Urnovitz HB, Murphy WH, Gottfried TD, Friedman-Kien AF. Urine-based diagnosis technology. *Trends Biotechnol* 1996;14(10):361-4.
- Vallbracht A, Fleischer B, Busch FW. Hepatitis A: hepatotropism and influence on myelopoiesis. *Intervirology* 1993;35(1-4):133-9.

- Van Cuyck-Gandré, Livanche T, Ringeaud J, Crance JM. Development of a RNA/RNA hybridization assay for the HAV CF53 strain. *Res Virol* 1994; 145:37-43.
- Van Herck K, Van Damme P. Inactivated hepatitis A vaccine-induced antibodies: follow-up and estimates of long-term persistence. *J Med Virol* 2001;63(1):1-7.
- Vázquez S, Saenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán MG. Detección de IgM contra el virus dengue en sangre total absorbida en papel de filtro. *Rev Pan Salud Pública* 1998;3 (3):174-8.
- Veller LM, De Paula VS, Gaspar AM. Seasonal variation of hepatitis A virus infection in the City of Rio de Janeiro. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44(5):289-92.
- Victor J, Knudsen JD, Nielsen LP, Fomsgaard A, Thybo S, Bigbjerg I, et al. Hepatitis A vaccine. A new convenient single-dose schedule with booster when long-term immunization is warranted. *Vaccine* 1994;12(14):1327-9.
- Vidor E, Fritzell B, Plotkin S. Clinical development of a new inactivated hepatitis A vaccine. *Infection* 1996;24(6):447-58.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. The Zoological Society of London, Reagent's Park, London, NW1, 1979.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978;31:517-20.
- Wang CH, Tschen SY, Flehmig B. Antigenicity of hepatitis A virus after ultra-violet inactivation. *Vaccine* 1995;13(9):835-40.
- Wang CH, Tschen SY, Heinrich U, Weber M, Flehmig B. Immune response to hepatitis A virus capsid proteins after infection. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):707-13.
- Wang XY, Xu Z, Yao X, Tian M, Zhou L, He L, et al. Immune response of anti-HAV in children vaccinated with live attenuated and inactivated hepatitis A vaccines. *Vaccine* 2004;22(15-16):1941-45.

- Weil A. Uber eine eigentumliche, mit Milztumor, Ikterus and Nephritis einhergehende, akute Infections-Krankheit. Dtsch Arch Klin Med 1886;39:209-32.
- Werzberger A, Kuter B, Nalin D. Six years' follow-up after hepatitis A vaccination. N Engl J Med 1998;338:1160.
- Whittington RJ. Evaluation of a simple method for improving the precision of an ELISA detecting antibody in serum. J Immunol Methods 1992;148:57.
- Wiedmann M, Boehm, Schumacher W, Swysen C, Zauke M. Evaluation of three commercial assays for the detection of hepatitis A virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:129-30.
- Wimmer E, Murdin A. Hepatitis A virus and the molecular biology of picornaviruses: a case for a new genus of the family Picornaviridae. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. Viral hepatitis and liver disease, Baltimore: Williams & Wilkins, 1991;1-41.
- World Health Organization. Viral hepatitis: report of WHO Scientific Group. WHO Tech Rep Ser 1973;512:7-52.
- Wu W, Xu DZ, Yan YP, Zhang JX, Liu Y, Li RL. Evaluation of dot immunogold filtration assay for anti-HAV IgM antibody. World J Gastroenterol 1999;5(2):132-4.
- Xin Z, Li J, Wang X, Liu W. Effects of chlorine on the antigenicity and RNA polymorphism of hepatitis A Virus. Wei Sheng Yan Jiu 2002;31(1):15-7.
- Yap KL, Lam SK. Infectivity titration of the fast-replicating and cytopathic hepatitis A virus strain HM175A.2 by an in situ enzyme immunoassay. J Virol Methods 1994;4(1-2):217-26.
- Yayli G, Kilic S, Ormeci AR. Hepatitis agents with enteric transmission-an epidemiological analysis. Infection 2002;30(6):334-7.
- Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, et al. Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. Hepatology 1996;24(1):10-3.

- Yousef GE, Brown IN, Mowbray JF. Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. *Intervirology* 1987;28:163-70.
- Zahn J, Vallbracht A, Flehmig B. Hepatitis A in cell culture. V Neutralizing antibodies against hepatitis A virus. *Med Microbiol Immunol* 1984;173:9-17.
- Zajac AJ, Amphlett EM, Rowlands DJ, Sangar DV. Parameters influencing the attachment of hepatitis A virus to a variety of continuous cell lines. *J Gen Virol* 1991;72:1667.
- Zuckerman AJ. The history of viral hepatitis from antiquity to the present. In: Deinhardt F, Deinhardt J, eds. *Viral hepatitis: laboratory and clinical science*. New York: Marcel Dekker, 1983;3-32.