

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.

“DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE HEPATITIS A
POR EL METODO ELISA, UTILIZANDO ORINA Y SALIVA COMO MUESTRAS
CLINICAS”

María Isabel Jiménez López

Química Bióloga

Guatemala, marzo 2,010

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

“DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE HEPATITIS A
POR EL METODO ELISA, UTILIZANDO ORINA Y SALIVA COMO MUESTRAS
CLINICAS”

Informe de Tesis

Presentado por:

María Isabel Jiménez López

Para optar al Título de

Química Bióloga

Guatemala, marzo 2,010

JUNTA DIRECTIVA

| | |
|---|------------|
| Oscar C3bar Pinto, Ph.D | Decano |
| Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto | Secretario |
| Licda. Lilian Raquel Irving Antillon, M.A | Vocal I |
| Licda. Liliana Vides de Urizar | Vocal II |
| Lic. Luis Antonio G3lvez Sanchinelli | Vocal III |
| Br. Mario Estuardo Guerra Valle | Vocal IV |
| Br. Berta Alejandra Morales M3rida | Vocal V |

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Licda. Margarita Paz de Ramirez por su valiosa orientación, ayuda y apoyo incondicional que hicieron posible realizar esta investigación.

A Asociación Pro Bienestar de La Familia de Guatemala por permitir el uso de sus instalaciones y colaboración en este estudio.

A personal de Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por su colaboración durante todo el desarrollo de esta Tesis.

A los pacientes que cordialmente participaron en esta investigación.

ACTO QUE DEDICO.

A Dios y a la Virgen María

Por ser la fortaleza que guía e ilumina mis pasos y me permite vivir cada momento.

A mis padres

Ana Cristina López Estrada de Jiménez (QEPD) y Manuel Jiménez Yañez por las bendiciones, cariño, apoyo incondicional y el esfuerzo realizado para que juntos lográramos esta meta tan anhelada.

A mis hermanas:

Ana María y Alexandra quienes siempre estuvieron a mi par apoyándome y con quienes comparto este logro.

A mis hermanos:

Joaquín y Juan Manuel Jiménez López.

A mis sobrinos.

Diego, Ricardo, Pablo y Lucía Jiménez Salguero y Jose Manuel Jiménez Almorza esperando ser ejemplo de los logros que se pueden alcanzar.

Especial dedicación a mi Tío

Dr. Juan Rene López Estrada con quien comparto este logro por estar siempre presente con su cariño y apoyo incondicional.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I) RESUMEN | 1 |
| II) INTRODUCCION | 3 |
| III) ANTECEDENTES | 5 |
| A) HEPATITIS | 5 |
| B) HEPATITIS A | 5 |
| 1) ETIOLOGIA | 5 |
| 2) CLASIFICACIÓN DEL VIRUS | 6 |
| 3) EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA | 7 |
| 4) TRANSMISION Y PERÍODO DE INCUBACIÓN | 9 |
| 5) INMUNOFISIOPATOLOGÍA | 9 |
| 6) SIGNOS Y SÍNTOMAS | 11 |
| (a) Fase 1 o de Replicación viral | 12 |
| (b) Fase 2 o Fase prodrómica | 12 |
| (c) Fase 3 o Fase ictérica | 12 |
| (d) Fase 4 o Fase convaleciente | 13 |
| 7) MÉTODOS DE LABORATORIO | 14 |
| (a) Aislamiento e identificación del virus | 14 |
| (b) Estudio de Laboratorio | 15 |
| 8) USO DE ORINA Y SALIVA COMO MUESTRA CLÍNICA | 18 |

| | |
|--|----|
| 9) PREVENCIÓN | 19 |
| IV) JUSTIFICACIÓN | 20 |
| V) OBJETIVOS | 21 |
| A) Objetivo general | 21 |
| B) Objetivos específicos | 21 |
| VI) HIPOTESIS | 22 |
| VII) MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| A) UNIVERSO | 23 |
| B) MUESTRA | 23 |
| C) MATERIALES | 23 |
| 1) EQUIPO | 23 |
| 2) REACTIVO | 24 |
| (a) Reactivo HAVAB –M 2.0 | 24 |
| (b) Calibrador Index | 25 |
| (c) Control negativo | 25 |
| (d) Otros reactivos | 25 |
| 3) MÉTODOS | 25 |
| (a) Muestras de orina | 26 |
| (b) Muestras de saliva | 26 |
| (c) Muestras séricas | 27 |
| (d) Realización de Enzimounoensayo de micropartícula | 27 |
| D) DISEÑO DE INVESTIGACIÓN | 29 |
| 1) TIPO DE ESTUDIO | 29 |
| 2) MUESTRA | 29 |
| 3) TAMAÑO | 29 |

| | |
|--|----|
| 4) VARIABLES DE INTERES | 30 |
| (a) Diagnóstico de hepatitis A en suero | 30 |
| (b) Diagnóstico de hepatitis A en orina | 30 |
| (c) Diagnóstico de hepatitis A en saliva | 30 |

| | |
|-----------------------------|----|
| VIII) RESULTADOS | 31 |
| IX) DISCUSION DE RESULTADOS | 34 |
| X) CONCLUSIONES | 36 |
| XI) RECOMENDACIONES | 37 |
| XII) BIBLIOGRAFIA | 38 |
| XIII) ANEXOS | 43 |

I. RESUMEN.

En el presente estudio fueron evaluados los sueros y los fluidos corporales orina y saliva de cien pacientes con diagnóstico de Hepatitis A mediante el método de ELISA de micropartícula (MEIA, kit reactivo HAVAB – M 2.0) utilizando equipo automatizado Axsym (Abbott Laboratorios). El objetivo principal del estudio fue evaluar la utilización de orina y saliva como muestras alternativas para la detección de anticuerpos.

Se tomaron muestras de sangre, saliva y orina a cien pacientes comprendidos entre las edades de 5 y 15 años y que presentaban prueba positiva para anticuerpos IgM contra el virus.

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas para la obtención de suero, y se procedió a cuantificar anticuerpos IgM contra el virus de hepatitis A confirmando con ello el resultado de referencia inicial, bajo las condiciones del método ELISA de micropartícula, MEIA utilizado en este estudio. Así también fueron evaluadas las muestras de orina y saliva de los mismos pacientes en equipo automatizado, obteniéndose resultados para los tres tipos de fluidos corporales.

Todas las muestras séricas fueron positivas en la nueva corrida y por lo tanto confirmadas a lo reportado por los laboratorios privados participantes. Sin embargo, el porcentaje de positividad de la muestra de saliva fue de 23% para anticuerpos IgM al compararse con el resultado en suero y en orina fue de 4%. Por lo que solamente en cuatro pacientes se obtuvieron resultados positivos en las tres diferentes muestras.

Sin embargo, del estudio se concluye que la saliva y la orina como muestras clínicas para el diagnóstico de hepatitis A no son útiles ni satisfactorias en comparación con las muestras séricas utilizando el método ELISA de micropartícula MEIA. Se recomiendan evaluaciones posteriores que no descarten su posible uso, mediante la evaluación y/o consideración del momento más adecuado en el que los anticuerpos contra el virus sean detectables en estos fluidos así como la aplicación de otros métodos no convencionales moleculares como lo es la reacción de polimerasa en cadena (PCR) mediante la cual son detectados antígenos virales.

II. INTRODUCCIÓN.

La hepatitis A, causada por un virus compuesto de una molécula simple de ARN perteneciente al género de los Hepatovirus y a la familia *Picornaviridae* es una enfermedad infecciosa muy común en el mundo y caracterizada principalmente por inflamación del hígado. La forma más común de transmisión es la ruta feco-oral, por ingestión de alimentos y agua contaminada. Por tal razón, la endemicidad de esta enfermedad y los grupos a riesgo están relacionados inversamente a los estándares sanitarios e higiénicos y a las condiciones socio-económicas que prevalecen en las diversas regiones del mundo (1-6).

Según publicaciones del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, las estadísticas hasta marzo 2003 demuestran un acumulado de 775 casos con una tasa de incidencia de 7 por 100,000 casos, siendo los niños los más afectados (7).

La infección causada por el virus de hepatitis A puede ser difícil de detectar ya que los signos y síntomas son poco evidentes, por lo que su diagnóstico en la fase aguda está basado principalmente en las pruebas séricas de funcionamiento hepático y en la demostración de anticuerpos contra el virus en suero del paciente obtenido por venipunción. Esto, en la población pediátrica resulta una desventaja, ya que la obtención de sangre suele ser un método difícil, invasivo y doloroso (8,9).

En el presente trabajo fue evaluada la presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis A mediante un ensayo inmunoenzimático en muestras de orina y saliva, para evaluar la posibilidad de su uso como muestras alternativas a la muestra sérica en el diagnóstico de esa infección.

III. ANTECEDENTES

A. HEPATITIS:

Es la inflamación del hígado que puede ser causada por drogas, toxinas, enfermedades autoinmunes, genéticas e infecciosas por virus como el Epstein-Barr, citomegalovirus, herpes simple, varicela-zoster y rubeola, los que son poco frecuentes. Sin embargo, el término de hepatitis se refiere generalmente a la infección producida por virus hepatótrofos considerados en dos grupos distintos basados por su severidad clínica y su característica e importancia epidemiológica, así como por la presencia de una capa de lípidos como envoltura viral (Hepatitis B, C y D) y los que no la poseen (Hepatitis A y E) (4,6,10-12)

B. HEPATITIS A:

1) ETIOLOGÍA:

Hace 2,000 años Hipócrates descubrió una enfermedad semejante a la hepatitis A (4). En el curso de los siglos se han comprobado casos esporádicos así como epidemias. Krugman y colaboradores en 1960 realizaron estudios donde identificaron la existencia de un agente etiológico diferente. Sin embargo, la era moderna de la etiología de la hepatitis A se inició con la identificación de partículas virales en heces, descubriéndose por primera vez el virus en

un paciente voluntario. En el año de 1973 por Feinstone y colaboradores se valieron de anticuerpos de suero de un paciente en fase convaleciente para aglutinar las partículas víricas y observarlas con microscopía electrónica.

Un adelanto importante ha sido producir hepatitis A en modelos experimentales en primates y chimpancés, lográndose en 1979 el cultivo del virus de hepatitis A en células de riñón fetal del mono rhesus después de que el virus fue pasado múltiples ocasiones en monos marmosetos. Desde entonces el virus ha sido cultivado directamente de muestras clínicas o del medio ambiente, requiriéndose períodos largos de adaptación para la detección de una cantidad significativa de antígeno viral (6,10).

2) CLASIFICACIÓN DEL VIRUS:

El virus de hepatitis A es un virus pequeño (27 a 32 nm), sin envoltura y de forma icosaédrica, perteneciente a la familia *Picornaviridae* y único miembro del género de los Hepatovirus. Una propiedad única del virus de hepatitis A (VHA) es su tropismo por el hígado, su ciclo de replicación inusualmente lento y generalmente no citolítico y la falta de una clara relación genética con otros picornavirus.

Contiene una cadena sencilla de ARN y está compuesto de por lo menos tres polipéptidos estructurales mayores (VP1, VP2 y VP3) (2,3,6,12,13).

El virus es estable a temperatura ambiente, reteniendo su infectividad en las heces por dos semanas con una disminución importante a las

cuatro semanas; sobrevive por más de diez semanas en el agua sin verse afectado por la cloración de la misma. El virus resiste a la extracción con detergentes no iónicos, cloroformo o éter y retiene su infectividad a un pH de 1.0 a 38°C por 90 minutos. Es parcialmente inactivado a 60°C por una hora y completamente inactivado por rayos ultravioleta (UV) o ebullición por 5 minutos; así como también por formalina. La pasteurización puede no inactivar completamente al virus y son requeridas temperaturas de 85-90°C por un minuto para inactivarlo completamente en mariscos (3,6,11,14).

3) EPIDEMIOLOGIA Y PREVALENCIA:

En los últimos 20-40 años las epidemias de hepatitis A han desaparecido en muchos países con baja endemicidad de infección, mientras continúan ocurriendo ciclos de epidemias en países con alta o moderada endemicidad. Dicha endemicidad está determinada predominantemente por la ruta de transmisión y al igual que todos los organismos transmitidos entéricamente, los grupos a riesgo de infectarse están relacionados con las condiciones sanitarias e higiénicas así como con las condiciones socio-económicas que guardan las diversas regiones del mundo (3,8,9,13).

La prevalencia de la infección por virus de hepatitis A varía ampliamente por región geográfica y depende de factores como la densidad de la población, la calidad de saneamiento ambiental y la eliminación de excretas. La infección se presenta predominantemente en niños, por lo que la enfermedad en el adulto es poco frecuente. Sin

embargo, personas con mejor estatus socio-económico pueden no resultar infectados hasta alcanzar la adolescencia o la etapa de adulto joven.

Según publicaciones del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, en Guatemala por ser un país que se encuentra entre las regiones de alta endemicidad de hepatitis A debido a las condiciones de sanidad, la infección se presenta predominantemente en niños menores de 10 años y durante este año se habían acumulado 775 casos según estadísticas hasta marzo, con una tasa de incidencia acumulada de 7 por 100,000 casos, siendo la región norte del país la que presenta la mayor tasa de incidencia para el país (12 –32 por 100,000 casos) (6-8,15-17).

En países con mejores condiciones de sanidad y desarrollo como EEUU y Europa occidental, los niños habitualmente no resultan infectados (excepto en guarderías), no hay transmisión endémica del virus y la infección se presenta en viajeros, en hombres homosexuales y en abusadores de drogas.

La edad de prevalencia específica mundial de anticuerpos contra VHA (anti-VHA) puede definir varios patrones de infección. En naciones con menor desarrollo como África, Centro y Sudamérica y las islas de Pacífico, la prevalencia de infección por virus de hepatitis A en adultos alcanza el 90% donde los niños mayores tienen evidencia serológica de infección previa y muchos niños resultan infectados a la edad de 10 años. En países más desarrollados como Europa, EEUU y Asia la endemicidad de infección es intermedia o baja y la prevalencia varía

ampliamente siendo menor del 30% en adultos jóvenes y casi nula en niños (6,9,11,18-21).

4) TRANSMISIÓN Y PERIODO DE INCUBACIÓN:

El virus puede transmitirse de persona a persona sin darse cuenta, ya que la fase inicial de la infección posee síntomas poco identificables. El contacto con grupos de gente contaminada como niños en guarderías, relaciones anales entre hombres homosexuales y abusadores de drogas. La forma más común de transmisión es la feco-oral y ocurre de forma directa (persona a persona) o de forma indirecta por ingestión de agua contaminada con heces de personas infectadas, o alimentos que hayan sido lavados con agua contaminada o preparados por personas infectadas con el virus; los mariscos crudos o parcialmente cocinados son también posibles agentes contaminantes.

El período de incubación puede variar de persona a persona y puede ser de 10 a 50 días con una media de 30 días (2,3,5,6,8-11,13,14).

5) INMUNOFISIOPATOLOGÍA:

El virus penetra en el tubo digestivo y probablemente coloniza la mucosa intestinal. Durante el período de incubación ocurre una viremia en donde la replicación y la síntesis del virus dependen del hepatocito, por lo que la propagación viral empieza exclusivamente en las células hepáticas. Luego de entrar en ellas, el ARN viral es unido al ribosoma de la célula hospedera, las proteínas víricas son sintetizadas y el genoma viral es copiado por la polimerasa ARN viral. El grupo de

partículas virales es desprendido del árbol biliar y excretado en las heces. Después de cuatro semanas de incubación el individuo desarrolla relativos cambios químicos como se evidencia por el incremento de la actividad de la alaninaaminotransferasa (ALAT) en el suero, asociado con la aparición de anticuerpos IgM que pueden ser detectados por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) por otros ensayos capaces de dosificar los anticuerpos producidos contra el virus (2,6).

La infección por el virus de hepatitis A no involucra una enfermedad crónica del hígado en el hombre, probablemente porque el mecanismo inmunológico determina la eliminación de células hepáticas infectadas por el virus. Algunos estudios han demostrado que los linfocitos citolíticos de sangre periférica son capaces de lisar fibroblastos autólogos infectados por el virus de hepatitis A. Durante el curso de la enfermedad hay un pico de actividad citolítica de 2 a 3 semanas después de la aparición de ictericia. Se ha visto que células efectoras de la actividad son CD8+ y subpoblaciones de células T dependientes de HLA-1, capaces de producir interferón. Ambas funciones (citotoxicidad e interferón) son específicas al virus, y se sugiere que el interferón, además del efecto antiviral, estimula la expresión de HLA-1 sobre los hepatocitos y capacita para una mejor respuesta citotóxica de las células T contra las células hepáticas afectadas por el virus. Se puede encontrar también durante la fase aguda de la enfermedad células CD4+ en los conductos portales cuyo papel en la infección aún no está determinado. Se supone que también los mecanismos humorales efectores de la inmunidad (anticuerpos neutralizantes anti-

HAV, citocinas antivirales como interferón o factor de necrosis tumoral) pueden tener un papel importante en el control inmunológico de la infección por el virus de hepatitis A (6,9).

En el período de incubación ocurre una viremia que disemina el virus por todo el organismo y la infección de las células no se acompaña de la producción de interferón, lo que explica el carácter difuso de las lesiones. Los trastornos del apetito se han asociado con alteraciones de los epitelios a causa del deficiente metabolismo de vitamina A y que al mejorar la hepatitis A, desaparecen esas anormalidades que guardan relación con los niveles séricos de la bilirrubina e inverso con la concentración de la proteína plasmática que liga retinol (9,11, 21,22).

Aunque el término hepatitis denota inflamación del hígado, la manifestación clínica más objetiva es la colestasis así como también se observan lesiones histolíticas en varios órganos como intestino delgado, riñones, pulmones y bazo (6).

6) SIGNOS Y SÍNTOMAS:

La infección por el virus de hepatitis A puede ser difícil de detectar porque a veces los signos y síntomas no son evidentes. En algunos casos se manifiesta con los mismos síntomas del catarro: cansancio, pérdida del apetito, debilitamiento, fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), náusea y vómito, dolor abdominal, erupciones de la piel, oscurecimiento de la orina e ictericia (5,6,8).

La presentación clínica de la hepatitis A varía de persona a persona. Algunos pacientes pueden presentarse asintomáticos o con moderada

sintomatología, otros pueden presentar falla hepática fulminante y hasta la muerte. Las manifestaciones clínicas clásicas de la hepatitis infecciosa envuelven cuatro fases:

(a) Fase 1 o de replicación viral:

- Pacientes asintomáticos durante esta fase.
- Estudios de laboratorio demuestran marcadores enzimáticos y serológicos de la hepatitis.

(b) Fase 2 o Fase prodrómica:

- Pacientes experimentan anorexia, náusea, vómito, alteraciones del gusto, artralgias, malestar, fatiga, urticaria y prurito. Algunos desarrollan aberración al humo del cigarro.
- Cuando son vistos por personal médico en esta fase puede simular un cuadro de gastroenteritis o síndrome viral.

(c) Fase 3 o Fase icterica:

- Pacientes notan oscurecimiento de la orina, seguido de decoloración de las heces.
- En adición predominan los síntomas gastrointestinales y el malestar, los pacientes se vuelven ictericos y pueden desarrollar dolor en cuadrante superior derecho con hepatomegalia.

(d) Fase 4 o Fase convaleciente:

- Síntomas de ictericia se resuelven.
- Enzimas hepáticas regresan a su valor normal (5,8,9,11).

Los hallazgos de laboratorio encontrados incluyen incremento de la actividad de aminotransferasas séricas, bilirrubinas (ambas directa y total), actividad de fosfatasa alcalina (F.A.). La alaninoaminotransferasa (ALAT) se incrementa más que la aspartatoamimotransferasa (ASAT), y la actividad de estas se incrementa antes que la de las bilirrubinas, la FA eleva relativamente su actividad durante el curso de la enfermedad y tiende a ser paralela al incremento de las bilirrubinas.

Otros hallazgos de laboratorio no específicos incluyen el aumento de inmunoglobulinas y el valor de la velocidad de sedimentación. Típicamente la actividad de las aminotransferasas empieza a normalizarse antes de bilirrubinas; sin embargo, pueden mantenerse en valores anormales por varios meses después.

Manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis A son poco comunes pero puede existir urticaria que en casos severos incluye inflamación de pequeños vasos capilares (vasculitis) y artritis aguda, meningitis concomitante y ocasionalmente fallo renal agudo. Otras manifestaciones menos frecuentes de la infección son las hematológicas como anemia aplásica aguda o una anemia severa con trombocitopenia (6,11,20).

Los niños menores de dos años raramente manifiestan signos y síntomas cuando padecen de la enfermedad; sin embargo, su severidad aumenta progresivamente con la edad y el tiempo de infección. En el adulto la hepatitis A usualmente tiene una duración mayor pudiéndose extender por algunos meses la fase convaleciente de la enfermedad (11,21,22)

7) METODOS DE LABORATORIO:

(a) Aislamiento e Identificación del Virus:

En la actualidad ha sido posible el aislamiento primario del virus a partir de muestras clínicas o ambientales (heces, agua, mariscos) empleando diversos cultivos primarios o líneas celulares. Sin embargo, por el crecimiento lento característico del virus de hepatitis A son necesarios períodos largos de adaptación (mayor de 120 días) antes que puedan ser detectados focos infecciosos o antígenos del virus. El virus A de la hepatitis generalmente no produce efecto citopático en los cultivos celulares y la detección del virus en estos cultivos requiere de técnicas especiales como la técnica de radioinmunoanálisis (RIFA), la cual implica anticuerpos radiomarcados para detectar focos infecciosos en células que han sido fijadas. La incapacidad de no contar con un cultivo rápido de virus de hepatitis A ha impedido el empleo de este método para el diagnóstico de la infección o para la detección de virus de hepatitis A en muestras de medio ambiente (6,11,23). La inmunoelectroscopía (IEM) fue utilizada extensamente en los primeros estudios para identificar a dicho virus, pero ha sido sustituido por técnicas más sensibles; estas incluyen inmunoensayos para la detección de antígeno de virus de hepatitis A y la detección de ARN-VHA siguiendo el método de amplificación de ácido nucleico (reacción de polimerasa en cadena o PCR); este último es el modo de elección para detección de niveles bajos de virus de hepatitis A en muestras clínicas o ambientales. Sin embargo debe tomarse en cuenta que la

presencia de ARN-VHA no siempre puede equivaler a la presencia del virus en estado infeccioso (6).

(b) Estudios de Laboratorio:

Las pruebas de función hepática en su mayor parte son empíricas y a menudo no indican la gravedad del procedimiento patológico. A pesar de esto, pueden ser de utilidad en búsqueda de enfermedades hepatobiliares, evolución del diagnóstico y vigilancia del curso de la enfermedad.

- Enzimas Hepáticas:
 - Niveles elevados de transaminasas; ALAT por encima de 100U/L y generalmente mayores que los de ASAT los cuales regresan a su nivel normal entre la quinta y la semana veinte.
 - Niveles elevados de FA acompañan la fase aguda de la enfermedad en conjunto con la gamma glutamiltransferasa (GGT).
- Pruebas de función hepática:
 - Los niveles de bilirrubinas se elevan luego de los de las transaminasas y pueden permanecer elevados durante algunos meses, es indicativo de colestiasis en enfermedad por virus A de la hepatitis y generalmente ocurre en pacientes mayores.
 - Los niveles de albúmina pueden decaer moderadamente durante la enfermedad.
- Tiempo de protombina (TP):
 - Puede presentar una elevada prolongación.

- Hematología:
 - Moderada linfocitosis, la infección puede presentar raramente aplasia de células rojas y pancitopenia con índices bajos de hemólisis.
- Heces y orina :
 - Se observa palidez en la coloración de las heces y oscurecimiento de la orina.(9,21-25).

El diagnóstico de infección aguda de hepatitis A se basa principalmente en tests serológicos para anticuerpos IgM que están presentes en el suero al momento de la aparición de síntomas y está acompañado con elevación de ALAT, lo que usualmente desaparece dentro de los primeros cuatro meses. La presencia de estos anticuerpos generalmente indica infección reciente o recurrente, pero pueden permanecer por seis meses o más. Los anticuerpos de tipo IgG se pueden detectar inmediatamente después de la aparición de la IgM y su existencia sin la presencia de IgM específica indica infección pasada y persiste por muchos años. La IgA secretoria está asociada con resistencia intestinal para muchas infecciones virales, incluyendo la hepatitis A.

La detección de fase aguda de la enfermedad está basada principalmente en la respuesta de los anticuerpos donde los IgM están presentes en más del 90% de los individuos en su presentación inicial, los cuales tienen un pico en su respuesta durante el primer mes del padecimiento de la enfermedad. Después de la fase aguda, los anticuerpos contra el virus consisten predominantemente en anticuerpos

de tipo IgG, mientras que en el estadio agudo son los anticuerpos IgA e IgM los que representan la mayor porción de la respuesta humoral específica (2,6,9,11,13).

En casos de hepatitis A el diagnóstico de laboratorio se establece por el muestreo de suero y determinación de niveles de enzimas hepáticas (ALAT y ASAT) así como de la detección de anticuerpos IgM anti-VHA en muestras de sangre. Sin embargo la dificultad de obtención de muestras sanguíneas, mayormente en niños, ha hecho que en estas últimas décadas se estén diseñando métodos que originalmente fueron descritos para suero, para ser utilizados en otros tipos de muestras clínicas (saliva, sangre total o suero con la técnica de papel filtro y orina). Estos métodos se están utilizando con mayor frecuencia por su conveniencia en el diagnóstico y para propósitos epidemiológicos (1,2,6).

La respuesta serológica inicial de la hepatitis A está directamente relacionada con la actividad humoral produciendo la formación de anticuerpos IgM, IgG e IgA los cuales son detectables con el apareamiento de los síntomas.

8) USO DE ORINA Y SALIVA COMO MUESTRA CLÍNICA

En estudios recientes se han comparado resultado obtenidos por la detección de anticuerpos contra virus de hepatitis A en saliva y orina; con el objeto de evaluar la posibilidad de reemplazar el uso de suero por dichas muestras. Existen diversos estudios en los que se han aplicado métodos como ELISA y radioinmunoensayo (RIA) para demostrar la

presencia de diversos analitos como esteroides, drogas terapéuticas, drogas de abuso y anticuerpos contra diversas enfermedades infecciosas como hepatitis A, B, C, sarampión, varicela, rubéola, VIH, Epstein-Barr, parvovirus B19, herpes virus y últimamente *Helicobacter pylori*. Esto disminuye el riesgo de infección a personal de salud en comparación con la manipulación de muestras séricas (2,6,26-31). Algunos estudios han demostrado alta especificidad y sensibilidad al aplicar métodos convencionales como ELISA o RIA, utilizando esas muestras alternativas para demostrar la prevalencia de anticuerpos anti-VHA. Ellos también han descrito la importancia del uso de métodos no invasivos, que no rompan la piel o entren al cuerpo, y mediante los cuales se puedan obtener múltiples muestras de pacientes, a cualquier hora y sin requerimiento de personal de salud especializado; además, estas muestras son menos infecciosas que las muestras séricas, su obtención es de bajo costo, simple y fácil; al mismo tiempo mejoran el acceso a puntos epidémicos, la población infantil, a números grandes de muestras y a grupos de alto riesgo. Esto implica un mejor rol en vigilancia epidemiológica y control de enfermedades infecciosas (18,19,26,27,32-40).

9) PREVENCIÓN:

La única manera eficaz de prevenir la transmisión es lavarse cuidadosamente las manos después de usar el sanitario o de cambiar pañales y antes de comer o preparar alimentos; consumir agua potable o hervida; se recomienda que el paciente infectado no manipule

alimentos durante el período contagioso. Los miembros o personas en contacto directo con una persona infectada deben asearse para determinar si necesitan vacuna de globulina inmune (GI) que reduce al mínimo las posibilidades de enfermarse (4,6,9,21,22).

IV. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico definitivo de hepatitis A se realiza mediante la demostración de anticuerpos IgM contra el virus de hepatitis A (VHA). Estos anticuerpos son generalmente detectados en muestras séricas obtenidas de los pacientes, mediante venipunción.

Sin embargo, existe la posibilidad de encontrar anticuerpos en otros fluidos biológicos como orina y saliva, los que también han sido sugeridos como muestras útiles en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas como Epstein–Barr, Rubéola, virus de hepatitis B y C. Hay algunas publicaciones que hacen referencia al diagnóstico de hepatitis A utilizando este tipo de muestra, pero no se ha generalizado su uso pues son necesarios más estudios.

En nuestro medio esto no se ha investigado, por lo que es de suma importancia evaluar el uso de estos fluidos corporales, en vista de su conveniencia y de diversas características que los hace cada vez más necesarios como muestras clínicas alternativas. La facilidad en la recolección de este tipo de muestras, sumada a la ventaja de que su obtención no es invasiva ni dolorosa, específicamente para la población pediátrica, hace necesario comprobar reproducibilidad en la aplicación de los métodos convencionales.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL:

- Evaluar la utilidad de otros fluidos corporales (orina y saliva) como muestras alternativas a las muestras sanguíneas para el diagnóstico de hepatitis A.

B. ESPECÍFICOS:

- Determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis A en orina y saliva.
- Determinar la reproducibilidad existente entre los resultados obtenidos en las muestras de orina y saliva con los obtenidos en las muestras de suero en la detección de anticuerpos contra VHA.
- Evaluar el uso de muestras de orina y saliva para el diagnóstico de hepatitis A.

VI. HIPÓTESIS

La orina y la saliva son fluidos corporales que pueden ser utilizados como muestras clínicas para el diagnóstico de hepatitis A mediante la determinación de anticuerpos específicos contra dicho virus por un método ELISA de micropartícula en equipo automatizado.

VII. MATERIALES Y METODOS

A) UNIVERSO:

Pacientes con Hepatitis A en fase aguda de la enfermedad.

B) MUESTRA

Pacientes comprendidos entre 5 y 15 años de edad que se encuentran en fase aguda de la enfermedad, previo consentimiento del paciente o la persona responsable (anexo No.1).

C) MATERIALES:

1) EQUIPO:

- Jeringas
- Tubos vacutainer
- Centrífuga
- Tubos Eppendorf
- Frascos de orina estériles
- Motas de algodón estériles
- Goma de mascar sin azúcar
- Pipetas Pasteur
- Bulbo
- Guantes
- Papel mayordomo

- Congelador -70°C
- Equipo AxSym (Equipo automatizado Abbott Laboratorios)
- Copas de muestras AxSym.

2) REACTIVOS:

(a) Reactivos HAVAB-M 2.0 Sistema AxSym Abbott Laboratorios. Kit pack que contiene:

- 1 botella (10.5 ml) con anticuerpos IgM humanos unidos a micropartículas almacenado en el kit pack (botella reactiva 3) con estabilizadores proteicos y preservantes.
- 1 botella (12.4) con anticuerpos monoclonales de ratón contra el virus de hepatitis A, conjugados a fosfatasa alcalina, estabilizadores proteicos, preservantes y agentes antimicrobianos (botella reactiva 1).
- 1 botella (9.6 ml) con virus hepatitis A en buffer de fosfatos con títulos mayores e iguales a 3,000, con estabilizadores proteicos y preservantes. El virus de hepatitis A ha sido inactivado con formaldehído. (botella reactiva 2).
- 1 botella (50.2 ml) conteniendo un buffer diluyente de cloruro de sodio, con agentes preservantes y antimicrobianos. (botella reactiva 4).

(b) Calibrador INDEX con plasma humano reconstituido y reactivo para anticuerpos IgM anti-VHA, no reactivo para HBsAg, HIV, Anti-HVC y anti-HIV-1/HIV-2.

(c) Control Negativo con un rango index de lectura de 0.01 a 0.5 y control Positivo con un titulo mínimo de Anticuerpos IgM anti- VHA. de 1:12 y un rango index de 1.20 a 2.70.

(d) Otros Reactivos:

- Solución para limpieza de sonda de aspiración de muestras (Probe cleaning solution).
- Solucion 1 MUP (sustrato fluorescente, 4-metilumbeliferilfosfato).
- Solución 3 (matriz cell wash). Botella de 1000 ml de Cloruro de sodio 0.3M con preservantes y agentes antimicrobianos
- Solución 4 liquido diluyente de buffer de fosfatos 0.1M con preservantes y agentes antimicrobianos.

3) MÉTODOS:

Para el presente estudio se contó con una población de 100 pacientes de ambos sexos comprendidos entre las 5 y 15 años de edad, que se presentaron en diversos laboratorios privados para el diagnóstico sérico de hepatitis A aguda.

Con ayuda de los laboratorios a los pacientes se les solicitó su colaboración por medio de consentimiento escrito (anexo No.1) para proporcionar conjuntamente con nueva muestra de sangre para

obtención de suero, muestras de saliva y orina para la detección de anticuerpos contra el virus de hepatitis A.

(a) Muestras de orina:

Las muestras de orina fueron recolectadas en recipientes estériles previamente identificados y siguiendo las instrucciones de recolección para muestras de urocultivo; por lo que al paciente se le indicaron las condiciones de limpieza utilizando hibiscrub al 0.5%, y solicitándole que dejara caer en el sanitario una pequeña porción de la orina recolectando la fracción media de la micción en el recipiente estéril y terminar descartando la última porción de la misma.

(b) Muestras de saliva:

Para la recolección de la muestra de saliva se le proporcionó al paciente una goma de mascar sin azúcar y se le solicitó que la masticara en un tiempo de 3 minutos con el fin de estimular la producción del exudado, durante este tiempo se le solicitó que no tragara la saliva que iba produciendo sino que la fuera depositando en tubos eppendorf durante varios intervalos de tiempo, se identificó la muestra para el posterior proceso.

Además de la muestra de saliva y orina obtenidas según indicaciones anteriores, las muestras séricas positivas para anticuerpos contra el virus de la hepatitis A fueron procesadas el método de ELISA de micropartícula en equipo AxSym de Abbott Laboratorios con reactivo HAVAB - M 2.0.

(c) Muestras séricas:

Fueron obtenidas mediante venipunción utilizando el método vacutainer, se centrifugaron a 3,000 RPM por 5 minutos donde se obtuvo el suero de paciente, fue separado y colocado en tubos ependorff con su respectiva identificación.

(d) Realización de Enzimonio de micropartícula:

Para el inicio de proceso de las diferentes pruebas se realizó calibración index para la prueba HAVAB-M 2.0 en equipo automatizado AxSym de Abbott laboratorios. En la calibración se programó el calibrador Index el cual, el sistema trabajo por duplicado generando una curva de calibración de un solo punto, la cual fue verificada por el sistema del AxSym con los resultados de esta en las especificaciones asignadas a los parámetros seleccionados de la validez de prueba en el software del sistema (anexo No 2).

Esta curva quedó activa para el proceso de las diferentes muestras (anexo No 3) y fue validada al pasar conjuntamente con el calibrador Index un control negativo y uno positivo.

Tomando en cuenta que para la realización del estudio todas las muestras séricas proporcionadas por los laboratorios con diagnóstico positivo fueron reevaluadas conjuntamente con las muestras de orina y saliva para la titulación de anticuerpos IgM anti VHA por el método utilizado en el estudio; las que, conforme se fueron obteniendo e identificando los tres especimenes

datos por los pacientes en las copas de muestras para sistema automatizado AxSym, fueron programadas las corridas colocando control negativo, control positivo para validación de prueba.

El proceso de las muestras se realizó por el método ELISA de micropartícula que se basa en la tecnología MEIA. Inmunoensayo que utiliza una solución de micropartículas suspendidas en latex de tamaño submicromico recubiertas de una molécula de captura específica (IgM anti-VHA). Este utiliza el principio de unión por competencia entre los anticuerpos anti-VHA de la muestra y el anti-VHA conjugado al antígeno y adheridos a las micropartículas, es seguido por la reacción entre el virus de la hepatitis A (humano) en la solución de HAV y el límite anti-HAV de IgM a las micropartículas.

La detección del complejo inmune entre IgM anti-VHA y antígeno de VHA es alcanzado por la adición de anti-HAV (ratón monoclonal): conjugación de la fosfatasa alcalina, la que al final junto con la adición del sustrato forman un grupo fluorescente el cual es medido por un sistema óptico.

La presencia o la ausencia de anticuerpos IgM anti HAV en la muestra es determinada comparando el índice de formación de producto fluorescente con la establecida con el calibrador, calculada en la calibración Index de Axsym HAVAB-M determinando un valor Index. Las muestras con los valores Index mayores de 1.20 se consideran reactivas para anticuerpos IgM anti HAV, las muestras con valor de índice contenidas en el rango de la 0.8 a 1.20 se consideran zona gris para anticuerpos IgM anti.HAV, las muestras con valor Index menor de 0.80 se consideran no reactivas para anticuerpos IgM anti HAV. (Anexo No.4).

D) DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

1) TIPO DE ESTUDIO: Descriptivo, prospectivo.

2) MUESTRA: El muestreo fue realizado a conveniencia; ya que únicamente se tomaron pacientes que se presentaron con sintomatología de hepatitis A y con estudios de laboratorio para el diagnóstico de la misma, por lo que se procedió a tomar en conjunto con la muestra requerida para los exámenes las muestras de orina y saliva que fueron tomadas para el presente trabajo.

Se utilizaron únicamente las muestras que presentaron anticuerpos IgM contra el virus de hepatitis A.

3) TAMAÑO: 100 pacientes de ambos sexos con diagnóstico confirmado de hepatitis A y comprendido entre las edades de 5 y 15 años de edad ya que como objetivo principal de este estudio, no fue demostrar prevalencia de la enfermedad, sino concordancia entre el diagnóstico sérico, saliva y orina.

Se asumió que en cada caso la probabilidad (P) de ser positivo es 50%, a partir de esta, se utilizó la siguiente fórmula para cálculo de tamaño de muestra:

$$N = \frac{P \cdot q \cdot Z^2}{d^2}$$

Donde P = 0.5

$$q = 1 - P$$

$$Z = \text{nivel de confianza} = 95\% = 1.96$$

$$D = \text{límite error en la estimación} = 10\%$$

Por lo tanto:

$$N = (0.5) * (1 - 0.5) * (1.96)^2 / (0.1)^2$$

$$N = (0.5) * (0.5) * (3.84) / 0.01$$

$$N = 96 \approx 100$$

4) VARIABLES DE INTERES.

(a) Diagnóstico de hepatitis A en suero.

(b) Diagnóstico de hepatitis A en orina.

(c) Diagnostico de hepatitis A en saliva.

VIII. RESULTADOS

Se procesaron las cien muestras séricas positivas para anticuerpos contra el virus de hepatitis A para reconfirmar el diagnóstico proporcionado por los laboratorios privados en las muestras séricas mediante el método ELISA de micropartícula. Al mismo tiempo, y con el mismo método, se realizó el análisis para determinar los anticuerpos contra este virus en muestras de saliva y orina recolectadas de los mismos pacientes positivos que admitieron participar en el estudio.

Los tres tipos de muestras o especímenes fueron procesados por el método ELISA de micropartícula en equipo AxSym de Abbott Laboratorios con el kit de reactivos HAVAB - M 2.0 en equipo automatizado AxSym.

Los cien casos fueron confirmados por la detección de anticuerpos IgM contra el virus de hepatitis A en el suero. Sin embargo, únicamente se confirmó la presencia de estos en 23 muestras de saliva y en 4 muestras de orina. Esto significa una negatividad de 77% en las muestras de saliva y 96% en las de orina.

Los resultados obtenidos mediante el método HAVAB-M 2-0 demuestran y confirman la seropositividad asegurando la presencia en sangre de los anticuerpos IgM contra los virus de hepatitis A detectados por los ocho laboratorios privados que colaboraron en el estudio como lo muestra la tabla No 1. versus el porcentaje (%) de positividad obtenidos en los fluidos corporales evaluados.

TABLA No. 1 Porcentaje de positividad en muestras de saliva y orina versus muestras sanguíneas.

| Anticuerpos IgM contra virus hepatitis A | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------------|
| | POSITIVO | NEGATIVO | PORCENTAJE (%) |
| No. Casos evaluados | 100 | 0 | 100% |
| Suero | 100 | 0 | 100% |
| Saliva | 23 | 77 | 23% |
| Orina | 4 | 96 | 4% |

Por lo tanto, teniendo los resultados en suero (muestra estándar para el diagnóstico de hepatitis A) era necesario calcular la concordancia (Kappa) de los resultados en saliva contra suero y en orina contra suero. Sin embargo, el método de Valor Predictivo propuesto no fue utilizado debido a que todas las muestras se evaluaron mediante el método automatizado ELISA de micropartícula utilizado en el presente estudio; y la obtención de resultados bajo un único procedimiento, el método estadístico kappa para determinar concordancia se descarta ya que todas las muestras evaluadas para anticuerpos contra virus de hepatitis A son positivas por lo que únicamente se describen los porcentajes (%) de positividad, obteniendo 23% para las muestras de saliva y 4% en muestras de orina.

Se observa claramente que ninguna de las dos nuevas muestras clínicas evaluadas sobrepasa el 25% de positividad con su contraparte en suero considerando bajo el grado de positividad para ambas muestras clínicas respecto al el método de referencia utilizando para la estimación de la presencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis A. en suero.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS.

Realizando un análisis de los resultados y comparando los obtenidos en las tres diferentes muestras clínicas se observó que de los cien pacientes que participaron solamente fueron detectados anticuerpos IgM contra el virus de hepatitis A en veintitrés muestras de saliva y en cuatro muestras de orina. Estas muestras fueron obtenidas de los cien pacientes positivos en suero diagnosticados en los laboratorios participantes y confirmados por ELISA en el desarrollo del presente estudio. Esto demuestra un porcentaje de detección de anticuerpos de 23% y 4% en las muestras de saliva y orina, respectivamente, los cuales son valores sumamente bajos.

Existe permanente interés por la utilización de muestras biológicas para diagnóstico que sustituyan los métodos invasivos como la venipunción, aunado a razones de bioseguridad. Sin embargo, se encuentra como dificultad esencial la utilización de fluidos como orina y saliva por la baja concentración de anticuerpos presentes en las mismas (anexo No 5). Se ha determinado que en orina la concentración de los anticuerpos IgG es 10,000 veces menor a la encontrada en suero, y en saliva sólo 800 veces menor por lo que tiene todavía un nivel de inmunoglobulinas marcadamente superior al encontrado en muestras de orina (41, 42, 43). Esta puede ser la principal razón por la baja positividad observada en esas muestras provenientes de pacientes positivos en suero. Otro factor determinante pudo ser la fase de la enfermedad en que los pacientes fueron muestreados. En ese sentido, podría sospecharse que en una fase clínica muy temprana en la infección por el virus de la hepatitis A, la

excreción de los anticuerpos por la vía urinaria y en la saliva ocurre a muy baja concentración, lo que causa que estos, aunque presentes, no sean detectables por el método de referencia (anexos No 6 y 7).

Aún con estos resultados obtenidos en las muestras de saliva y de orina, es necesario seguir realizando estudios para la evaluación de la utilización de estas como material biológico alternativo a las muestras séricas, tomando en cuenta esta vez la alta sensibilidad requerida por el método diagnóstico o aplicando un método de concentración de las inmunoglobulinas en estos fluidos. Esto debido principalmente al incremento de las medidas de bioseguridad que siguieron a la aparición de VIH y al aumento constante de la incidencia de enfermedades transmitidas por la sangre como hepatitis B y hepatitis C. El uso de estas muestras alternativas también es deseable para realizar estudios de tamizaje o estimaciones epidemiológicas en grupos numerosos de muestras. En otros campos del diagnóstico, esta necesidad ha llevado a la aplicación de métodos que usan saliva u orina para la dosificación de diferentes hormonas, por ejemplo.

X. CONCLUSIONES.

- Específicamente para el grupo de 100 niños que participaron en el estudio se encontró que a pesar que el 100% de las muestras en suero son y dieron positivo con el método utilizado, solamente 23% de las muestras de saliva y 4% de las muestras de orina resultaron positivas, evaluadas con el mismo método automatizado ELISA de micropartícula HAVAB-M 2.0 de Abbott laboratorios.
- El uso de saliva y orina como muestras clínicas para el diagnóstico de hepatitis A no es eficaz en comparación con las muestras séricas.
- El método de referencia automatizado ELISA de micropartícula HABAV-M-2.0 de Abbott laboratorios para diagnóstico de hepatitis A utilizado en muestras séricas no es recomendado para evaluar orina o saliva como muestra clínica.
- La baja correspondencia de resultados, utilizando este método, no puede afirmarse que las muestras de saliva y orina pudieran sustituir al suero como medio de prueba para la cuantificación de anticuerpos IgM contra el virus de hepatitis A, por lo que se concluye que estas no pueden sustituir a las muestras séricas.

XI. RECOMENDACIONES.

- Seguir utilizando el suero como muestra clínica cuando se utilizan los métodos de referencia existentes.
- Orina y saliva no pueden ser utilizadas como muestras clínicas para la determinación de anticuerpos contra el virus de hepatitis A, hasta que se demuestre concordancia entre estas con las muestras séricas.
- Evaluar la presencia de anticuerpos totales contra el virus, con el fin de no descartar la posibilidad de utilizar saliva y orina.
- Estudiar y determinar mediante nuevos estudios, el mejor momento en el curso de la infección para el uso de una u otra muestra.
- Evaluar el uso de muestras de saliva y orina para el diagnóstico de enfermedades infecciosas con métodos de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para evaluar la presencia de componentes propios del virus de hepatitis A.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Oboa IT, et al." Detection of Hepatitis A antibodies by ELISA using saliva as clinical samples". Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, Brazil,2002. 42; 103:38-41.
- 2) Rose NR, Hamilton RA, Detrick B. "Manual of Clinical Laboratory Immunology". 6ª ed. Washington: ASM Press, 2002. V+1322pag (pp698-699).
- 3) Center for Food Safety & Applied Nutrition." Hepatitis A". Periodic Publications. Feb, 2002. www.cfsan.fda.gov.
- 4) Superintendencia de Servicios de Salud. Prevalencia Global de Hepatitis A "Serologías Hepatitis A, B & C". www.sadieo.ucsf.edu.
- 5) Villarreal R G. "Hepatitis A "Monclova. Coahuila; México,2000 www.lebbyac.com/hepatiti.htm.
- 6) Scope R. "Programa de Actualización Continua de Infectología. Hepatitis A" Copyright. 2003. Dr. Scope, Derechos Reservados. Diseños y Programación Educación Médica Continua. www.drscope.com/pac/onfecto-1/c2/index.htm
- 7) Ministerio de Salud Pública. Republica de Guatemala" La Semana Epidemiológica". Situación actual de estado de salud de la población. No10-2003 Marzo, 2003. www.mspas.gob.gt
- 8) FDHN: "La Hepatitis A, B & C". http://fdhn.org/html/education/hepatitis_espanol.html.
- 9) Gilroy. Emedecine "Hepatitis A" Feb11,2002.www.emedecine.com/med/tropic991.htm.

- 10) Robbins SL, Cotran RS, "Patología Estructural y Funcional". 2da ed. México: Ed. Interamericana, 1985.VII+1519p (p959, 960).
- 11) COF rs."Clinical Manifestation and Diagnosis of Hepatitis A virus infection". Department of Medicine, MetroWestMedical Center. www.emedecine.com.
- 12) Microbiology & Immunology. HAV. www.micro.msb.le.ac.uk
- 13) World Health Organization." Hepatitis A" vesion4.0 .www.who.int.
- 14) "Hepatitis A" www.dialforhelth.net.
- 15) La Hora. Guatemala de la Asunción, miércoles 13 junio 2001. Salud reporta 2446 casos de Hepatitis A. Guate(AFP). www.mspas.gob.gt.
- 16) Ministerio de Salud Pública. Republica de Guatemala "La Semana Epidemiológica en Guatemala". AñoV, Bol. inf. No221. Guatemala. www.mspas.gob.gt.
- 17)Maguire HC. et al. " A collaborative case control study of sporadic Hepatitis A in England." Communicable Disease Repport.1995;vol5RevN.3
- 18) Ochnio JJ. et al."Past infection with Hepatitis A virus among Vancouver street youth, injection drug user and men who have sex with men: implications for vaccination programs". Canada. CMAJ.2001;165:293-7
- 19) "Hepatitis A". www.hepayology2.aasldjournals.org/scripts.
- 20) Krugman S, Katz SL, Gershon AA, Wi1lfert CM. "Enfermedades Infecciosas". 8ed. México: editorial Interamericana. McGraw-Hill, 1988.I+641p(p107-131).
- 21) Feigin R, Cherry JD. "Tratado de Enfermedades Infecciosas en Pediatría". 2ed. México: Editorial Interamericana, 1992. vol1. V+2260p(p662-664).
- 22) Henry JB. Todd-Stanford-Davidsohn: "Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio".8ed. España. 1992. VII+1774p (p1595-1596).

- 23) Wyngaarden JB, Smith LLH. "Tratado de Medicina Interna de Cecil". 16ed. Madrid: Editorial Interamericana, 1985. vol1. XII+1191p (p810-816).
- 24) Bauer WA, Naiman OV, Han X, Margolis HS. "Duration of viremia in Hepatitis A virus infection" J. Inf. D. June 2002; 182:12-17
- 25) Madar R, Straka S, Baska T, "Detection of antibodies in saliva an effective auxiliary method surveillance of infection disease". Fac. Of Medecine. Institute of Epidemiology; 2002. www.ncbi.nlm.nih.
- 26) Hofman LF. "Human saliva as Diagnostic specimen" Jou. of Nut. The American Society of Nutricional Sciences. 2001. 131:1621-1625
- 27) Belltrami EM, Williamas IT, Shapiro CN, Chamberland ME. "Risk and management of blood-borne infections in HealthCare Workers". Hospital infection Programs. Nacional Center of Infections Disease. Public Health Service, Atlanta Georgia U.
- 28) Wood GP. "Urinary estrogen assay an maternal hyperbilirubinemia" J. Clin. Microbiol. 1999. BRIL; 37: 1100-1106.
- 29) Martinez P. "Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western-blot assay using serun, gingival-crevicular transudate, and urine samples". Clin. Microbiol. February; 37:391-395
- 30) Vyse AJ, "Detection of rubeolla virus specific immunoglobulins in saliva by an amplification based enzyme-linked inmunoabsorbent assay using monoclonal antibody to fluorecein isothiocyanate". Clin. Microb. July 2000, vol13, No.3p384-407.
- 31) Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, Chadha MS. " Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of Hepatitis A" Clin Diag Lab Inm, July 2002 vol9 p840-845.

- 32) Perry KR, Parry JV, Vavdervelde EM, Mortimer PP. "The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to Hepatitis A and B core antigen". J. med. VIROL. 1992. Dec;38:265-270
- 33) The Bulletin of Irish National Virus Reference Laboratory-4/95. Nov 1995.
- 34) Parry JV, Perry KR, Panday S, Mortimer PP. "Diagnosis of Hepatitis A and B by testing saliva". J. med. Virol, 1992 Feb; 13:9-11.
- 35) Barin F. et al. "Detection of IgM anti Hepatitis A antibodies by immunoenzyme method. Interpretation of result and comparison of 2 tests (HAVAB-MEIA and Hepanostika anti HAVIgM)". www.emedecine.com.
- 36) Wang Y "Study on diagnosis of Hepatitis A by testing salivary IgM anti-HAV". J Med Virol 1989; Aug; 28:255-260.
- 37) Manual of Collection and Processing of mucosal specimen. www.aidsreagent.org/pdfdocs/manual.pdf.
- 38) The overall mortality rate for HAV is approximately 0.01%. Children younger than 5 years and adults new diagnostics. www.nidr.nib.gov.
- 39) Saliva Diagnostic System. Incorporation. www.biog.org.
- 40) Sensitive assay for viral antibodies in saliva an alternative to test on serum. pathol. Boil. 1983. Dec; 31:825-828.
- 41) Reporte del cuidado oral.. Journal resumido de avances en Odontología y cuidado de la salud oral. Diagnosticos salivales disponibles actualmente. [www.colgate profesional.com.gt](http://www.colgateprofesional.com.gt)
- 42) Moretti, E, et al. "Detección de anticuerpos para Chagas y Toxoplasmosis en Transudado mucoso oral". Acta Bioquím..Clin. Latinoam. Vol.38 no.2. [http// www.scielo.org.ar](http://www.scielo.org.ar).

43) Las pruebas de saliva se abren camino en la atención de rutina.

www.diariosalud.net/content7view/3490..

44) mL a Semana Epidemiológica en Guatemala. www.mspas.gob.gt

XIII. ANEXOS

ANEXO No. 1

Yo _____ por medio de la presente autorizo me sean tomadas muestras de orina y saliva para el estudio de investigación realizado por estudiante de la carrera de Química Biológica de la Universidad de San Carlos de Guatemala llamado "Determinación de anticuerpos contra el virus de hepatitis A mediante el método de ELISA utilizando orina y saliva como muestras clínicas".

Paciente

Asesor (Vo.Bo.)

Estudiante

ANEXO NO. 2

ANEXO NO. 3

ANEXO No. 4

Procedimiento equipo automatizado AxSym

Luego de colocar identificados los tres diferentes especímenes de los pacientes en las copas de muestras, fueron colocadas en segmentos para muestras utilizados por el sistema y colocados en el carrusel de muestras; se colocó el reactivo HAVAB-M dentro del carrusel de reactivos, se preparó el equipo y se programaron los controles positivo y negativo como las diferentes muestras; las que luego de dar la inicialización son pipeteadas en la secuencia siguiente:

Centro de Muestreo:

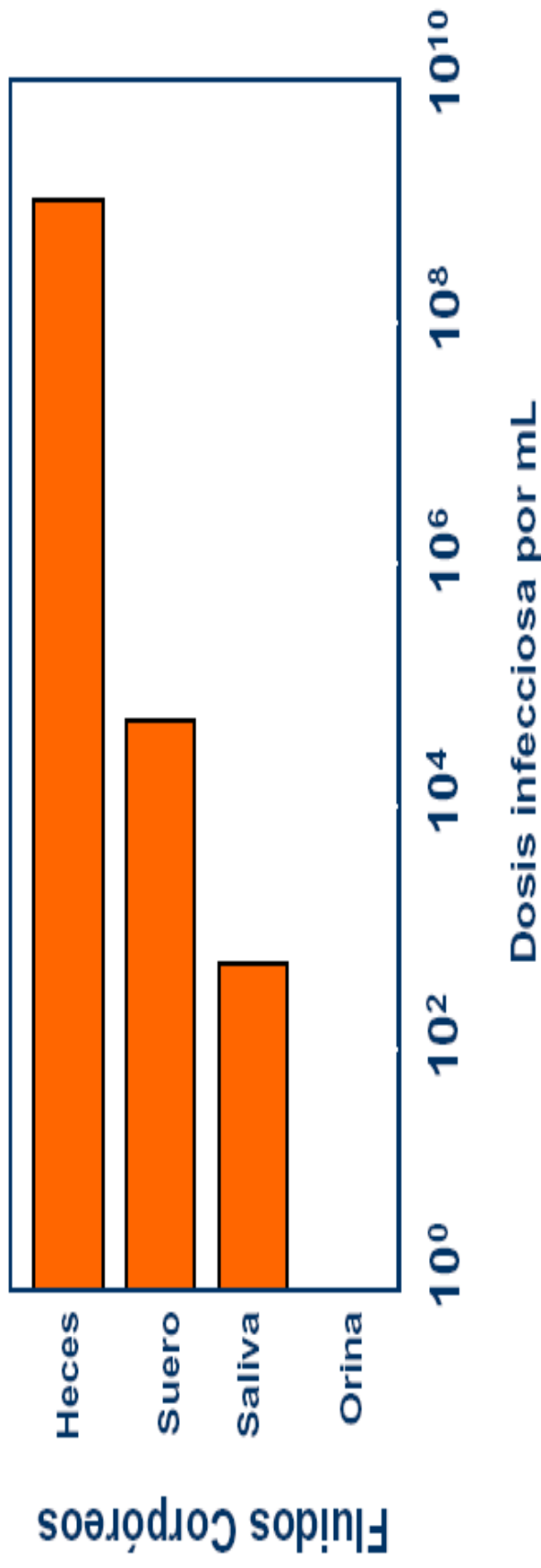
- Controles y muestras son medidos con una pipeta de muestreo y dispensados por ella dentro de varios pozos de la cubeta de reacción (CR); la que inmediatamente es transferida al centro de procesamiento.

Centro de Procesamiento:

- Celda de reacción automáticamente es transferida al centro de procesamiento donde sonda de proceso pipetea y dispensa el anticuerpo a IgM humano (cabra) cubrió las micropartículas, específicas para IgM humano (micro-cadena), se dispensa sobre la célula de la matriz, donde las micropartículas son adheridas irreversible a la matriz de la fibra de vidrio.

- La muestra diluida en diluyente del espécimen se dispensa sobre la celda matriz, los anticuerpos IgM presentes en la muestra y se unen a los anticuerpos anti IgM humanos (cabra) que encuentran revistiendo a las micropartículas.
- La solución de HAV (virus de la hepatitis A) se dispensa sobre la celda matriz. El HAV se une a cualquier anti IgM HAV presente en la muestra que ha unido a las micropartículas revestidas formando un complejo anticuerpo-antígeno.
- Anticuerpos monoclonales de ratón contra el virus de la hepatitis A conjugados a la fosfatasa alcalina se dispensan sobre la celda matriz y se unen a cualquier complejo anticuerpo-antígeno unido a la superficie de las micropartículas formando un complejo mayor anticuerpo-antígeno-anticuerpo
- La celda matriz se lava con solución 3 (“cell wash”) para quitar el material no adherido a las micropartículas
- El sustrato, 4-metilumbeliferilfosfato (MUP) se agrega y la conjugación de fosfatasa alcalina marcada cataliza el retiro del grupo de la fosfatasa del sustrato obteniendo el producto fluorescente, 4-metilumbeliferona (MU). Este producto fluorescente es medido por sistema óptica de MEIA

Concentración de VHA en Varios Fluidos Corpóreos



Fuente: Viral Hepatitis and Liver Disease 1984;9-22
J Infect Dis 1989;160:887-890

Evolución de Infección VHA

