

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE CASOS DE
HEPATITIS VIRAL AGUDA CAUSADA POR EL VIRUS DE
LA HEPATITIS E, MEDIANTE LA DETECCIÓN DE
MARCADORES SEROLÓGICOS: ESTUDIO PILOTO**

ELABORADO POR:

SILVIA EUGENIA MANCILLA RIVERA

ASESOR:

Dra. PATRICIA TERCEROS ALMANZA

(TESINA PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIATURA)

LA PAZ – BOLIVIA

2007

TABLA DE CONTENICO

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	2
	Generalidades.....	3
	Clasificación.....	3
	Estructura.....	3
	Organización genómica.....	4
	Eeplicación viral.....	7
	a) Adhesión y penetración.....	7
	b) replicación del genoma viral.....	7
	2. 6. Patogenia.....	8
	a) cuadro clínico.....	9
	b) manifestaciones clínicas.....	10
	2.7. Respuesta inmunitaria.....	10
	2.8. Diagnóstico.....	11.
	a) Diagnóstico clínico.....	12.
	b) Inmunomicroscopía electrónica (IME).....	13
	c) RT-PCR.....	13.
	d) Diagnóstico serológico.....	13
	Ensayo inmunoenzimatico (EIA).....	14.
	2.9. Epidemiología.....	16.
	2.10. Tratamiento.....	18
III.	Planteamiento del problema.....	19
IV.	Justificación.....	20

V.	Objetivos.....	21
5. 1.	Objetivo general.....	21
5. 2.	Objetivos específicos.....	21
VI.	Diseño metodológico.....	22
VII.	Material y métodos.....	23.
7.1.	Descripción del ámbito de estudio.....	23.
7.2.	Población en estudio.....	23
7.3.	Obtención de las muestras.....	24
7.4.	Selección de las muestras.....	24
7.5.	Detección de marcadores serológicos	26
a)	<i>Determinación de infección aguda por VHE.....</i>	<i>26.</i>
b)	<i>Determinación de memoria inmunológica para VHE.....</i>	<i>30.</i>
7.6	Control de calidad.....	34
7.5.	análisis estadístico.....	34
VII.	Resultados.....	35
VIII.	Discusión.....	46.
VIII.	Conclusiones.....	50
IX.	Perpectiva.....	51
X.	Recomendaciones.....	52
XI.	Bibliografía.....	52

I. INTRODUCCIÓN

El término de hepatitis viral indica enfermedad infecciosa e inflamatoria que afecta al hígado, ocasionando la destrucción de pequeñas zonas del tejido hepático. El cuadro sintomático varía desde una leve dolencia griposa hasta una deficiencia hepática grave ^(1, 31, 2, 16). Se reconocen en la actualidad seis agentes virales productores de hepatitis: el virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE) y virus de la hepatitis G (VHG). Existen además otros virus que pueden originar compromiso hepático, entre ellos Citomegalovirus (CMV), virus Epstein Barr (VEB) y Adenovirus (ADV), sin que este tejido constituya su principal órgano blanco ^(4, 16, 31).

Los virus hepatotróficos asociados a una transmisión fecal – oral, son hepatitis A (VHA) y virus de la hepatitis E (VHE), ambos responsables de infecciones agudas y auto limitantes. Si bien, se han descrito casos que indican que pueden ser responsables de hepatitis fulminante, las infecciones en la mayoría de los casos no llegan a evolucionar a un cuadro crónico. ^(1, 2, 8)

En una primera instancia el virus de la Hepatitis E fue conocido como agente causal de la hepatitis NoA, NoB, NoC. Recientemente se ha evidenciado que la infección esta en aumento mundialmente. Este virus de transmisión entérica, fue documentado por primera vez en Nueva Delhi (India) entre los años 50 y 60 como causa de una epidemia de hepatitis ⁽⁵⁾. Puede llegar a producir infecciones graves en adultos, con tasas de mortalidad del 1 al 2 %, en comparación con la hepatitis A que presenta una tasa de mortalidad en adultos menor al 0.4 % ⁽³⁾.

Los investigadores sospechan que un 20 % de la población mundial ha estado infectado con el virus de la hepatitis E (VHE) ⁽³⁾.

La seroprevalencia de anticuerpos anti – VHE se va incrementando con la edad, especialmente en áreas de alta endemicidad. La prevalencia es mucho mayor en países en desarrollo, esto debido a que es un agente de transmisión fecal –

oral, asociado directamente a condiciones inapropiadas de saneamiento. El diagnóstico es indirecto a través de la determinación de marcadores serológicos, mediante ensayo inmunoenzimático (EIA), basado en la detección de anticuerpos específicos de tipo IgM anti-VHE e IgG anti-VHE.

Actualmente en Bolivia son escasos los estudios que abordan la importancia de este agente viral como uno de los principales agentes causantes de hepatitis viral aguda. Es así que este estudio pretende contribuir con esta información, todo con el objetivo de orientar a un diagnóstico adecuado de esta patología.

II. ANTECEDENTES.

2. 1. GENERALIDADES.

El virus de la hepatitis E (VHE), es un virus de transmisión entérica, se transmite a través del consumo de agua y alimentos contaminados. Agente causal de hepatitis aguda y autolimitada. Se han registrado epidemias en la India, Asia, África, México y algunos lugares de Sud América ^(7, 9). El origen de la hepatitis E sin embargo no se conoce, se ha sugerido que la enfermedad es relativamente nueva pero que va tomando creciente importancia, por sus características remarcables de alta incidencia en adultos y de hepatitis fulminante con elevada mortalidad en mujeres gestantes ⁽³⁾.

A diferencia del virus de la hepatitis A (VHA) que es de alta endemicidad en nuestro país y que también es transmitido por vía fecal - oral, los casos agudos de hepatitis E se han descrito en forma esporádica. La fase aguda de la infección con el VHE presenta una respuesta inmune mediada por la inmunoglobulina de tipo IgM que es muy limitada y de corta duración, por lo que en la práctica clínica las investigaciones se basan en la determinación de la seroconversión de IgG anti-VHE por ser este un marcador de aparición precoz y de duración prolongada ⁽⁷⁾.

2. 2. CLASIFICACIÓN.

La clasificación del VHE no se encontraba completamente establecida. En una primera instancia a través de una caracterización parcial con el microscopio electrónico y debido a sus características (tamaño entre 27 a 32 nm) se lo relacionó a la familia *Picornaviridae*⁽¹⁶⁾. Sin embargo estudios de secuenciación y de organización genómica del VHE determinaron que era muy diferente a esta familia. Otros estudios subsecuentes indicaron que el virus, debido a sus características estructurales podía pertenecer a la familia *Caliciviridae* como un género separado ⁽⁶⁾. Según las últimas recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía Vírica, VHE se clasifica en una familia diferente llamada “virus HEV-like” ^(5, 3, 31). El análisis del ARN del virus muestra que este forma un grupo genéticamente diferente, siendo inclusive más cercano al virus de la Rubéola que a la familia de los *calicivirus* típicos ^(5, 3).

2. 3. ESTRUCTURA.

Los estudios de inmunomicroscopia electrónica (IME) describieron las características morfológicas. VHE es una partícula esférica, que presenta dimensiones que oscilan entre los 27 a 32nm de diámetro. Este virus no presenta envoltura lipídica, su cápside presenta simetría icosaédrica que recubre el genoma viral ^(10, 11, 4, 15, 53).

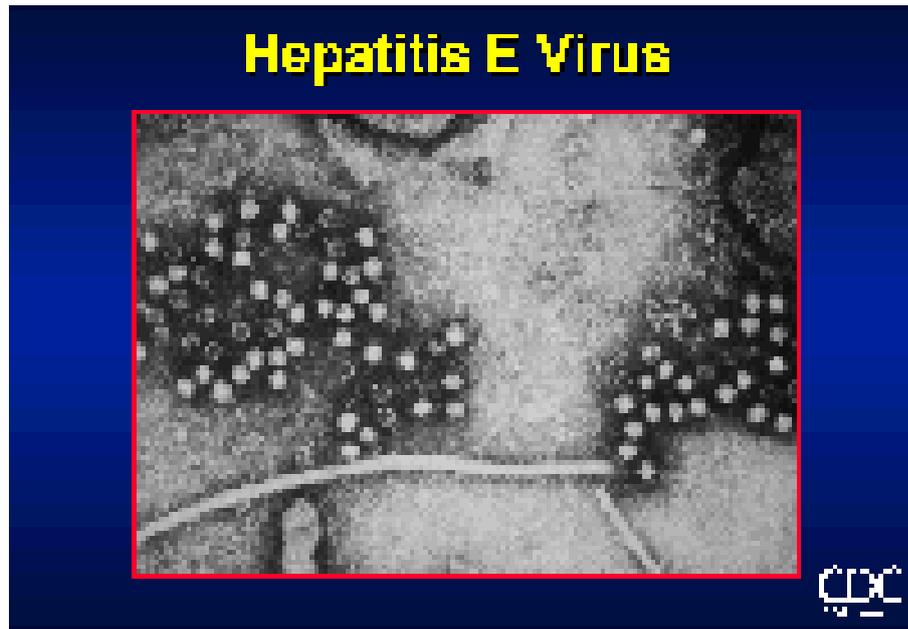


Figura 1. Virus de la Hepatitis E. Micrografía electrónica de partículas del virus (reproducido con autorización del CDC, Centers for Disease Control).

2.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA.

El genoma vírico se ha clonado y secuenciado a partir de fragmentos de VHE aislados en pacientes procedentes de diferentes zonas geográficas y muestran un alto grado de conservación genómica, tanto en nucleótidos como en aminoácidos⁽³¹⁾.

El genoma o material genético, está conformado por ARN monocatenario, de polaridad positiva, con un tamaño de 7.2 a 7.5 Kb de largo, el cual presenta tres marcos abiertos de lectura.^(10, 11, 4, 15, 31)

Las secuencias de las regiones no codificables (RNC) 5' y 3' son de 27 y 68 nucleótidos respectivamente y los genes considerados no estructurales se localizan en el extremo 5' y los estructurales en el extremo 3' del genoma⁽⁶⁾.

El primer marco abierto de lectura (MAL1) comienza 28 nucleótidos después del extremo 5' y se extiende hasta 5079 pares de bases (pb) antes de terminar en el nucleótido de la posición 5107, el (MAL2) comienza en el nucleótido de la posición 5147 y se extiende 1980 pb, el MAL3 comprende 369 pb y solapa al MAL 1 en su extremo 5' por un nucleótido y también solapa significativamente al MAL 2, así el virus de la hepatitis E tiene tres marcos abiertos de lectura que se solapan entre si durante su replicación, por lo tanto utiliza los tres marcos codificantes ^(6, 13).

Las funciones de las proteínas codificadas por los MAL del VHE no han sido demostradas directamente, pero sobre las bases de extensos análisis de secuencia del genoma se cree que el MAL 1 codifica las proteínas no estructurales (nsP), como una metiltransferasa, una proteasa, una ARN helicasa y una ARN polimerasa dependiente, se piensa que el MAL 2 (2 Kb) está localizado en la zona 3' y codifica la proteína mayor de la cápside vírica (72 KDa) y el MAL 3, que se solapa con los MAL1 y MAL2, codifica una fosfoproteína muy pequeña e inmunogénica de 123 aminoácidos asociada al citoesqueleto ^(17,13, 53).

El MAL 2 contiene una típica secuencia señal cercana a su extremo 5', inmediatamente seguida por una región de 300 nucleótidos, rica en codones de arginina y de carga altamente básica. Región que se cree que esta involucrada en la codificación genómica de la proteína de encapsidación, a su vez en esta misma región se codifica un epítipo inmunogénico principal.

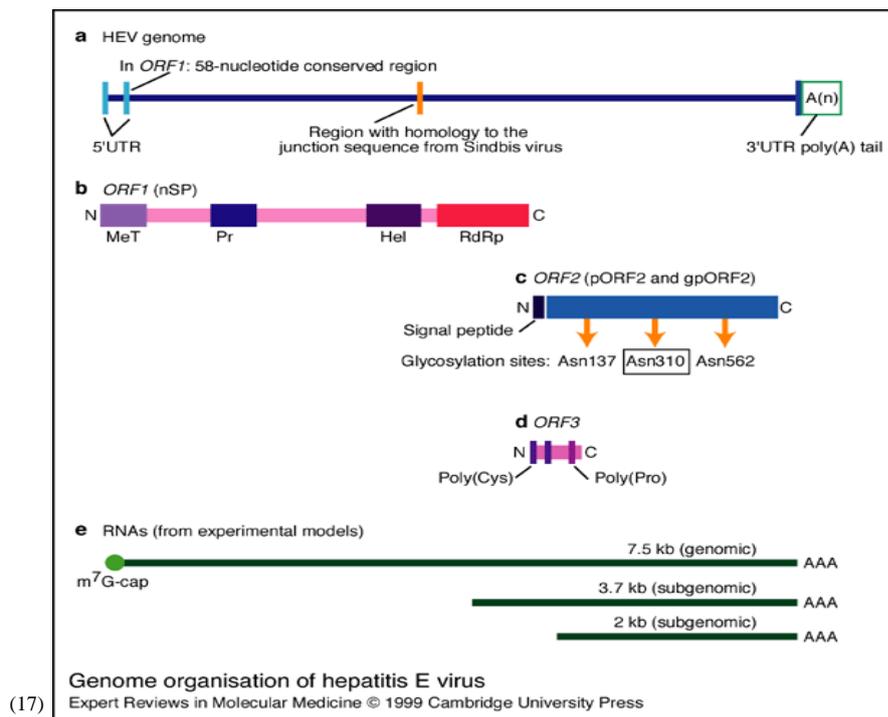


Figura 2 . Organización genómica del virus de la hepatitis E (VHE)

La proteína principal de la cápside codificada por MAL 2 es una glicoproteína de 88 KDa expresada intracelularmente, así como en la superficie celular y tiene la posibilidad de formar homo dímeros no covalentes, esta es sintetizada como una proteína precursora de MAL 2 (pMAL 2) la cual es glicosilada posteriormente (gpMAL 2), contiene una secuencia primaria de aminoácidos con tres sitios potenciales de glicosilación, que son conservados en todas las cepas del VHE ⁽¹⁷⁾.

El MAL 3 contiene una secuencia cerca de su extremo 5` que codifica una proteína de función desconocida, por otro lado también codifica un epítipo inmunogénico cerca de su extremo 3` ^(17, 13).

2.5. REPLICACIÓN VIRAL.

a) Adhesión y penetración.

El mecanismo de unión, entrada y desnudamiento del VHE no es conocido totalmente, pero se asume que comienza con la unión del virus a receptores específicos sobre los hepatocitos y posiblemente también en células del intestino, seguido de la internalización de las partículas virales y el desnudamiento de la cápside que permite la liberación del ARN viral ^(14,15).

b) Replicación del genoma viral.

Debido a la gran dificultad para el aislamiento viral en cultivo celular se conoce muy poco acerca de su ciclo replicativo. Se ha propuesto un modelo general de replicación y expresión génica de VHE, basado en las similitudes y en la homología de secuencias con otros virus ARN de polaridad positiva perfectamente caracterizados ^(31,6).

El ciclo replicativo se inicia con la expresión de los genes que codifican proteínas no estructurales. Estos productos génicos individuales se involucran por lo tanto en los estadios tempranos de la replicación viral ^(31,6).

El proceso comienza con la penetración del virus en la célula permisiva, el ARN vírico se traduce en el citoplasma de las células infectadas produciendo una proteína no estructural (nsP) codificada por el MAL1. Esta poliproteína contiene la replicasa vírica que estaría implicada en la síntesis de intermediarios replicativos de polaridad negativa a partir de la cadena genómica positiva ^(31,6).

Estos intermediarios, actúan como molde para la síntesis de copias adicionales de las cadenas genómicas, así como de cadenas positivas subgenómicas. Esas cadenas subgenómicas de ARN-VHE pueden ser traducidas en proteínas estructurales en los estadios tardíos de la replicación vírica.

c) Ensamblaje y liberación.

Las proteínas estructurales que forman la cápside engloban una copia del genoma vírico sintetizado para formar una partícula vírica ^(15, 6, 31), proceso llevado a cabo en el citoplasma de la célula infectada. La nueva progenie viral seguidamente es liberada.

2. 6. PATOGENIA.

La presentación clínica de la hepatitis E es indiferenciable con la hepatitis A desde el punto de vista clínico patológico. La infección se inicia con la ingestión principalmente de agua y también de alimentos contaminados con materias fecales provenientes de un individuo infectado. El VHE al ser capaz de iniciar la infección por ruta digestiva, llega a ser un virus resistente a ácidos y sales biliares, así como a la IgA secretora específica, que actúa como mecanismo de defensa inicial en el tracto digestivo. Se asume que la replicación viral se inicia en la células del tubo digestivo, seguidamente los virus tienen la capacidad de diseminarse hasta su órgano blanco que es el hígado a través de la vena porta, infectando a una gran proporción de hepatocitos. Una vez que alcanzan sus receptores específicos en la célula huésped se unen a ellos, para así penetrar en ella y llevar a cabo su ciclo replicativo y concluir con la producción y liberación de una nueva progenie viral. Todo esto sin causar daño citolítico directo pero induciendo una respuesta inmune celular responsable del daño hepático ^(13, 16).

Las evidencias sugieren que las manifestaciones clínicas y la evolución después del daño hepático agudo asociado con la hepatitis viral quedan determinados por la respuesta inmunológica del hospedero ⁽⁶⁾.

Las partículas virales son excretadas a través de la bilis al tubo digestivo, para ser eliminadas al medio externo junto con la materia fecal. Si bien la excreción

y la depuración viral se producen en unas 5 a 6 semanas, existen casos documentados de excreción prolongada. Se ha establecido que la mayor fracción de la progenie viral, durante la infección, es excretada en las heces, sin embargo también existe viremia que puede abarcar algunas semanas ⁽¹³⁾.

e) Cuadro clínico.

El cuadro clínico de hepatitis E, se presenta como una enfermedad típica de las hepatitis virales. Si bien es una infección aguda y autolimitada que no evoluciona a la cronicidad, presenta una alta mortalidad en mujeres gestantes y una alta tasa de infección entre adultos jóvenes y de edad media.

Sin embargo, la colestasis es un rango predominante en 20 % de los pacientes y debe ser diferenciada de la obstrucción de los grandes conductos biliares ⁽¹²⁾. El hígado parece ser el órgano diana para la infección y las manifestaciones extrahepáticas son raras.

El período de incubación fluctúa entre 26 – 42 días es decir de 3 – 7 semanas, donde los síntomas pueden empezar a presentarse seguido del período de incubación ^(12, 19). Se pueden encontrar partículas virales en las heces de los infectados a partir de la quinta o sexta semana después de la exposición por lo que la infectividad máxima ocurre durante la segunda mitad del período de incubación y se reduce drásticamente con la aparición de ictericia ⁽¹⁹⁾.

La fase preictérica o prodrómica puede durar entre 5 a 10 días donde existirá un predominio de los síntomas y signos gastrointestinales, tales como el dolor epigástrico, hiporexia, náuseas y vómitos que se reportan con frecuencia ⁽¹⁹⁾.

La fase ictérica comienza abruptamente con la aparición de ictericia, orina oscura (coluria) y heces de color de arcilla, el pico máximo lo alcanza la ictericia entre los 5 a 15 días y perdura 5 semanas ^(12, 6).

Cerca de la mitad de los pacientes desarrolla fiebre y dos tercios se quejan de artralgias, las pruebas de función hepática son indicadoras de necrosis hepática, estudios clínicos han demostrado que la elevación de los niveles de alanina aminotransferasa (ALAT) sérica coincide con el comienzo de la ictericia ⁽⁶⁾.

Hasta ahora no se ha reportado que la infección por VHE conduzca a la cronicidad. Sin embargo se ha descrito la persistencia de la Ig M anti-VHE de 21 meses en un caso y viremia prolongada (42 – 112 días) en 4 pacientes, con liberación fecal del virus hasta la séptima semana de la enfermedad, bastante tiempo después de la recuperación clínica y bioquímica. Estos hallazgos de liberación prolongada pueden ser responsables de la contaminación epidémica y esporádica y al mismo tiempo abren la posibilidad a una posible cronicidad de la infección la cual es dependiente de la respuesta inmunológica de cada individuo ⁽⁶⁾.

b) Manifestaciones clínicas.

Dentro de las manifestaciones clínicas se presentan ictericia, malestar en general, anorexia, fiebre, dolor abdominal, cefalea, vómitos, exantema y artralgias. Una vez que la enfermedad se auto limita se da la posterior desaparición de los síntomas y signos. El problema radica en las infecciones por el VHE cuando este infecta a mujeres embarazadas en las cuales puede ocasionar una hepatitis fulminante con altos niveles de mortalidad ^(20, 11).

c) Factores de riesgo

Edad: Las infecciones generalmente son asintomáticas en los niños, pero tiende a ser más severa en sujetos mayores y mujeres embarazadas.

Higiene: La hepatitis E llega a ser endémica en países en donde los estándares sanitarios y medidas de higiene son escasos, puesto que la transmisión del virus es principalmente por vía fecal-oral, las personas

están en riesgo si beben agua infectada, ingieren alimentos contaminados y se ponen en contacto con heces humanas infectadas.

Viajes: Las personas que normalmente viven en países no endémicos pueden infectarse con hepatitis E al viajar lugares si endémicos pudiendo ser fuente de nuevos brotes.

RESPUESTA INMUNITARIA.

En cuanto a la respuesta inmune que se monta frente a las infecciones por VHE puede ser de dos tipos humoral y celular. En la respuesta inmune de tipo humoral intervienen ambos tipos de anticuerpos, IgM e IgG anti-VHE los cuales se detectan en el curso de la enfermedad. La fase aguda de la infección con el VHE presenta una respuesta inmune mediada por la inmunoglobulina de clase IgM que es de corta duración. Esta aparece a las 2 semanas de la exposición al virus, hasta desaparecer aproximadamente 12 a 13 semanas después ^(31, 24). Los anticuerpos antivirales tipo IgG aparecen después de las IgM y su título se va incrementando desde la fase aguda hasta la fase de convalecencia, permaneciendo elevada de 1 a 4 años después. Por ello la determinación de los anticuerpos de clase IgM es útil para el diagnóstico de infección aguda. La presencia de IgG indica infección por el VHE, pero no determina si se trata de una infección reciente, sin embargo es de gran utilidad para estudios de seroprevalencia ⁽³¹⁾.

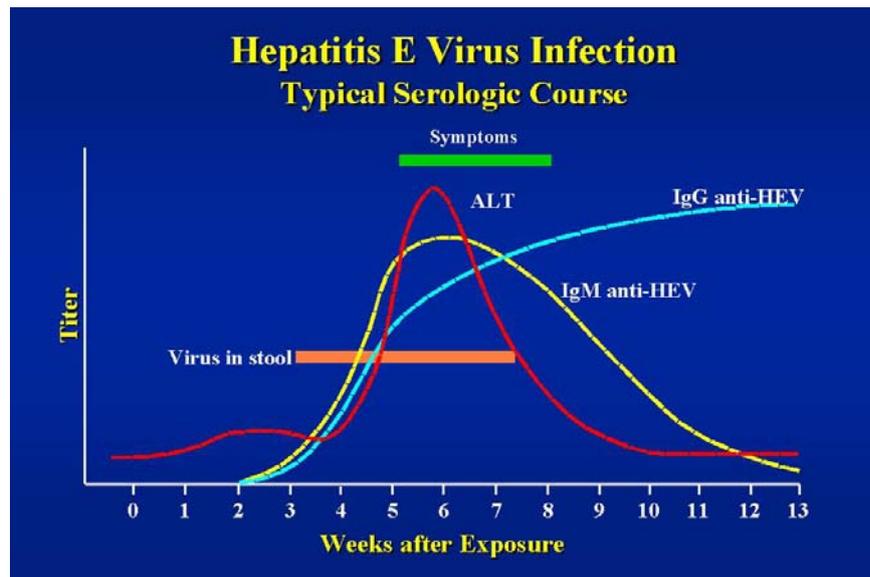


Figura 3. Curso serológico de la infección por el virus de la hepatitis E (VHE).

Estudios realizados, indican que es la respuesta inmune celular la que interviene en la patología hepática, ya que se encuentra mediada por la acción de las NK en una primera instancia y seguidamente linfocitos citotóxicos, esto origina la citólisis mediada por células de los hepatocitos infectados dando origen al daño hepático.

2.6. DIAGNÓSTICO.

Las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de la infección por el VHE, incluyen técnicas moleculares e inmunomicroscopía electrónica que detectan el virus en heces o en suero, también pruebas serológicas para la identificación de anticuerpos anti-VHE de clase IgM e IgG ^(6, 31).

Hasta hace un tiempo el método más utilizado para el diagnóstico de las infecciones por el VHE era la inmunomicroscopía electrónica (IME), el cual era problemático, poco sensible y solo disponible en centros especializados. La

secuenciación del genoma viral del VHE facilitaron un progreso significativo en el desarrollo de métodos para su identificación, la detección de secuencias genómicas amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa inversa llegó a ser una técnica molecular aplicable con alta sensibilidad y especificidad ⁽⁶⁾.

Actualmente el ensayo inmuenzimático constituye el método mas utilizado, debido a que es una técnica muy conveniente y fácilmente disponible para la detección de la IgM y la IgG anti-VHE , constituyendo una vía de diagnóstico indirecto de dichas infecciones ⁽³¹⁾.

a) Diagnóstico clínico.

Una primera etapa en el diagnóstico de hepatitis E lo constituye el estudio viral clínico, que generalmente tiene un carácter de orientación. Se basa principalmente en una evaluación del cuadro clínico, es decir la presencia de signos y síntomas asociados al virus de la hepatitis E. También son considerados antecedentes personales, familiares y la situación epidemiológica.

Dentro los síntomas y signos que son evaluados clínicamente en el diagnóstico de una hepatitis E, se encuentran la presencia de alteraciones intestinales como nauseas, vómitos, dolor abdominal, anorexia entre otros, por otro lado también se evalúa la presencia de ictericia y fiebre.

Al llevar a cabo una evaluación del funcionamiento e integridad hepática mediante la realización del perfil bioquímico hepático tales como la determinación de los niveles de bilirrubina, encontramos que estos marcadores están elevados con este tipo de infecciones, así como la alteración de la capacidad excretora del órgano. También los marcadores enzimáticos de hepatopatías (enzimas séricas) entre las principales transaminasas (ASAT o GOT aspartato amino transferasa y ALAT o GPT alanino amino transferasa) pueden llegar a elevarse de 20 a 40 veces como indicador de daño hepatocelular,

f) Inmunomicroscopía electrónica (IME).

La inmunomicroscopía electrónica se basa en la detección directa de partículas virales a partir de una muestra de heces fecales de pacientes infectados. La IME tiene un número de desventajas como medio de diagnóstico, debido a que requiere de un observador altamente entrenado, suficiente tiempo y grandes cantidades de antígeno y anticuerpo. Además, el virus con frecuencia, se libera en heces en forma degradada ⁽²¹⁾. De hecho, en un estudio que se realizó sobre la base de 2200 muestras de heces obtenidas de casos de hepatitis E en distintas regiones geográficas del mundo, sólo dos muestras contenían un número adecuado de partículas en forma de virus ⁽⁶⁾.

Por otro lado la IME electrónica llega a ser un método directo de diagnóstico que resulta útil solo en la etapa de excreción viral por el huésped.

c) RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa).

El ARN del VHE se detecta en heces mediante RT-PCR, una semana antes del inicio de la enfermedad y persiste 2 semanas más tarde. En algunos casos se ha detectado 52 días después del inicio de la enfermedad. El ARN-VHE se ha encontrado en suero en todos los pacientes en las primeras 2 semanas después del inicio de la enfermedad, con un rango de positividad de 4 a 16 semanas.

d) Diagnóstico serológico.

El proceso de exploración de la respuesta inmunológica, primordialmente de anticuerpos, constituyó por varias décadas una valiosa herramienta para investigar la presencia de procesos infecciosos tanto virales como bacterianos, conformando, la base operativa de la serología. Ciertamente, esta concepción en cuanto a la serología, no solo ha permanecido, sino se ha ampliado con la

introducción de adelantos tecnológicos, entre los cuales resaltan: el ensayo inmunoenzimático (EIA) ^(22,35).

Las infecciones virales por VHE recientes o pasadas en un individuo se pueden estudiar mediante la determinación de anticuerpos anti-VHE de tipo IgM o IgG utilizando el ensayo inmunoenzimático. Desde 1977 esta técnica, ha tomado un valor potencial como método de diagnóstico de enfermedades infecciosas, alcanzado una elevada sensibilidad, detectabilidad, especificidad, precisión y exactitud. Al mismo tiempo de requerir equipamiento relativamente barato y procedimientos técnicos rápidos y sencillos ^(21, 31,35).

En efecto, la respuesta inmune primaria, por lo tanto se caracteriza por un alza de la IgM anti-VHE llegando a ser el marcador de elección para el diagnóstico de una infección aguda. La IgG anti-VHE un marcador de respuesta inmune secundaria o de memoria inmunológica se lo utiliza en estudios seroepidemiológicos ^(6, 31).

Ensayo inmunoenzimático (EIA).

La técnica de EIA, recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos ^(22,35).

Fue concebida independientemente en 1971 en Suecia y Holanda, siendo aplicada posteriormente a la revelación y a la cuantificación de los más diversos tipos de sustancias presentes en líquidos orgánicos (antígenos, anticuerpos, hormonas, fármacos, etc.) ⁽²²⁾.

El área de sus aplicaciones médicas se ha expandido en forma sostenida, siendo utilizada como el primer sustituto de la técnica de Radioinmunoensayo, debido a su comparable sensibilidad, sin los problemas de manejo, eliminación y corto tiempo de vida de los materiales radioactivos, en la medición de

hormonas, inmunoglobulinas, antígenos y anticuerpos en infecciones bacterianas, micóticas, parasitarias o víricas ⁽³⁵⁾.

.La técnica de EIA se basa en el empleo de un soporte al cual se fija uno de los componentes de la reacción inmunológica (Ag o Ac); con el fin de investigar posteriormente el componente complementario en una determinada muestra. El complejo inmunológico así formado es enfrentado luego a las moléculas marcadas con una enzima capaces de reconocer al componente mas superficial del complejo, posteriormente se agrega un sustrato cromógeno para la enzima marcadora. La existencia de reacción inmunológica se demuestra midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante ^(22,35, 24, 25).

Como en el EIA el anticuerpo o el antígeno esta adsorbido a una fase sólida, este ensayo también es denominado ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) ^(22, 36).

Los métodos enzimáticos de acuerdo a la actividad enzimática se dividen en dos tipos: ELISA competitivo y no competitivo.

ELISA competitivo.- En este tipo de ensayo el anticuerpo de la muestra va competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrara a la enzima porque el conjugado ha sido remplazado por el anticuerpo presente en la muestra ^(22, 36, 37).

ELISA no competitivo.- Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo de la fase sólida, si una muestra es positiva se formara el complejo Ag-Ac y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color ^(22, 36, 37). Dentro de los no competitivos tenemos los directos que detectan antígenos y los indirectos que detectan anticuerpos. En el presente trabajo se utilizara la modalidad de ELISA no competitivo indirecto.

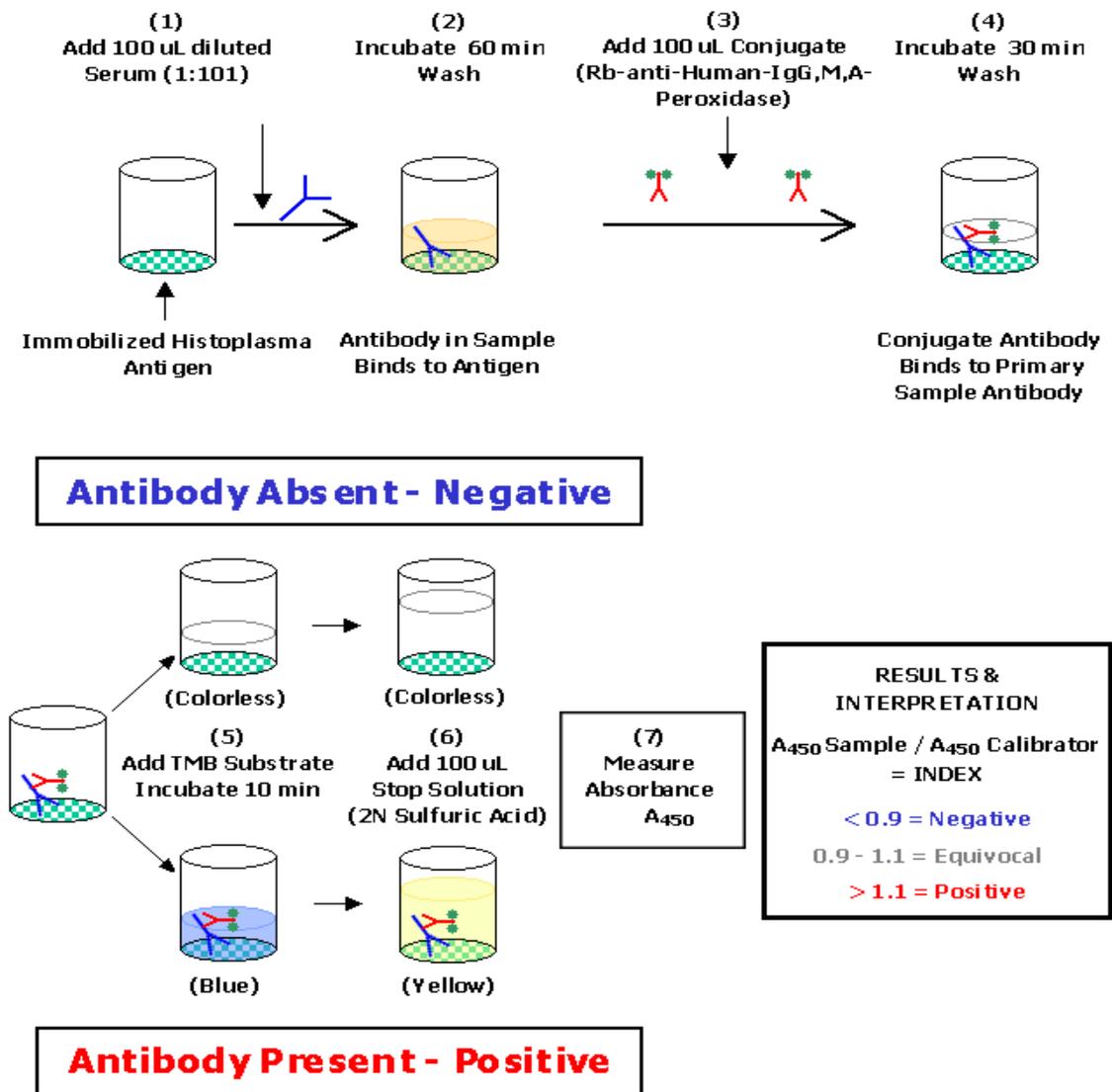


Figura 7. Representación esquemática del ELISA indirecto

2.9. EPIDEMIOLOGIA.

La hepatitis E se ha considerado tradicionalmente, junto a la hepatitis A, como una de las hepatitis de transmisión feco-hídrica mas importante. Con este patrón epidemiológico se reconoce que en los países en vías de desarrollo, puede ocasionar epidemias, a veces muy importantes, relacionadas con el consumo de agua contaminada. Sin embargo, el concepto de la enfermedad en

los países desarrollados está cambiando, pasando de ser considerada como una patología importada de regiones endémicas, preferentemente por viajeros a estas regiones, a definirla como una infección que podría tener un reservorio animal y un nivel de incidencia mucho más elevado de lo que pudiera parecer por el número de casos sintomáticos ⁽³¹⁾.

En la última mitad del siglo XIX a través de Europa y otras regiones de Australia ocurrían regularmente hepatitis epidémicas y endémicas en adultos con las características de una enfermedad transmitida entéricamente y diseminada por el agua. A partir de varios estudios realizados sobre anticuerpos anti-VHA se pudo inferir que estas hepatitis no eran causadas por este virus, de modo que muchas de las enfermedades parecidas a la hepatitis A que ocurrían en Europa y otros lugares antes de 1990 eran probablemente hepatitis E ⁽⁶⁾.

En 1980 se demostró por primera vez una epidemia de hepatitis viral que no era causada por el VHA si no por otro agente, ese fue un hito en la historia de la hepatitis E y se comenzó una búsqueda activa para la caracterización del agente etiológico.

La primera epidemia reportada de hepatitis E ocurrió en la Nueva Dehli-India en 1955 cuando 2999 casos de hepatitis icterica se identificaron después de la contaminación fecal de aguas de beber ^(6,32). También se han observado presuntas epidemias en la república de Kirgizia en la antigua Unión Soviética y en varios países de África y también en el continente Americano ⁽⁶⁾.

En si la infección por el VHE llega a ser endémica en el centro y sudeste de Asia. Varias epidemias de hepatitis E se han producido en Oriente medio, norte y oeste de Africa y en México ⁽³¹⁾. En el resto del mundo, la infección por el VHE se considera poco frecuente y se describe como restringida a personas que han viajado a zonas donde la enfermedad es endémica. Las epidemias de hepatitis E son de larga duración, afectando desde cientos a miles de personas y varían

desde brotes agudos a epidemias prolongadas que pueden durar hasta más de 1 año.

Durante estas epidemias, la proporción de población afectada varía desde un 1% a un 15%, siendo más frecuente los casos en adultos (3%-30%) que en niños (0,25% al 10%)^(15,16). Estas cifras pueden indicar que los niños presentan mayor frecuencia infecciones anictéricas o subclínicas. Las epidemias descritas han presentado una alta proporción de mortalidad entre embarazadas, alrededor del 20 a 25%^(31, 32).

No se ha reportado ningún brote de hepatitis E en los Estados Unidos, Canadá o en los países desarrollados de Europa y Asia, sin embargo, la enfermedad en estos países ha sido descrita principalmente como importada. Recientemente, aparecido casos muy recientes en Europa y Estados Unidos donde los pacientes afectados no documentaban la visita a lugares endémicos o de haber estado en contacto con personas provenientes de estas zonas. Pero no se debe descartar que en los últimos años la utilización combinada de técnicas serológicas y moleculares ha permitido comprobar una incidencia y prevalencia muy superiores a las previstas en los países desarrollados, encontrando su justificación en la posible existencia de un reservorio zoonótico entre los animales domésticos. De este modo se ha demostrado la infección del ganado porcino y su posible relación con los casos en humanos⁽³¹⁾.

En cuanto a Sudamérica algunos estudios realizados en Chile demuestran que a diferencia del virus hepatitis A (VHA), que es de alta endemicidad y que también es transmitido por vía fecal-oral, los casos agudos de hepatitis son menos frecuentes. Un estudio de prevalencia en donantes de sangre, realizado en distintas ciudades, muestran una presencia del anti-VHE IgG entre 4 y 7%, considerablemente más bajo que el VHA. (60,56). Pero sin descartar la presencia del VHE circulando en su medio.

Un estudio realizado en Bolivia en el año 1999 indica que el VHE circula en todos los ámbitos del territorio boliviano. La seroprevalencia de anticuerpos anti-VHE es en general, más alta que en otros países latinoamericanos alcanzando valores de 2 a 15% ⁽²⁴⁾.

2.10. TRATAMIENTO

Hasta el momento, no existe ningún tratamiento para la hepatitis E. Los únicos tratamientos que hay se ocupan de los síntomas, no de la enfermedad. Ningún tratamiento antiviral ha demostrado ser efectivo contra este virus en experimentos de laboratorio. Estudios preliminares en cultivos de células sugieren que el interferón alfa pueden inhibir la multiplicación del virus de la hepatitis E. Según Jameel, los posibles compuestos del virus que serían blanco del medicamento son algunas de sus enzimas, pero todavía se necesita una investigación más profunda para establecer este tratamiento.

La única cura es la prevención, que en los países en desarrollo requiere purificar el agua potable y mantener las aguas residuales y aguas no tratadas separadas de las fuentes de agua potable ^(17, 23, 6).

Desarrollo de una vacuna contra la hepatitis E

Actualmente, no existe una vacuna que evite la hepatitis E. Ni siquiera la inmunoglobulina preparada con plasma extraído de personas infectadas con hepatitis E es efectiva para evitar la enfermedad. Los estudios experimentales de vacunas contra la hepatitis E en animales, muestran que con ellas se reduce la infección de la hepatitis E, pero no evitan la eliminación del virus en las heces de animales inmunizados infectados. Hoy en día se está usando la ingeniería genética en busca de crear la vacuna contra este agente viral.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El virus de la hepatitis E (VHE) causa grandes brotes de hepatitis vírica aguda en países en vías de desarrollo, constituyendo un problema de salud pública que requiere atención prioritaria ya que la enfermedad es causa considerable de morbimortalidad en escala creciente. El virus de la hepatitis E (VHE) probablemente llega a ser el patógeno oportunista mejor descrito, ya que tanto el virus como la enfermedad pueden aparecer en cualquier lugar del mundo con frecuencias que varían entre las distintas regiones.

En Latinoamérica, la epidemiología de esta infección, parece seguir un patrón complejo asociado con la diversidad de climas y la heterogeneidad étnica y cultural de la población. En Centroamérica y Sud América se han documentado brotes y casos esporádicos de hepatitis E. Los datos epidemiológicos disponibles sugieren que este virus circula en ambas regiones, aunque aún no se habría evaluado sus repercusiones sanitarias.

La presentación clínica de las hepatitis por virus A y E es indiferenciable desde el punto de vista clínico y patológico. Sin embargo la infección por el VHE presenta una característica remarcable dada la prevalencia de alta mortalidad durante el embarazo. Aproximadamente un 25 % de las pacientes infectadas por el virus durante el tercer trimestre del embarazo mueren debido a una falla hepática fulminante de rápida evolución. En el resto de la población la tasa de hepatitis fulminante también es elevada alcanzando el 1 % de casos.

Por lo expuesto anteriormente el presente trabajo pretende determinar la frecuencia de hepatitis E mediante la detección de marcadores serológicos. Actualmente y debido a la limitada información acerca de este agente viral, la serología para hepatitis E no forma parte de la batería de pruebas solicitadas para el diagnóstico de hepatitis infecciosa. Hecho que enmascara la verdadera realidad acerca del patrón de circulación, lo que imposibilita un diagnóstico adecuado.

IV. JUSTIFICACIÓN.

El presente trabajo pretende determinar la frecuencia de circulación de casos de hepatitis viral causada por el virus de la hepatitis E. La carencia de información acerca de la biología y epidemiología de este virus, así como su asociación a patologías humanas y particularmente a las enfermedades transmitidas entéricamente, evidencian la necesidad de conocer la circulación de este agente infeccioso en nuestro medio. Mas aún debido a que aproximadamente un 25 % de pacientes infectadas durante el tercer trimestre del embarazo mueren debido a una falla hepática fulminante de rápida evolución, en el resto de la población la tasa de hepatitis fulminante también es elevada alcanzando el 1 % de casos.

Este estudio serológico contribuye en gran manera a cumplir este objetivo. La detección de anticuerpos ANTIVIRALES, permite realizar un diagnóstico preciso y rápido de la frecuencia de casos reactivos de hepatitis E. Esto permitirá obtener información preliminar acerca de la circulación de este agente viral en nuestro medio. Sensibilizar e informar al sector médico sobre su importancia como uno de los agentes virales mas importantes causante de hepatitis viral aguda.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Es necesaria la determinación de la frecuencia de casos de hepatitis causada por el virus de la hepatitis E mediante la detección de marcadores serológicos en la población en estudio?

VI. OBJETIVOS.

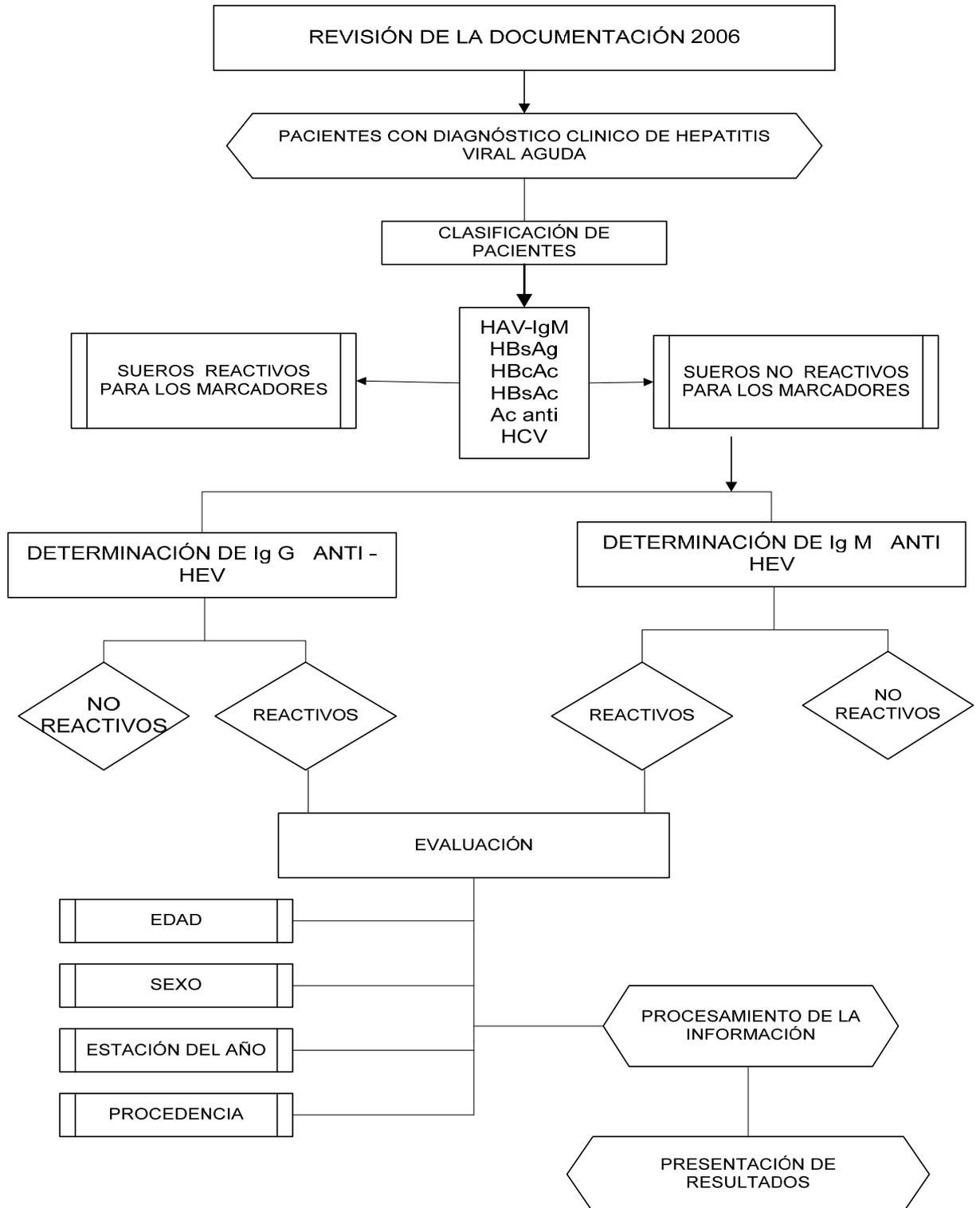
5.1. OBJETIVO GENERAL.

Establecer la frecuencia de casos de hepatitis E mediante la detección de marcadores serológicos en pacientes asistentes al Instituto SELADIS con diagnóstico clínico de hepatitis aguda de origen viral durante la gestión 2006.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la frecuencia de casos de hepatitis E aguda o activa mediante la detección del marcador IgM anti-Virus de la hepatitis E.
- Determinar la frecuencia de casos que presenten memoria inmunológica al virus de la hepatitis E mediante la detección del marcador IgG anti-virus de la Hepatitis E.
- Determinar la frecuencia de casos reactivos para los marcadores serológicos del virus de la hepatitis E según edad, sexo y procedencia.
- Evaluar la relación climática estacional con el número de casos de Hepatitis E de tipo agudo.

VI. DISEÑO METODOLOGICO.



6. 1 TIPO DE ESTUDIO.

El estudio es de tipo transversal, descriptivo, debido a que se realizó la determinación de infecciones por el virus de la hepatitis E mediante la determinación de los marcadores serológicos específicos: IgM anti-VHE e IgG anti-VHE a través de un ensayo inmunoenzimático indirecto.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁMBITO DE ESTUDIO.

El presente estudio se llevó a cabo en la unidad de Virología perteneciente al Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud SELADIS, ubicado en la ciudad de La Paz, zona de Miraflores (Avenida Saavedra N° 2224). Esta institución tiene la capacidad de prestar servicios clínicos en diferentes áreas, siendo precisamente el área de Virología encargada de realizar pruebas serológicas, detección de antígenos virales, genoma viral y actividad replicativa, para el diagnóstico de diferentes infecciones virales.

7.2. POBLACIÓN EN ESTUDIO.

La población está constituida por 123 pacientes de 1 a 88 años de edad, que acudieron al instituto SELADIS durante la gestión 2006, con diagnóstico clínico de hepatitis viral aguda.

a) *Criterios de Inclusión.*

- Pacientes con diagnóstico clínico de Hepatitis viral de tipo agudo asistentes al instituto SELADIS, gestión 2006.

b) Criterios de Exclusión.

- Pacientes reactivos al marcador IgM anti-VHA
- Pacientes reactivos a alguno de los marcadores serológicos de los virus de la Hepatitis B y C.

7.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de suero utilizadas en el estudio fueron obtenidas a partir de una toma de muestra de sangre venosa a cada paciente, bajo los criterios de buenas practicas de laboratorio. El suero fue obtenido por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos y almacenado a -20°C hasta el momento del análisis ^(16, 23, 35, 37).

7.6. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

La selección de los sueros con los que se trabajó en el presente estudio se lo llevó a cabo de la siguiente manera:

Revisión de documentación.- En una primera instancia se realizó una revisión de los registros de la gestión 2006, donde se encontraban documentados todos los pacientes que solicitaron los servicios de la unidad de virología. Los datos generales que se tomaron en cuenta fueron:

- Nombre completo del paciente.
- Sexo
- Edad
- Procedencia
- Fecha de asistencia

Los datos laboratoriales registrados fueron:

- Pruebas solicitadas.
- Absorbancia de la muestra.
- Validación de cada ensayo.

A partir de esta información, se elaboró un registro de pacientes con sus respectivos datos personales y el resultado de sus pruebas solicitadas que fueron incluidos en el estudio. Es decir, pacientes con diagnóstico clínico de hepatitis viral aguda, seronegativos para los marcadores de infección por virus de la hepatitis A, B y C, durante la gestión 2006.

Clasificación de los sueros.- De acuerdo al registro establecido previamente, se procedió a la selección de las muestras de suero que correspondían a los pacientes involucrados en la investigación. Todos los sueros se encontraban almacenados en la seroteca de la unidad, identificados y clasificados según el mes que fueron analizados. Con el objetivo de evitar confusiones el momento de la clasificación, todos los sueros incluidos en el estudio debían estar correctamente identificados con el nombre del paciente, fecha y código de laboratorio, caso contrario fueron desechados, bajo las normas de Bioseguridad y desecho de residuos biológicos. Las muestras una vez seleccionadas fueron recodificadas según el código establecido en el estudio, esto con el objetivo de contar con un registro propio de los sueros de trabajo.

Distribución y mantenimiento de los sueros.- Cada suero seleccionado fue distribuido en tres diferentes alícuotas, esto con el objetivo de evitar continuos ciclos de congelación y descongelación de las muestras. De acuerdo al volumen de cada muestra se distribuyó una cantidad mínima de 25 ul y máxima de 50ul, cada alícuota fue identificada para el análisis del un marcador y una alícuota restante para cualquier tipo de repetición de análisis. Todas las alícuotas debidamente identificadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su análisis ^(16, 23, 35, 37).

7.7. DETECCIÓN DE MARCADORES SEROLÓGICOS

b) Determinación de infección aguda por VHE.

Las infecciones agudas o activas por el virus de la hepatitis E, fueron detectadas mediante la determinación del marcador serológico de respuesta inmune primaria IgM anti-VHE. La determinación de esta inmunoglobulina se la realizó a través de la técnica de ensayo inmunoenzimático indirecto no competitivo ^(3, 8, 13, 35, 23 16), utilizando el set comercial marca ORGENICS importado desde Israel.

En el ensayo, los micropozos estaban sensibilizados con antígenos específicos del virus, los cuales eran péptidos antigénicos sintéticos basados en las secuencias de distintas regiones del genoma viral del VHE. Una vez adicionada la muestra de suero los anticuerpos tipo IgM anti-VHE interactúan con los antígenos formando el complejo (Ag-Ac). Seguidamente fue adicionado el conjugado (anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina IgM ligado a una enzima peroxidasa), el cual forma un segundo complejo inmune. Finalmente la adición del cromógeno/sustrato (tetrametilbenzidina/H₂O₂) permitió evidenciar la presencia de los complejos inmunes mediante la formación de un complejo coloreado, cuya intensidad de color fue directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgM anti VHE.

Previamente para evitar interferencias con anticuerpos IgG provenientes de la muestra se realizó un bloqueo directo de estos anticuerpos con un reactivo neutralizador, el cual interactuó con la muestra el momento de adicionar ambos al micropozo. ⁽³⁷⁾.

Procedimiento:

Nº	PROCEDIMIENTO	TEMPERATURA	DILUCIÓN	VOL/POZO	TIEMPO	OBSERVACIONES
1º	Todos los reactivos fueron atemperados a temperatura ambiente.	25 °C	----	---	---	---
2º	Adición del Neutralizador de IgG (buffer proteico)	25 °C	---	50 uL	---	Adicionado a todos los pozos para muestras y no para controles.
3º	Dilución de las muestras	25 ° c	1:101	100 ul	---	Adicionado a cada respectivo pozo
4º	Adición de controles	25 ° c	---	100 uL	---	Adicionado a sus respectivos pozos
5º	Incubación de los micropozos	37 ° c	---	---	1 hora	
6º	Lavado de la placa	25 ° c	---	300 ul	---	Se realizo un ciclo de 5 lavados.
7º	Dilución del conjugado	25 ° c	1:20	100 uL	---	Adicionado a todos los micropozos.
8º	Incubación De los micropozos	37 ° c	---	---	1 hora	---
9º	Lavado de la placa	25 ° c	---	300 ul	---	Se realizo un ciclo de 5 lavados.
10º	Adición del cromogeno/sustrato	25 ° c	---	100 uL	---	Fue adicionado a todos los pozos
11º	Incubación	25 ° c	---	---	20 min	Se realizo en oscuridad
12º	Adición de la solución de frenado	25° C	---	100 uL	---	Fue adicionado a todos los pozos

Tabla.1 Procedimiento de la determinación del marcador IgM anti-VHE:

Con la ayuda del lector de ELISA, se procedió a la lectura de la intensidad de color formado en medio ácido a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad de color fué interpretada como directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgM anti-VHE.

Componentes	Descripción
Reactivo neutralizador	Buffer proteico para la neutralización de anticuerpos IgG de las muestras.
Diluyente de muestra	Buffer proteico adicionado con Tween 20
Controles positivo	Suero humano con anticuerpos IgM anti-VHE
Controles negativo	Suero humano libre de anticuerpos IgM anti
Solución de lavad	Buffer fosfato y Tween 20
Conjugado	Anticuerpo policlonal anti-IgM humana ligada a enzima peroxidasa.
Diluyente de conjugado	Solución de buffer con albúmina sérica bobina y gentamicina como preservante.
Cromógeno/Sustrato	Tetrametibenzidina (TMB) y H ₂ O ₂
Solución de frenado	Solución de ácido sulfúrico 0,3 M.

Tabla.2 Reactivos utilizados para la determinación del marcador IgM anti-VHE:

Calculo de resultados.

Para la interpretación de los resultados se determinó el valor del Cut-off (línea de corte, valor umbral del ensayo), mediante la siguiente formula.

$$COV = CN + 0.250$$

Donde:

CN = Absorbancia del control negativo a 450 nm

0.250 = Factor proporcionado por el set.

Interpretación de resultados.

La interpretación de los resultados se lo llevo a cabo relacionando el valor de la absorbancia de cada muestra con el valor del cut-off, para lo cual se obtuvo el promedio de dos lecturas de absorbancia obtenidas por cada muestra.

- Si la absorbancia de la muestra es menor que el valor del cut-off es considerada no reactiva. Lo cual es indicativo de la ausencia de anticuerpos antivirales frente a VHE en la muestra o su concentración se encuentra por debajo del límite detectable.
- Si la absorbancia de la muestra es mayor o igual al valor del cut-off es considerada como reactiva. Lo que determina que el paciente esta cursando por una infección activa por el virus de la hepatitis E.

Criterios de validación para la prueba.

1. El valor de la absorbancia del control negativo a 450 nm de longitud de onda, debe ser menor a 0,200 para que la prueba sea aceptada, caso contrario el ensayo fue considerado no valido y debe repetirse la prueba.
2. El valor de la absorbancia del control positivo a 450 nm de longitud de onda, debe ser mayor a 0,500. Caso contrario el ensayo fue considerado no valido y debe repetirse la prueba.

b) *Determinación de memoria inmunológica para VHE.*

Las infecciones pasadas o memoria inmune frente a VHE fue establecida mediante la determinación del marcador serológico IgG anti-VHE. La determinación de esta inmunoglobulina se la realizó a través de la técnica de ensayo inmunoenzimático no competitivo indirecto ^(16, 8, 35, 29), para lo cual se recurrió al empleo del kit comercial marca ORGENICS importado de Israel y EQUIPAR importado desde Italia.

Los micropozos suministrados por el set se encuentran sensibilizados con péptidos antigénicos sintéticos de VHE, con determinantes antigénicos conservados para la unión específica de la inmunoglobulina de tipo IgG anti-VHE. Tras la adición del suero los anticuerpos específicos contra el virus; se unen con los antígenos para formar el complejo inmune (Ag-Ac). Seguidamente se adiciona el conjugado, que es una antiinmunoglobulina IgG humana ligada a la enzima peroxidasa. La formación de los complejos inmunes fue evidenciada mediante la formación de un complejo coloreado resultado de la actividad enzimática y la adición del cromógeno sustrato (TMB/H₂O₂), finalmente la reacción es detenida con una solución de parada (H₂SO₄). La formación de color fue medida en el espectrofotómetro.

Procedimiento:

Nº	PROCEDIMIENTO	TEMPERATURA	DILUCIÓN	VOL/POZO	TIEMPO	OBSERVACIONES
1º	Todos los reactivos fueron atemperados a temperatura ambiente.	25 °C	---	---	---	---
3º	Dilución de las muestras	25 ° c	1:101	100 ul	---	Adicionado a cada respectivo pozo
4º	Adición de controles	25 ° c	---	100 uL	---	Adicionado a sus respectivos pozos
5º	Incubación de los micropozos	37 ° c	---	---	1 hora	
6º	Lavado de la placa	25 ° c	---	300 ul	---	Se realizo un ciclo de 5 lavados.
7º	Dilución del conjugado	25 ° c	1:20	100 uL	---	Adiciono a todos los micropozos.
8º	Incubación De los micropozos	37 ° c	---	---	1 hora	---
9º	Lavado de la placa	25 ° c	---	300 ul	---	Se realizo un ciclo de 5 lavados.
10º	Adición del cromogeno/sustrato	25 ° c	---	100 uL	---	Fue adicionado a todos los pozos
11º	Incubación	25 ° c	---	---	20 min	Se realizo en oscuridad
12º	Adición de la solución de frenado	25° C	---	100 uL	---	Fue adicionado a todos los pozos

Tabla.3 Procedimiento de la determinación del marcador IgG anti-VHE:

Con la ayuda del lector de ELISA, se procedió a la lectura de la intensidad de color formado en medio ácido a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad de color fué interpretada como directamente proporcional a la concentración de anticuerpos IgG anti-VHE.

Componentes	Descripción
Diluyente de muestra	Buffer adicionado con Tween 20
Controles positivo	Suero humano con anticuerpos IgG anti-VHE
Controles negativo	Suero humano libre de anticuerpos IgG anti-VHE
Solución de lavad	Buffer fosfato y Tween 20
Conjugado	Anticuerpo policlonal anti-IgG humana ligada a enzima peroxidasa.
Diluyente de conjugado	Solución de buffer con albúmina sérica bobina y gentamicina como preservante.
Cromógeno/Sustrato	Tetrametibenzidina (TMB) y H ₂ O ₂
Solución de frenado	Solución de ácido sulfúrico 0,3 M.

Tabla.4 Reactivos utilizados para la determinación del marcador IgG anti-VHE

Calculo de resultados.

Para la interpretación de los resultados se obtuvo el valor del Cut-off mediante la formula:

SET ORGENICS:

$$COV = CN + 0.200$$

Donde:

CN = Absorbancia del control negativo a 450 nm

0.200 = Factor proporcionado por el SET

SET EQUIPAR:

$$COV = CN + 0.250$$

Donde:

CN = Absorbancia del control negativo a 450 nm

0.250 = Factor proporcionado por el SET

Interpretación de resultados.

La interpretación de los resultados se lo llevo a cabo relacionando el valor de la absorbancia de cada muestra con el valor del cut-off, para lo cual se obtuvo el promedio de dos lecturas de absorbancia obtenidas por cada muestra.

- Si la absorbancia de la muestra es menor que el valor del cut-off es considerada como negativa a la presencia del marcador IgG anti-VHE. Lo cual es indicativo de la ausencia de anticuerpos antivirales tipo IgG frente a VHE en la muestra o su concentración se encuentra por debajo del límite detectable.

- Si la absorbancia de la muestra es mayor que el valor del cut-off es considerada como positiva a la presencia del marcador IgG anti-VHE. Lo cual es indicativo de que el paciente ha cursado con la infección o se encuentra en fase convaleciente.

Criterios de validación para la prueba.**SET Organics:**

1. El valor de la absorbancia del control negativo, debe ser menor a 0.200 para que la prueba sea aceptada, caso contrario fue rechazada para una nueva realización.

2. El valor de la absorbancia del control positivo, debe ser mayor a 0.800, caso contrario el ensayo fue rechazado para una nueva realización.

SET EQUIPAR:

1. El valor de la absorbancia del control negativo a 450 nm de longitud de onda, debe ser menor a 0.200 para que la prueba sea validada, en caso contrario es rechazada para una nueva realización.
3. El valor de la absorbancia del control positivo a 450 nm de longitud de onda, debe ser mayor a 0.500 para que la prueba sea validada, en caso contrario es rechazada para una nueva realización.

7.6. Control de calidad.

El control de calidad adoptado fue precisamente, la utilización de controles provenientes del set denominados primarios, tanto positivos como negativos, suministrados por el kit comercial.

Del mismo modo fueron también utilizadas muestras no reactivas de pacientes con absorbancias conocidas, dichos controles fueron denominados controles secundarios.

7.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se los realizo con el empleo del programa Microsoft Excel.

VIII. RESULTADOS.

7.1. Determinación de la frecuencia de reactividad a los marcadores serológicos analizados para el virus de la hepatitis E.

De 123 pacientes involucrados en el estudio, los casos reactivos a la detección de marcadores serológicos para hepatitis E fue de 26% (n=32) pacientes reactivos y 74% (n=91) pacientes no reactivos a los marcadores estudiados (fig5).

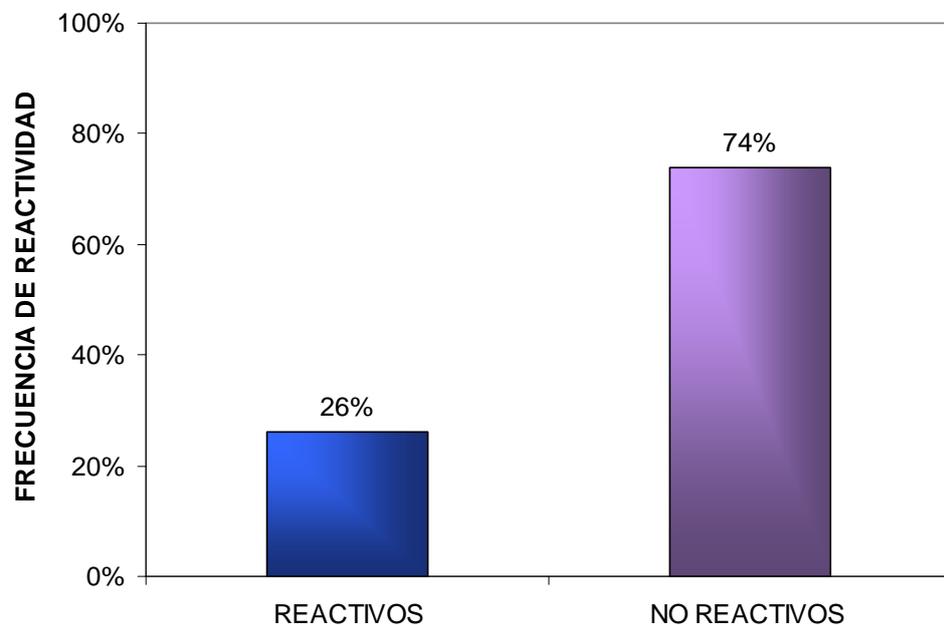


Figura 5: Frecuencia porcentual de casos reactivos a los marcadores serológicos de hepatitis E, en pacientes asistidos al instituto SELADIS, con diagnóstico clínico de hepatitis viral aguda correspondientes a la gestión 2006. Se evidenció 26% (n=32) de reactividad a alguno de los marcadores estudiados.

7.2. Determinación de la frecuencia de reactividad al marcador IgM anti Hepatitis E .

La determinación de frecuencia de reactividad al marcador serológico IgM anti-VHE, fue realizado en un total de 123 muestras. El estudio determinó 13 % (n=16) de casos reactivos y 87%(n= 107) casos no reactivos al marcador. (fig. 6)

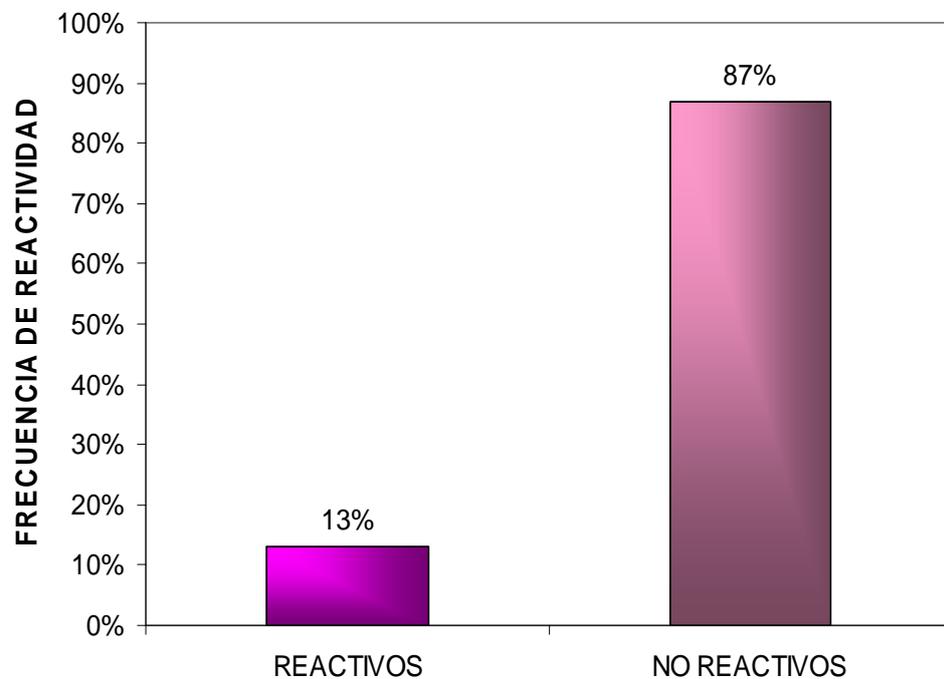


Figura 6: Frecuencia porcentual de reactividad al marcador de infección aguda IgM anti Hepatitis E. De 123 muestras analizadas 13% (n=16) fueron reactivas a este marcador.

7.3. Determinación de la frecuencia de reactividad al marcador IgG anti VHE .

De los 123 pacientes en estudio, 13% (n=16) corresponden a casos reactivos a este marcador, 86% (n=107) fueron no reactivos frente al marcador. (fig7)

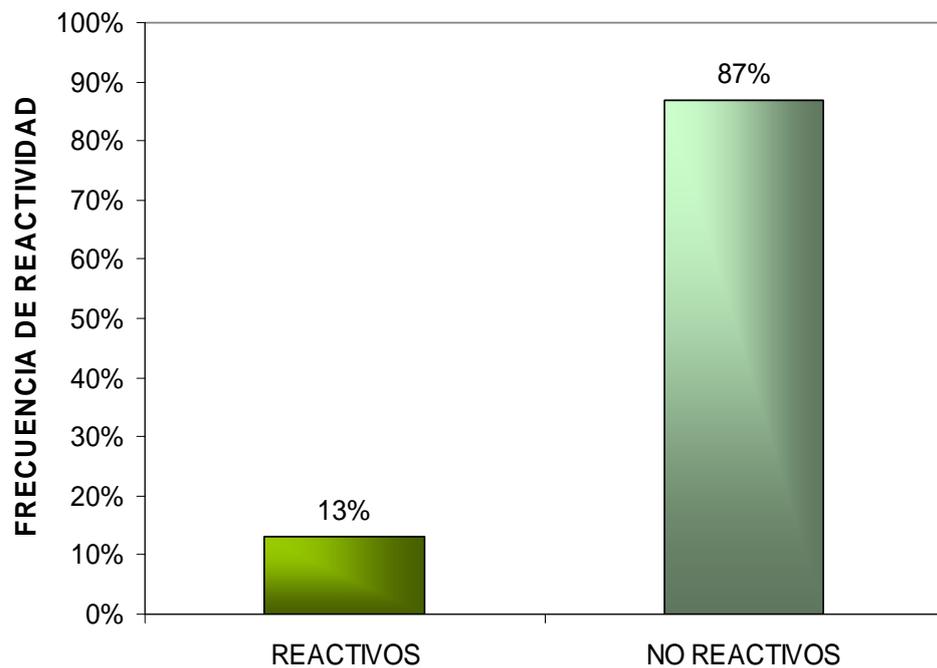


Figura 7. Frecuencia porcentual de reactividad al marcador IgG anti Hepatitis E. Se determinó 13% (n=16) muestras reactivas al marcador a partir de 123 analizadas.

7.4. Clasificación según fase de infección de acuerdo al perfil serológico.

La fase de infección fue clasificada de acuerdo al perfil serológico de cada paciente de acuerdo a la tabla:

FASE DE LA INFECCIÓN	PERFIL SEROLÓGICO	
<i>Infección aguda o activa</i>	IgM anti VHE reactivo	IgG anti VHE no reactivo
	IgM anti VHE reactivo	IgG anti VHE reactivo
<i>Infección pasada o memoria inmunológica</i>	IgM anti VHE no reactivo	IgG anti VHE reactivo
<i>Ausencia de infección</i>	IgM anti VHE no reactivo	IgG anti VHE no reactivo

Tabla 5. Clasificación según fase de infección de acuerdo al perfil serológico.

De las 32 muestras reactivas a los marcadores frente a VHE, 13% (n=16) eran casos de infección activa, reactivos al marcador IgM anti-VHE y no reactivos al marcador IgG anti-VHE o reactivos a ambos marcadores, 13% (n=16) solo eran reactivos al marcador IgG anti-VHE determinando infecciones pasadas, el resto de las muestras analizadas 74% (n=91) no eran reactivas a ninguno de los marcadores determinando ausencia de infección..(fig8)

CLASIFICACIÓN DE ADUERDO A PERFIL SEROLOGICO

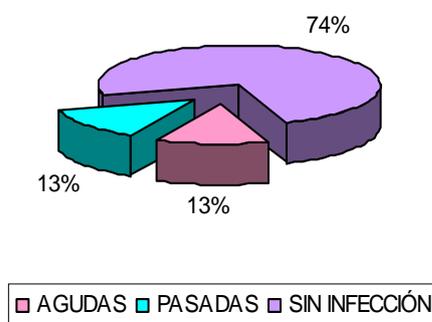


Figura 7: Clasificación porcentual de los casos reactivos de acuerdo al perfil serológico de hepatitis E. Se evidencia 13% (n=16) casos reactivos agudos

7.5. Determinación de la frecuencia de reactividad a los marcadores serológicos del virus de la hepatitis E, según edad.

Marcador IgM anti-VHE:

Según los resultados obtenidos, la frecuencia de reactividad, a la determinación del marcador de infección aguda IgM anti-VHE según edad, evidenció un porcentaje de reactividad de 74% (n=12) correspondiente a pacientes mayores a 21 años, 13% (n=2) a pacientes de 11 a 21 años, 13% (n=2) a pacientes de 6 a 10 años y 0% (n=0) a pacientes menores de 5 años de edad (Fig. 9)

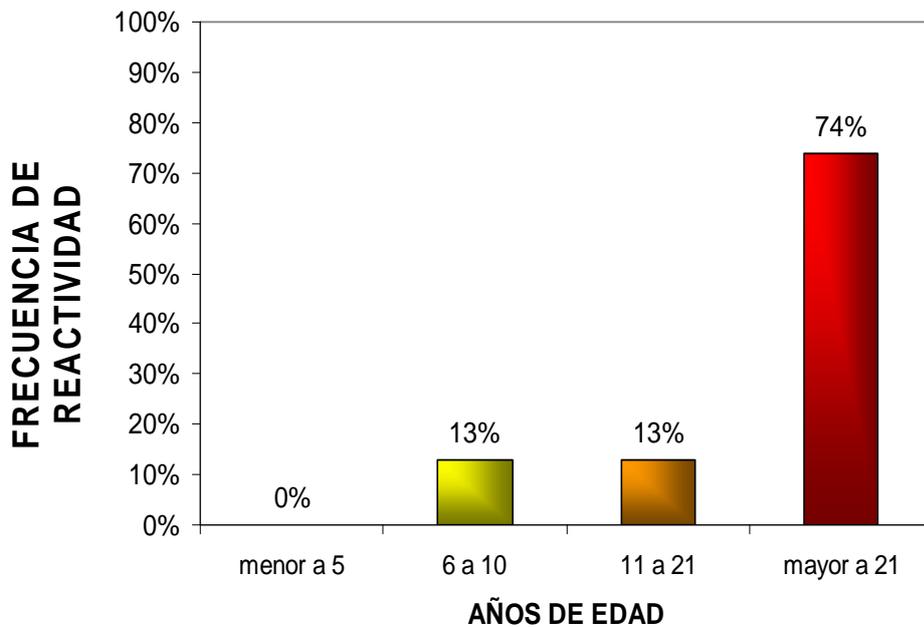


Figura 9: Frecuencia de casos reactivos para el marcador de infección aguda IgM anti Hepatitis E, según edad. De los 16 casos evidenciados de infección aguda por VHE, 74% (n=12) son mayores a 21 años, no se presenta ningún caso en infantes menores a cinco años.

Marcador IgG anti-VHE:

La frecuencia de reactividad del marcador de infección pasada o de inmunidad IgG anti-VHE según edad, fue de 81% (n=13) correspondiente a pacientes mayores de 21 años, 13% (n=2) correspondiente a pacientes de 11 a 21 años y 6% (n=1) correspondiente a pacientes de 6 a 10 años de edad (fig10)

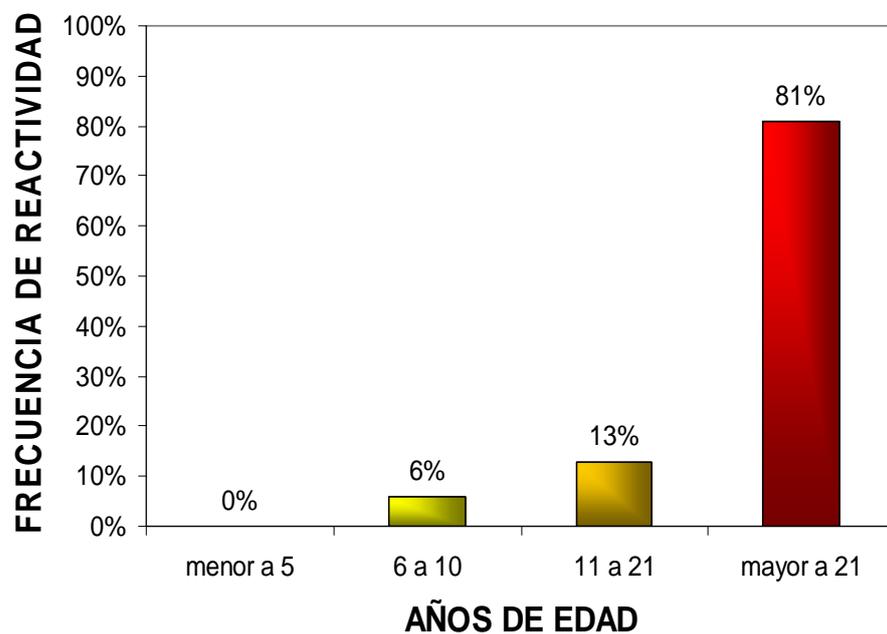


Figura 10: Frecuencia de casos reactivos para el marcador de infección pasada IgG anti Hepatitis E, según edad. Se evidenció que el 81% (n=13) de los casos reactivos pertenecen al grupo mayores de 21 años.

7.6. Determinación de la frecuencia de reactividad a los marcadores serológicos anti- virus de la hepatitis E, según sexo.

Marcador IgM anti-VHE:

La frecuencia de casos reactivos al virus de la hepatitis E, según sexo evidenció que el 50% (n=8) corresponde a pacientes del sexo femenino y 50% (n=8) corresponde a pacientes del sexo masculino.(fig11)

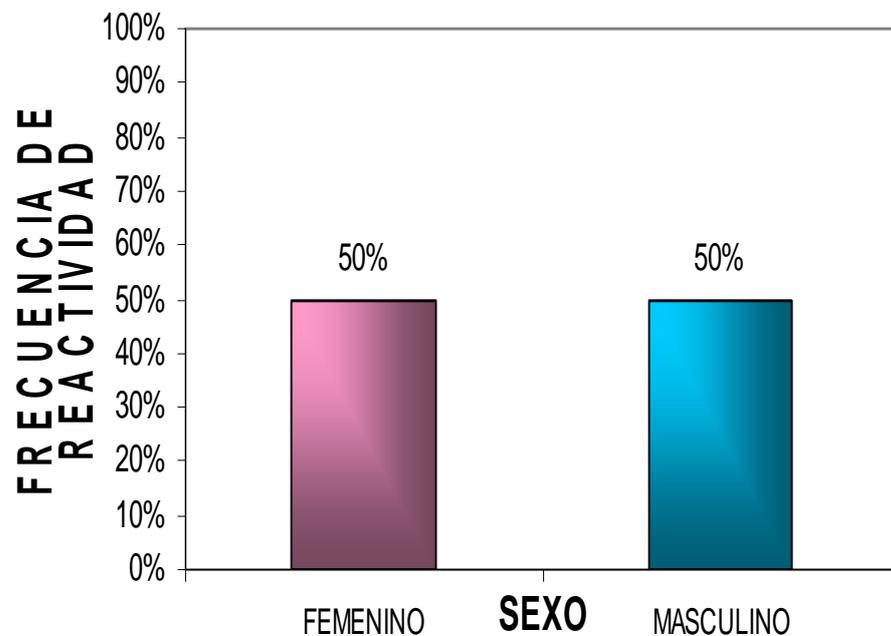


Figura 11: Frecuencia porcentual de casos reactivos según sexo, a la determinación del marcador de infección aguda IgM anti Hepatitis E.

Marcador IgG anti-VHE:

La frecuencia de reactividad del marcador IgG anti-VHE según sexo, remarco un porcentaje relativamente idéntico de reactividad en ambos casos, es decir 37% (n=6) para pacientes del género femenino y 63% (n=10) para pacientes del género masculino (fig12)

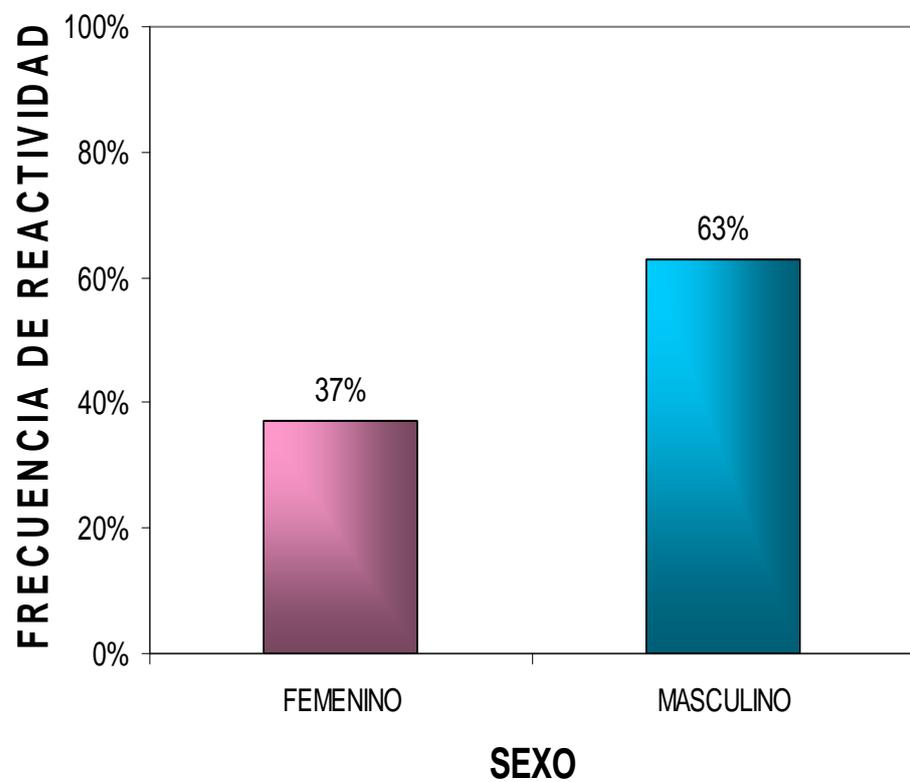


Figura 12: Frecuencia porcentual de casos reactivos según sexo, a la determinación del marcador de infección pasada o inmunidad IgG anti Hepatitis E.

7.7. Determinación de la frecuencia de reactividad a los marcadores serológicos anti- virus de la hepatitis E, según lugar de procedencia de los pacientes en estudio.

Marcador IgM anti-VHE:

La frecuencia de infecciones agudas por el virus de la hepatitis E mediante la determinación de reactividad al marcador IgM anti-VHE según lugar de procedencia, evidenció un porcentaje de reactividad de 69% (n=11) en pacientes procedentes de La Paz, 25% (n=4) de los casos reactivos residían en la ciudad de El Alto y 6% (n=1) procedentes de Oruro (Fig. 13)

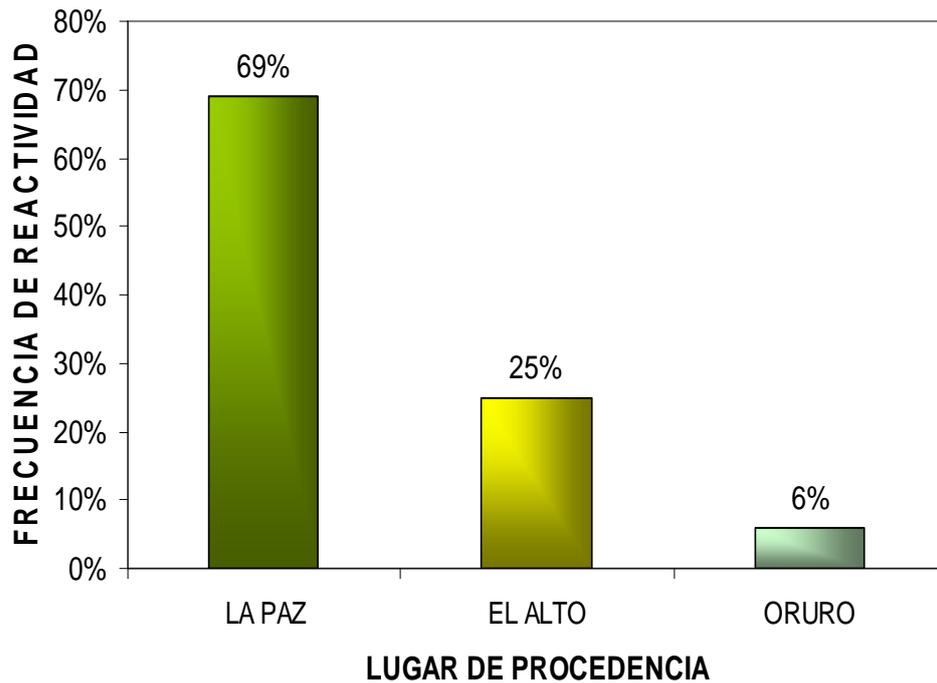


Figura 13: Frecuencia porcentual de casos reactivos, a la determinación del marcador de infección aguda IgM anti Hepatitis E, con relación al lugar de procedencia. El 69% (n=11) de los casos reactivos residen en la ciudad de La Paz.

Marcador IgG anti-VHE:

La frecuencia de reactividad al marcador IgG anti-VHE según lugar de procedencia fue: 75% (n=12) corresponden a pacientes procedentes de La Paz, 13% (n=2) residen en la ciudad de El Alto, 6% (n=1) en Oruro y 6% (n=1) con procedencia de Cochabamba. (Fig. 14)

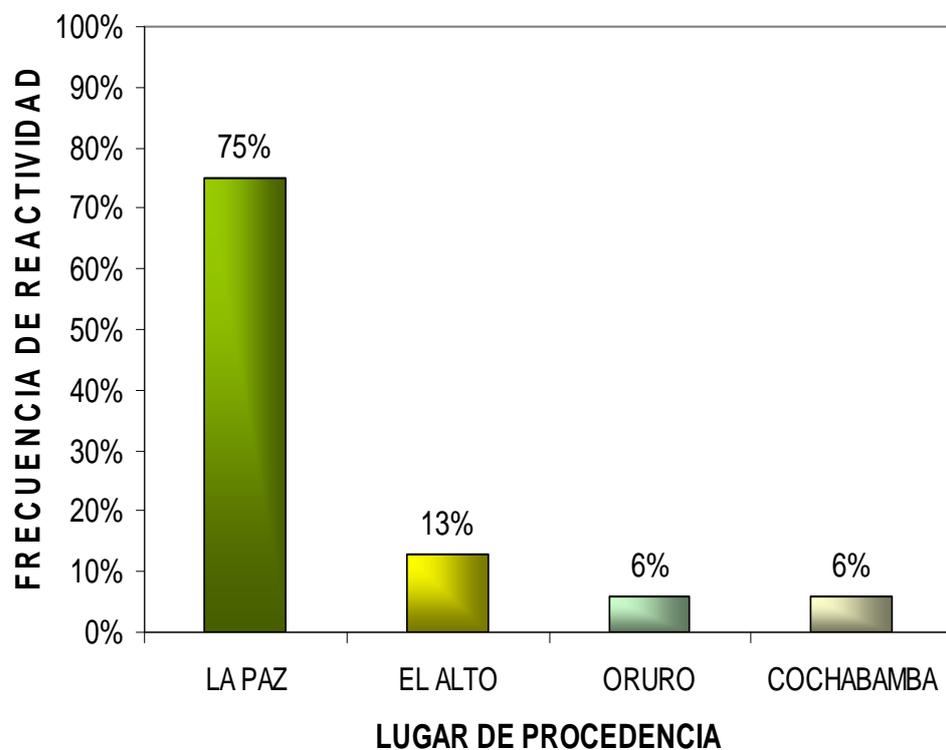


Figura 14: Frecuencia porcentual de casos reactivos, a la determinación del marcador de infección pasada o inmunidad IgG anti Hepatitis E, con relación al lugar de procedencia. El 75% (n=12) de los casos reactivos son pacientes residentes de la ciudad de La Paz.

7.8 Determinación de la frecuencia de reactividad al marcador serológico IgM anti- virus de la hepatitis E, según la estación climática del año.

La frecuencia de infecciones agudas de Hepatitis E con relación a la estación climática determinó los siguientes resultados: 44% (n=7) de casos de infección se presentaron en primavera, 12% (n=2) en verano, 19% (n=3) en otoño y 25% (n=4) en invierno. (Fig. 15)

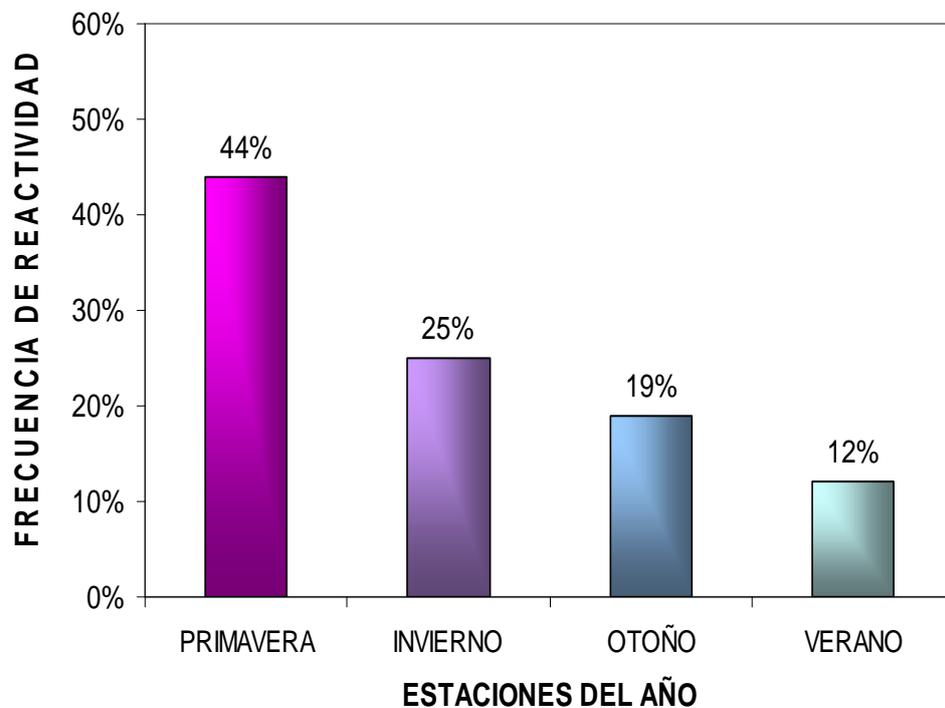


Figura 15: Frecuencia de casos reactivos, para la determinación del marcador de infección aguda IgM anti Hepatitis E, según la estación climática. De los 123 casos analizados el año 2006, 44% (n=7) de los casos reactivos se presentaron en primavera, el 19% (n=3) de los casos se presentaron en otoño.

VIII. DISCUSIÓN.

El presente trabajo contó con una población de 123 pacientes, que asistieron al instituto SELADIS durante la gestión 2006, con un diagnóstico clínico de hepatitis aguda de origen viral. El promedio de edad fue de 44 años (1 - 86 años). El estudio comprendía la clasificación de los casos no reactivos a los marcadores serológicos para Hepatitis A, B, C. y la determinación de marcadores serológicos IgM e IgG específicos contra el virus de la hepatitis E.

Una vez obtenidos los resultados se pudo determinar, una frecuencia de reactividad del 26% (n=32) para los marcadores estudiados. De los cuales 2 pacientes (2%) eran reactivos a los dos marcadores estudiados, 14 (11%) casos presentaban solo reactividad al marcador IgM anti-VHE y 16 (13%) eran solo reactivos al marcador IgG anti-VHE. Si bien el estudio fue realizado en un población con características bien determinadas, se estableció una alta frecuencia de infecciones por este virus.

Los resultados encontrados concuerdan con publicaciones posteriores, en los cuales se reporta prevalencias de hasta el 66% en poblaciones de la amazonía^(24, 25), nuestro estudio que se centra en una población urbana de la región del altiplano evidencia una frecuencia del 13% de casos agudos presentados solo año 2006 en pacientes que presentaban un cuadro agudo de hepatitis viral, sin considerar los casos asintomaticos, que pueden ser futuras fuentes de contaminación.

Un aspecto muy importante para considerar en el manejo del diagnostico laboratorial es la cinética de producción de los anticuerpos antivirales. De acuerdo a estudios de seguimiento de la respuesta serológica de tipo IgM en casos de infección aguda por el VHE, este marcador se detectaría, en algunos pacientes desde la segunda semana después de la exposición al virus,^(24, 25, 29, 31). Sin embargo, la tasa de detección de este marcador es decreciente después

de las 4 semanas post-infección ^(31, 24). Al contrario el anticuerpo tipo IgG aparece a partir de la segunda semana de infección con una concentración que puede ser detectable hasta cuatro años después ^(31, 29). De este modo su detección puede permitir un diagnóstico adecuado, evaluando la seroconversión del mismo o estableciendo la frecuencia de la infección en una población determinada, como marcador de infección pasada o memoria inmunológica.

A diferencia de otros países latinoamericanos, Bolivia presenta una prevalencia mayor, estudios realizados en otros países, por ejemplo Chile, reportan un descenso en su prevalencia, posiblemente debido al mejoramiento de las condiciones sanitarias, previniendo de esta manera la diseminación de este virus entérico ^(24, 25, 27).

La distribución del virus según la edad de los pacientes en estudio, mostró un alto porcentaje de reactividad al virus en pacientes mayores a 21 años, tanto en la determinación de infecciones agudas como pasadas. Datos que concuerdan con otros estudios, donde se pudo determinar una clara diferencia de reactividad entre niños y adultos, con cifras de 0,25% a 10% de frecuencia de infección en niños y de 3% a 30% en adultos ^(31, 25). Estas cifras pueden indicar que los niños presentan infecciones anictérica o subclínicas, por tanto son desapercibidas, pero llegan a ser una fuente potencial de contaminación ⁽³¹⁾.

De acuerdo a los reportes estudiados la prevalencia de anticuerpos anti-VHE se incrementa con la edad. Hecho que concuerda con los resultados encontrados, donde se determinó una mayor frecuencia de reactividad al marcador IgG anti-VHE, en el grupo mayor de 21 años con un 81% (n=13) de casos positivos. Sin embargo no se debe descartar la variabilidad de respuestas inmunes que puede existir, al evaluar brotes epidémicos de hepatitis en países subdesarrollados o brotes esporádicos en países desarrollados ⁽²⁵⁾.

Por otro lado la frecuencia de seroreactividad a los marcadores de infección por el virus de la hepatitis E con relación al sexo, determino una distribución uniforme entre varones y mujeres, tanto para el marcador de infección activa como para el de memoria inmunológica, para IgM el 50% (n=8) de los seropositivos eran del sexo femenino y 50% (n=8) del sexo masculino. Para IgG se observo un mínimo incremento de casos reactivos en el sexo masculino con un 63% (n=10). Sin embargo la mayor preocupación reside en la población femenina, específicamente en las mujeres embarazadas, que llegan a ser el grupo de huéspedes del virus mas afectado. Los índices de mortalidad son elevados, aproximadamente del 25%, esto debido a que la mayoría de los casos evoluciona a una falla hepática fulminante ⁽⁶⁾.

Estudios anteriores determinaron una distribución del virus de la hepatitis E, muy amplia en países subdesarrollados. Con brotes epidémicos agudos y de larga duración que pueden durar hasta un año ⁽²⁶⁾. La vía fecal oral es el modelo predominante de transmisión de la infección, la mayoría de las epidemias ocurridas se han relacionado con el consumo de aguas contaminadas. La contaminación se debe al continuo fecalismo al medio ambiente, costumbre que se realiza frecuentemente en las laderas de las ciudades, al mismo tiempo brotes van precedidos de fuertes lluvias e inundaciones que arrastran las heces y contaminan las fuentes de riego de cultivos.

Los resultados encontrados nos permiten inferir que VHE se encuentra distribuido en todo el territorio nacional, estudios anteriores reportaron su presencia en comunidades amazónicas y valles centrales del país, ⁽²⁴⁾, nuestro estudio reporta la presencia de este agente viral en dos departamentos de la región andina La Paz y Oruro. A la vez remarcar que existe una mayor distribución en áreas urbanas de nuestro país ⁽²⁴⁾, lo que evidencia las precarias condiciones de saneamiento en las ciudades, efecto que incrementa la transmisión del virus.

En cuanto a la presentación de infecciones agudas, según la estación climática, se pudo determinar mayores brotes en primavera e invierno y una relativa igualdad de brotes durante las restantes estaciones del año. Dadas las características climáticas de nuestra región, desde los meses de noviembre y diciembre comienzan las lluvias, que conllevan a inundaciones y arrastre de materia fecal, donde ocurre con mayor facilidad la contaminación de aguas. Esto explica en parte el fenómeno de la transmisión de hepatitis enteral. Lo mismo ocurre en los meses de invierno, no son exactamente meses lluviosos pero si con presencia de vientos que pueden ser un vector para la diseminación de partículas virales provenientes de las heces fecales de infectados,

Todos los casos presentaban un cuadro clínico de hepatitis aguda de origen viral, en el momento de la toma de muestra. Del mismo modo las órdenes médicas solicitaban la detección solo de marcadores serológicos de hepatitis A, B y C. El estudio seleccionó las muestras seronegativas para estos virus, detectando reactividad a los marcadores para VHE en 32 de los 123 pacientes seleccionados. Ese resultado evidencia la necesidad de incluir dichas pruebas dentro del perfil serológico para el diagnóstico de Hepatitis virales, que hasta ahora no ha sido tomado en cuenta.

La falta de conocimiento acerca del modo de transmisión, cuadro clínico y distribución del VHE, es una de las causas más importantes para no tomar en cuenta a este agente viral dentro de las Hepatitis virales que afectan en nuestro medio. Por otro lado muchos de los casos de Hepatitis E no diagnosticados, se deben a que este agente vírico tiene una misma vía de transmisión y clínica que el virus de la hepatitis A, el cual tiene una amplia distribución en nuestro país. Factor por el cual el personal médico se limita a investigar la presencia de este virus. El presente trabajo pretende actualizar los resultados encontrados en estudios anteriores y confirmar la presencia VHE como patógeno causante de hepatitis de tipo aguda de etiología viral.

Por otro lado las frecuencias de reactividad a VHE sugieren que este virus circula en forma considerable en nuestro medio. Lo cual justificaría realizar mas estudios que permitan detectar su circulación tomando en cuenta poblaciones más amplias y variadas en cuanto a distribución geográfica. Esto permitirá a su vez tener una visión mucho más amplia, conocer y evaluar diferentes parámetros que favorecerían a la propagación del virus, establecer, reformular o cambiar las políticas de prevención, todo con el objetivo de proteger a las poblaciones más susceptibles, niños y mujeres en edad reproductiva.

IX. CONCLUSIONES.

Se determinó la circulación del virus de la hepatitis E a través de la detección de marcadores serológicos específicos contra este virus, tanto de infección aguda (IgM anti-VHE) como de pasada (IgG anti-VHE), en la población en estudio durante la gestión 2006. Donde se llegó a determinar un porcentaje de reactividad al virus correspondiente al 26% en forma general para ambos marcadores.

Se pudo determinar una frecuencia de casos reactivos para el marcador de infección aguda o activa por el virus de la hepatitis E IgM anti-VHE, de 13% (n=16).

La determinación de la frecuencia de casos reactivos al marcador de infección pasada o memoria inmunológica frente al virus de la hepatitis E (IgG anti-VHE), fue del 13%, (n=16).

El grupo etareo más afectado son pacientes mayores de 21 años, lo cual fue demostrado tanto en los que resultaron seropositivos para el marcador IgM anti-VHE y el marcador IgG anti-VHE.

En cuanto a su distribución por género se determinó una distribución uniforme en ambos sexos con valores de 50% (n=8) de casos reactivos en mujeres y 50% (n=8) casos en varones para el marcador IgM anti-VHE y para el marcador IgG anti-VHE un 37% (n=6) casos en mujeres y 63% (n=10) en varones.

Según procedencia se reportaron casos reactivos a los marcadores estudiados en pacientes de diferentes regiones de nuestro territorio como ser Oruro, Cochabamba, La Paz y la ciudad de EL Alto.

De acuerdo a la estación climática se determino una mayor frecuencia de casos reactivos agudos durante las estaciones de primavera 44% (n=7), pero sin dejar a un lado considerables frecuencia de reactividad en las otras estaciones climáticas del año.

X. PERSPECTIVA.

- Realizar estudios mas amplios, incrementando la población en estudio de tal manera que se pueda determinar prevalencias e incidencias de hepatitis E en nuestro medio.

- Trabajar en los estudios siguientes con un número mayor de pacientes de diferente procedencia, con el fin de conocer la frecuencia de circulación del virus de la hepatitis E en todo el territorio Boliviano.

- Complementar el estudio serológico, con otras pruebas de laboratorio como el perfil hepático para determinar el daño del órgano afectado.

XI. RECOMENDACIONES.

En vista de los resultados obtenidos se recomienda la solicitud de las pruebas para la determinación de los marcadores específicos de hepatitis E y así llevar a cabo la determinación del perfil serológico completo de hepatitis de origen viral. De esta manera realizar un óptimo diagnóstico de infección, con el fin de no descartar cualquier caso posible de infección por este agente viral. Debido a que la presente investigación determinó la presencia de VHE en casos que tal vez estaban siendo obviados. Con esto poder contribuir al bienestar de la población afectada.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. DUBECCO, R, GINSBERG. **Microbiología**. 4^o Ed. Philadelphia.
2. BASUALDO, Juan Angel. **Microbiología Biomédica**. Atlante; Buenos Aires, 1996. p 823-826.
3. FAVOROV MO, ET AL. **Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United State**. *The journal of infectious diseases* 2000. Feb; 181; 449-455.
4. **VIRUSHEPATOTROPOS**. www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2006/medicina/10_virus_hepatotropos.
5. MARIA SILVINA MUMNES, SARA VLADIMIRSKY, LUCIO OTEGUI, LEONARDO BRAJTERMAN, RAÚL CASTRO, SONIA SOTO. **Caracterización molecular del virus de la hepatitis E en 3 casos de falla hepática fulminante en niños de Argentina**, *Acta Gastroenterol Latinoam* – Septiembre 2006; 36; 125-130.
6. ARIEL QUINTANA, GONZALES. **Virus de la hepatitis E**. Physiology Institute, Saarlandes University, Germany. *Rev Biomed* 2003; 14: 165-189.
7. BROOKS, Geo F; et al. **Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg**. 17ed, Manual Moderno; Mexico DF, 2002. p 501-517 CARMEN HURTADO H, GABRIELA MUÑOZ G, JAVIER BRAHM B. **Anti- VHE IgM en casos de infección por el virus hepatitis E**. *Revista médica de Chile*. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 645-647.
8. G. REINHARDT, M.V. Dr.med.vet.; H. IBARRA, Med.Ciruj.; S. RIEDEMANN1, T.M., M.V., I. VEGA, B.Q.. **Estudio serológico preliminar de hepatitis E en cerdos en Chile**. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. *Arch. med. vet.* vol.35 no.2 Valdivia Dec. 2003.

9. W.H.M. VAN DER POEL, M.P.G. KOOPMANS, A.M DE RODA HUSMAN **Hepatitis E-virus in Nederland.** Microbiologisch Laboratorium, Gezondheidsbescherming (MGB), RIVM, Bilthoven, Laboratorium voor Infectieziekten Screening (LIS). jaargang 13 nummer 8 (hepatitis E) Blz . 299-303.
10. EMERSON SU,PURCELL RH. **Hepatitis E virus.** National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes. Rev Med Virol, 2003 May-Jun; 13:145-54.
11. HEPATITIS E. aapredbook.aappublications.org/cgi/Spanish.
12. JOSÉ HALABE CHEREM, FELIPE ANGULO VARGUEZ. **Hepatitis Viral.** Departamento de medicina interna, Hospital de especialidades. CMN siglo XXI. Rev Fac Med UNAM. Vol 43 No 3 Mayo-Junio. 2000.
13. MATILDE GARCÍA CAAMAÑO. **Marcadores de hepatitis.** 25/09/2000 Guías Clínicas 2001.
14. JAMEEL S, ZAFRULLAH M, OZDENER MH, PANDA SK. **Expresión in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins.** J Virol 1996; 70: 207-16.
15. **Agentes virales asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos** www.bvsops.org.uy/pdf/agentes.
16. GARCIA, Maria, CABEZAS, Cesar, CALLAHAN, Johny. **Determinación de IgG y anticuerpos totales contra el Virus Dengue, en muestras obtenidas en papel filtro.** Rev. Perú. med. Exp. salud pública, ene/jul 1997,vol 14 p 45-49.
17. TAM AW, SMITH MM, GUERRA ME, HUANG CC,BRADLEY DW, FRY KE. **Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome.** Virology 1991; 185: 120-31
18. KHUROOMS. **Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post transfusion non-A, non-B Type.** Am J Med 1980; 68: 818-23

19. DIVISIÓN RECTORIA Y REGULACIÓN SANITARIA, DEPARTAMENTO DE SALUD DE LAS PERSONAS, DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA, PROGRAMA AMPLIADO DE INMUNIZACIONES. **Vigilancia y control de hepatitis A y hepatitis E.** Santiago, Chile, 12 de noviembre del 2006.
20. DR. JORGE VALDEZ RIOS. **Manejo de las hepatitis virales.**
21. BRADLEY DW, ANDJAPARIDZE A, COOK EH, MC CAUSTLAND KA, BALAYAN M, STELER H, ET AL. **Etiological agent of enterically transmitted non-A non-B hepatitis.** J Gen virol 1988; 69: 731-8.
22. GONZALES VEGAS, VIDAL RODRIGUEZ LEMOINE, LOURDES YERO. **Manual de métodos en inmunodiagnóstico,** p17-19, 197 – 199.
23. DR. LÁZARO MENA LOPEZ, DR. CIRO NUÑEZ MESA, DRA. NANCY PEREZ CABARCO, DR. JOSE FERNANDEZ ESTRADA. **Influencia de la temperatura, tiempo de conservación y valor absoluto de las muestras de suero en los resultados de cuantificación de antitoxina tetánica.** banco provincial de sangre, planta de hemoderivados.
24. PILAR LEÓN, EVARISTI VENEGAS, LORETO BENGOCHEA, ERNESTO ROJAS, JOSE LOPEZ, CONSUELO ELOLA. **Prevalencia de las infecciones por virus de la hepatitis B, C, D y E el Bolivia.** Rev.Panam Salud Publica v.5 n.3 Washington Mar. 1999.
25. HUMBERTO IBARRA V, STELLA RIEDEMANN G^A, CLAUDIO TOLEDO A. **Seguimientos de anticuerpos contra hepatitis A y E en una cohorte de niños de bajo nivel socioeconómico.** Rev. méd. Chile v.134 n.2 Santiago feb. 2006.
26. Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T. . **Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus.** 1997
27. HUMBERTO IBARRA V, STELLA RIEDEMANN, FREDDY SIEGEL G, CLAUDIO TOLEDO A, GERMÁN REINHARDT .**Hepatitis aguda por**

- virus A, E y no A-E en adultos chilenos a fines de los años 90.** Rev. méd. Chile vol.129 n.5 Santiago May 2001.
28. HÉCTOR RUBÉN HERNÁNDEZ GARCÉS¹ Y RENÉ F. ESPINOSA ÁLVAREZ. **Hepatitis viral aguda.** Rev Cubana Med Gen Integr 1998;14(5):484-93.
29. JUAN J. PICAZO, ANTONIO FUERTES ORTIZ DE URBIA, PILAR LEÓNREGA. **SEROLOGÍA DE LAS HEPATITIS VÍRICAS.1993**
30. CARMEN HURTADO H, GABRIELA MUÑOZ G, JAVIER BRAHM B. **Anti- VHE IgM en casos de infección por el virus hepatitis E.** Revista médica de Chile. Rev Méd Chile 2005; 133: 645-647.
31. MANUEL RORIGUEZ IGLESIAS, MARIA T. PEREZ GRACIA. **Nuevos conceptos sobre el virus de la hepatitis E y su importancia creciente en los países desarrollados.** Hospital Universitario de Puerto Real, Universidad Cadiz, Segundo Departamento de Atención Sanitaria. 2003: 105-112.
32. KUMAR S, RATHO R K, CHAWLA Y K, CHAKRABORTI A. **Virological investigation of a hepatitis E epidemic in North India.** Singapore Med J 2006; 47(9) : 769.
33. **Hepatitis E virus: a global view of its seroepidemiology and transmission pattern.** Trop Gastroenterol,1997Apr-Jun;18:45-9
34. PEÑA, A. **Hepatitis viral aguda.** Rev. chil. pediatr. v.73 n.2 Santiago mar. 2002.
35. DR. LÁZARO MENA LOPEZ, DR. CIRO NUÑEZ MESA, DRA. NANCY PEREZ CABARCO, DR. JOSE FERNANDEZ ESTRADA, LIC. RAFAEL MUÑOZ HERNANDEZ, LIZ. LESTER LOPEZ MOLINARY. **Valoración de la titulación de anticuerpos antitetánicos por umELISA en donantes especiales. Banco de sangre** Provincial de Camaguey.
36. CRISTHOPHER DONATS CRUZ MALPIZA. **Estandarización de la prueba de ensayo inmunoenzimatico para la detección de**

anticuerpos IgG en sueros humanos para el VPF. Universidad nacional Mayor de San Marcos. 2001

37. MORETTI, EDGARDO, BASSO, BEATRIZ, GIL, PATRICIA. **Detección de anticuerpos para chagas y toxoplasmosis em trasudado mucoso oral.** Acta Bioquim. Clin latinoam, mar/jun 2004, vol 38,p 159-163.

