

Avances en la hepatitis viral

Dr. Simón Beker G

Centro Médico de Caracas

La hepatitis viral es una enfermedad cuya existencia se describe desde hace varios siglos (ictericia), pero, reconocida desde el punto de vista epidémico desde fines de 1800. En la primera parte de este siglo, logran diferenciarse los dos tipos de hepatitis: infecciosas y sérica. Desde 1950 hasta los actuales momentos el progreso en el conocimiento ha sido tan extraordinario, que ha permitido estimular a los clínicos, a los investigadores en ciencias básicas, a los epidemiólogos y a los patólogos en profundizar esta entidad nosológica. Con el desarrollo de la microscopía electrónica, la medicina molecular, la genética, la inmunología, los avances en el campo de la epidemiología, el desarrollo de mecanismos de prevención con vacunas y los primeros conocimientos sobre tratamiento de enfermedades crónicas producidas por los virus, han permitido diferenciar diversos tipos de virus hepatotrópicos y otros que todavía se sabe que faltan, abriendo la posibilidad de controlar para el próximo siglo este problema de salud pública no sólo en escala mundial, sino también a nivel regional sobretodo en áreas donde el subdesarrollo no ha permitido todavía mejorar las condiciones de vida y de enfermedades como la hepatitis viral.

Hasta la actualidad se han logrado identificar cinco virus de las hepatitis y además se ha llegado a determinar serológicamente cada uno de ellos: tipo A, tipo B, tipo C, tipo D y tipo E (Cuadro 1). Existen evidencias epidemiológicas consistentes de la posibilidad de un sexto virus transmitido por vía parenteral (F?).

El virus de la hepatitis A, es un RNA virus, que pertenece a la familia Picornaviridae, casi exclusivamente transmitido por vía oro-fecal, interpersonal, típicamente ocurre en la infancia y a menudo no es posible diagnosticarla debido al curso anictérico. Existen países como los Estados Unidos con una prevalencia baja, lo que se traduce en una población más susceptible (1). En Venezuela la prevalencia es alta (>90% en adultos de áreas marginales) y por lo tanto con una población menos susceptible (2). La presencia de anti-HAV IgG es indicativa de inmunidad. Los viajeros internacionales hacia áreas en-

démicas con ausencia de este anticuerpo deben inmunizarse profilácticamente con gamma-globulina estándar, confiriendo un 85% de protección y, con una duración hasta de 6 meses. Una vacuna con virus atenuados y/o producida por ingeniería genética (recombinante) se ha desarrollado y se está empezando a autorizar su uso (Europa, Estados Unidos) y tiene una eficacia protectora del 94-100% (3). En Venezuela se espera su autorización para comenzar a inmunizar en la población infantil, ya que en población adulta marginal generalmente han adquirido inmunidad por haber pasado la enfermedad asintomática o discreta. Las vacunas son seguras, inmunogénicas y efectivas.

La hepatitis por virus A es una enfermedad auto-limitada, pero ocasionalmente puede evolucionar hacia una hepatitis fulminante. Manifestaciones atípicas de la enfermedad incluyen colestasis intrahepática prolongada, recaídas y complejos inmunes extrahepáticos, que terminan resolviéndose espontáneamente. La detección del HAV-RNA por reacción en cadena de polimerasa (RCP), o, "polymerase chain reaction" (PCR) demuestra la presencia de virus en las heces y en el suero durante las recaídas (4).

El virus de la hepatitis B es un DNA virus, de la familia Hepadnaviridae, que es transmitido por vía perinatal, parenteral y sexual, pero no por la vía oro-fecal.

Aproximadamente 5-10% de los casos agudos evolucionan hacia hepatitis crónicas que generalmente progresan hacia una cirrosis hepática. El riesgo del desarrollo de carcinoma hepatocelular es alto entre los pacientes con cirrosis. La posibilidad de evolución de una hepatitis fulminante B es aproximadamente del 1% entre los casos agudos ictericos (5). La patogenia de la hepatitis producida por el virus B incluye ciertos factores: el virus de la hepatitis B no es directamente citopático y, la necrosis hepatocelular que se desarrolla es el resultado de una respuesta inmune a la replicación viral. Los linfocitos citotóxicos T reconocen tanto a los receptores de histocompatibilidad como a los receptores antigénicos core del virus B en la membrana de la célula

BEKER S

Cuadro 1

Características diferenciales de los diferentes tipos de hepatitis virales (5)

	Hepatitis A	Hepatitis B	Hepatitis C	Hepatitis D	Hepatitis E
Virus	ARN	ADN	ARN	ARN	ARN
Período incubación	15-45 (30)	28-160 (75)	15-160 (50)	21-140 (35?)	14-65 (42)
Severidad fase aguda	Moderada	Moderada/severa	Moderada	Moderada/severa	Moderada
Hepatitis fulminante	0,1%	0,1-1,0%	<0,1%	2-5% coinfección	1-2%
Progresión a cronicidad	No	1-10% adultos 90% recién nac.	50-80%	20% sobreinfección 2-5% coinfección 70-90% sobreinfección	10-20% en embarazo No
Pronóstico	Excelente	Malo >50 años	Moderado/severa	Bueno-coinfección Pobre-sobreinfección	Bueno
Transmisión oro-fecal	Si	No	No	No	Si
Transmisión percutánea	Rara	Si	Si	Si	No
Portador	No	Si	Si	Si	No?
Diagnóstico fase aguda	IgM anti-HAV	HBsAg IgM-antiHBc	Anti-HCV HCV RNA	IgM/IgG anti-HDV HDV RNA	IgM anti-HEV HEV RNA
Diagnóstico fase crónica	No	HBsAg (>6m) IgG-anti HBc	Anti HCV HCV RNA	IgG anti-HDV HDV RNA	No
Riesgo de cirrosis	No	Si	Si	Si	No
Riesgo de carcinoma hepatocelular	No	Si	Si	No?	No

Cuadro tomado y modificado de Koff (5).

hepática. Las uniones de los linfocitos T a los receptores, junto con las células asesinas naturales (NK), dan como resultado la necrosis hepatocelular y, en consecuencia, produciendo una repuesta inmune efectiva, ya que el virus de la hepatitis B cesa la replicación. Después del aclaramiento del virus, se puede anticipar una recuperación completa tanto desde el punto de vista clínico como histológico. Una respuesta inmunológica deficitaria del huésped para impedir la replicación viral del VHB puede dar como resultado la evolución hacia una hepatitis crónica (6,7). El interferón (IFN), con sus propiedades inmuno-moduladoras y antivirales, es un agente satisfactorio por inducir el aclaramiento de los componentes no-integrados del virus de la hepatitis B. El aclaramiento del virus ocasiona una completa recuperación clínica e histológica, dejando al paciente con un patrón serológico caracterizado por anti-HBc (anti-core B) y anti-HBs, esta última confiriendo inmunidad protectora (8).

La persistencia del antígeno de superficie B (HBsAg) por más de seis meses es indicativa de hepatitis crónica B. La presencia desde el punto de vista serológico del HBeAg refleja replicación vi-

ral, con una probabilidad elevada de que el HBV-DNA es fácilmente detectable en el suero y con un alto grado de infectividad (9). La existencia de variantes o formas mutantes del VBH han sido reconocidas. Se incluyen variaciones dentro de la región del pre-core donde el HBeAg no puede expresarse, pero con presencia de anti-HBe y, el HBV-DNA sin embargo, se encuentra presente en el suero. El paciente es infectante y tiene inflamación crónica severa con necrosis. Otra forma mutante se encuentra en el gen S y es refractario a la inducción del anti-HBs por vacunación (10).

Aunque la IgM anti-HBs es diagnóstica de hepatitis viral aguda B, títulos o niveles bajos pueden persistir en hepatitis crónica. Un paciente asintomático con persistencia de títulos bajos de IgG anti-HBc solamente y, niveles normales de aminotransferasas puede haber tenido una historia anterior de hepatitis viral B que no desarrolló anti-HBs o lo ha perdido a través del tiempo. Algunos casos que tienen el anti-HBc solamente pueden ser portadores de HBV detectable únicamente por PCR para el HBV-DNA (11).

La hepatitis tipo B se puede prevenir ya sea por inmunización activa y/o pasiva (HBIG). Existen vacunas recombinantes activas que han resultado ser seguras y efectivas (12,13). La persistencia de hepatitis B en los Estados Unidos refleja un fracaso a la implantación de programas efectivos para la vacunación (14).

Aunque la tasa del portador por HBV en los Estados Unidos es aproximadamente del 0,2%, la transmisión perinatal continúa ocurriendo, pero debe reducirse significativamente con la utilización de exámenes de rutina para HBsAg en todas las mujeres embarazadas, seguido de vacunación sistemática de todos los recién nacidos con madres portadoras de HBsAg (15). En Venezuela con una prevalencia aproximada del 2,0% determinada en los Bancos de Sangre (16), no existe un programa definido de vacunación. Sólo se realizó en una oportunidad cuando apareció una epidemia grave de hepatitis delta en los indígenas Yucpas de la Sierra de Perijá. Debería implantarse la vacunación infantil con la finalidad de prevenir este tipo de hepatitis.

Ensayos terapéuticos aleatorios con interferon alfa 2-recombinante (rIFN- α 2) en dosis de 5 ó 10 MU por vía subcutánea, diario o tres veces por semana por 3-6 meses en pacientes con hepatitis crónica B, han demostrado que puede hacer desaparecer el HBV-DNA y HBeAg del suero y normalizar los niveles de aminotransferasas en pacientes tratados comparados con pacientes controles (17,18). En dos ensayos, uno multicéntrico grande (169 pacientes) y otro controlado del NIH (Instituto Nacional de Salud, EUA), el 42% de los pacientes tratados con interferon alfa 2-recombinante a la dosis de 5 MU diarios o 10 MU tres veces por semana por un período de 4 meses indujeron la desaparición del HBV-DNA y del HBeAg. Los pacientes tratados con alfa-IFN demostraron desde el punto de vista histológico, una mejoría significativa de la necrosis periportal. El seguimiento a largo plazo de los pacientes tratados con alfa-IFN que perdieron el HBV-DNA demostraron desaparición progresiva del HBsAg, sin que se presentara una reactivación. Sin embargo, los pacientes infectados con la forma mutante precore HBV pueden ser una excepción. Aunque se observe una mejoría histológica en los pacientes que presentaron aclaramiento del HBeAg, el HBV-DNA todavía puede ser detectado en el tejido hepático. Factores pronosticadores de la respuesta favorable con IFN son: niveles de HBV-DNA <200 pg/ml, ALT >100 IU/L, sexo femenino, estar en presencia de una infección de corta duración, pacientes con HIV nega-

tivo, no tener infección delta, ser heterosexual y no ser de origen asiático (19). Todos estos factores están asociados con una buena respuesta al IFN. El IFN puede beneficiar a algunos pacientes con cirrosis descompensada moderada por hepatitis B, pero el tratamiento es mal tolerado y potencialmente de alto riesgo para la vida del paciente (20). Un estudio piloto evaluó la eficacia de la thymosina en las hepatitis crónicas por el virus B, con resultados promisorios, pero otro estudio posterior controlado y aleatorio, no ha confirmado todavía su eficacia (21). En los Estados Unidos se ha autorizado el uso del interferón en pacientes con hepatitis crónica B. Los pacientes con enfermedad avanzada descompensada son candidatos para trasplante del hígado, pero desafortunadamente una vez realizado, desarrollan generalmente una infección por hepatitis B recurrente, la cual puede progresar rápidamente hacia un proceso de colestasis fibrosa y cirrosis en algunos pacientes trasplantados (22). La infección recurrente puede ser prevenida, en pacientes receptores con HBV-DNA negativos, con la administración desde la fase anhepática de la intervención de trasplante y por largo plazo de dosis altas de HBIG (gamma-globulina hiperinmune a virus B) (23). Actualmente se están ensayando, para conocer el grado de seguridad y eficacia, los antagonistas de nucleósidos orales como la lamivudine (24), ganciclovir, etc.

El agente de la hepatitis delta es un virus RNA único que requiere de una envoltura, el antígeno de superficie de la hepatitis B y, pertenece a la familia Deltaviridae. La infección de hepatitis delta puede ocurrir como una coinfección donde simultáneamente existen una hepatitis delta aguda y una hepatitis viral B, o bien, como una superinfección donde la hepatitis delta aguda está superimpuesta en un paciente portador crónico con HBsAg positivo (25,26). El virus de la hepatitis delta parece ser directamente citotóxico y en los casos de superinfección es capaz de producir una hepatitis fulminante o una aceleración de la hepatitis viral crónica subyacente, ya que el virus delta puede continuar replicándose mientras persista la infección del HBV. La infección delta es la más prevalente entre los droga-adictos por vía parenteral, hemofílicos y homosexuales masculinos en los Estados Unidos. El anti-HDV se demuestra en el suero tanto en las hepatitis delta aguda y crónica. El alfa-IFN se ha demostrado que mejora la enfermedad durante el tratamiento. Sin embargo, las recaídas se caracterizan por una elevación de las aminotransferasas séricas cuando cesa la terapia con IFN (27). La incidencia de infección delta en el

área del Mediterráneo, donde fue descubierto primero, ha disminuido desde la introducción de agujas desechables. En Venezuela, se descubrió un foco de hepatitis agudas delta en los indígenas Yucptas, que fue estudiado en conjunto con el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) (28), y se organizó a través del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS) un programa de vacunación para la hepatitis B y así evitar la infección delta con buenos resultados. Ya sea por inmunidad natural o inducida por vacunación para el virus B, se logra prevenir la infección por el agente delta. Como aspecto interesante, algunos receptores HBsAg y delta positivos de hígados trasplantados sólo desarrollaron virus delta recurrente, sin presencia del HBV en el nuevo hígado (29).

La aparición de una prueba para detectar el virus de la hepatitis C (HCV) (30) y el desarrollo subsiguiente de determinaciones para el HCV-RNA (31) han permitido una caracterización definitiva de la denominada anteriormente, "hepatitis no-A, no-B". La patogenia de la lesión hepatocelular inducida por la hepatitis C ha sido poco entendida, pero es distinta de la inducida por el HBV. No obstante, los linfocitos T citotóxicos también están involucrados (32). Este virus RNA, de la familia Flaviviridae, se transmite por vía parenteral y es responsable de aproximadamente 90% de los casos de hepatitis post-transfusionales antes de 1989 (33). La transmisión por vía no-parenteral es menos común por HCV cuando se compara con la HBV. La transmisión perinatal es rara, pero este aspecto es objeto actualmente de una investigación continua con un enfoque a largo plazo. El modo de transmisión en casos esporádicos no se ha logrado definir bien todavía, pero han habido algunas evidencias epidemiológicas sobre la correlación con números crecientes de parejas heterosexuales pero no todavía con actividad homosexual (34). La transmisión sexual no es común. A menudo, una historia confidencial de droga-adicción parenteral "recreacional" se puede hacer evidente en algunos círculos diplomáticos. Los inmunoensayos de segunda generación para anti-HCV demuestran una prevalencia del 0,5% entre donantes de sangre en los Estados Unidos, pero la prevalencia en la población a mayor escala está cerca de 1,5% (35). En Venezuela, nuestra prevalencia en Bancos de Sangre es aproximadamente del 0,7% (36).

La introducción de pruebas de segunda generación anti-HCV, ha reducido la incidencia de hepatitis post-transfusional a menos del 0,5%. Pruebas de tercera generación anti-HCV están actualmente en evaluación. El ensayo ELISA anti-HCV efectiva-

mente descubre la mayoría de los pacientes virémicos con hepatitis. Sin embargo, no todos los sueros positivos al anti-HCV son necesariamente virémicos. Además, existen pacientes con anti-HCV negativos que pueden ser potencialmente positivos al HCV-RNA por el PCR (11). Pruebas más simples y eficientes para detectar y cuantificar el HCV-RNA están siendo ensayadas actualmente. Una técnica de amplificación a través de una cadena ramificada DNA se ha desarrollado (bdDNA) (37), en la cual una muestra del suero es lisada, hibridizada, capturada y su señal amplificada. Ya que el blanco no se amplifica, la señal es directamente proporcional a los niveles del blanco. Se ha logrado determinar que la mayoría de los casos de hepatitis viral aguda por virus C evolucionan hacia una hepatitis crónica y por lo menos el 20% de éstos, progresan a cirrosis del hígado, que a su vez implica un riesgo elevado para inducir carcinoma hepatocelular. Este virus es también prevalente entre los pacientes con carcinoma hepatocelular que fueron anteriormente considerados como complicación de cirrosis criptogénica, alcohólica y HBsAg-positivo (38,39).

Utilizando determinaciones sensibles para HCV-RNA se ha demostrado que las hepatitis fulminantes "no-A, no-B", son más bien debidas a otro virus, ej. F?, o de otra etiología, y que la hepatitis fulminante C es poco común (40). La hepatitis B, detectada sólo por PCR (HBV-DNA) y el paramyxovirus han sido también implicados en algunos casos.

Numerosos estudios han demostrado que el alfa-IFN administrado en dosis de 3 MU, por vía subcutánea, tres veces por semana por 6-12 meses con o sin una dosis de inducción más elevada, demuestra que un 35-50% tienen una respuesta completa en pacientes con hepatitis crónica C (41,42). Un 10-15% adicional tienen casi una respuesta completa. Menos del 10% de los controles no tratados remiten espontáneamente durante el período de observación. Después de completar el esquema terapéutico, las recaídas son altas, variando del 40-90%.

Sólo del 15 al 25% tienen una remisión sostenida 4 a 6 años después de haber suspendido el tratamiento con interferón. Re-tratamiento de pacientes que recaen generalmente responden nuevamente y entran en remisión. Tratamiento a más largo plazo (>6 meses) y con mayores dosis se encuentran actualmente en estudio (43). Datos preliminares sugieren que la dosis terapéutica total puede correlacionarse con mejores resultados. Pacientes no-cirróticos con niveles en suero de HCV-RNA relativamente bajos, o sea, con carga viral baja ($<10^6$ eq/ml), pueden responder mejor al interferón (44,45). Pacientes con

enfermedad avanzada del hígado demuestran una eficacia pobre al IFN. El paciente que tenga el genotipo 1b del HCV tiene una gran probabilidad de una respuesta menos favorable con el tratamiento. En pacientes con genotipo 1b y niveles de viremia bajos (10^6 eq/ml) se puede predecir una buena eficacia con el tratamiento (44,45) pero, pacientes que tienen el genotipo 1b y niveles altos de viremia (HCV-RNA) tienen una mayor resistencia al tratamiento con IFN (46). Además, la concentración aumentada de hierro, también impide una buena respuesta al interferón y puede aumentar la replicación viral (47). Se ha demostrado que la supervisión o "monitoreo" de los niveles séricos de HCV-RNA debe proporcionar una estrategia terapéutica más racional. Estudios preliminares han demostrado que la desaparición del HCV-RNA durante el tratamiento con IFN es el mejor factor pronosticador tanto de la respuesta temprana como tardía. La normalización de los niveles de aminotransferasas se asocia a menudo con la desaparición del HCV-RNA sérico (48). En los pacientes que no logran aclarar el HCV-RNA, la recaída es inevitable (49). Además, las recaídas ocurrirán aproximadamente del 40% al 60% de esos pacientes que aclararon el HCV-RNA tanto en suero como en el hígado, una vez que se ha suspendido el tratamiento (49,50). Por esto, la existencia de virus residual relativamente resistente al IFN es porque se encuentra secuestrado, probablemente en el hígado, en concentraciones no detectables por el PCR y posiblemente en otros sitios extra-hepáticos. La determinación del HCV por PCR, de cualquier modo es un método complejo, sujeto a error y por lo tanto limitado en la aplicación clínica. Se han dirigido muchos esfuerzos hacia la determinación cuantitativa del HCV-RNA el cual ayudaría, sin lugar a dudas, a una evaluación más exacta de la eficacia terapéutica y el ajuste de la dosis terapéutica. La duración del tratamiento podría ser modificada apropiadamente si se lograra establecer la tendencia de los niveles de HCV-RNA. De cualquier manera, el aclaramiento completo del virus C, es difícil de lograr en la mayoría de los pacientes con hepatitis crónicas por el virus C utilizando los agentes antivirales disponibles. Estudios de seguimiento por 2-3 años posteriores a la suspensión del tratamiento en pacientes tratados satisfactoriamente y con éxito, sugieren que el aclaramiento del HCV se obtuvo solamente en el 20% de todos los pacientes tratados con un simple curso de IFN. Sin embargo, si la remisión bioquímica e histológica puede ser sostenida, el pronóstico mejora (51). Actualmente se están evaluando un grupo de interferones desde el punto de vista de seguridad

relativa, eficacia y efectos secundarios, comparándolos con el interferón alfa 2b recombinante, el cual es el único interferón que ha sido aprobado para su uso en hepatitis viral en los Estados Unidos. Otros agentes antivirales, como el ribavirin, han sido estudiados y podrían tener un lugar en el enfoque terapéutico, asociado al IFN en las hepatitis crónicas. El ribavirin tiene la ventaja de su administración oral, pero ya existen datos que demuestran que no se logra el aclaramiento del virus cuando se utiliza solo (52). Desgraciadamente, un anticuerpo protector o neutralizante para el virus de la hepatitis C no ha sido demostrado todavía. La eficacia de la inmunización pasiva con la inmunoglobulina estándar no es efectiva y el desarrollo de una vacuna ha tenido dificultades. Se ha demostrado un grupo de variantes o mutantes de la hepatitis C, muchos de los cuales se desarrollan durante la historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C, que explican su propensión a la persistencia. Todo esto puede dificultar aún más el desarrollo de la vacuna y de la terapia antiviral.

La hepatitis viral E (53) es producida por RNA virus, que puede pertenecer a la familia Caliciviridae y Togaviridae, que se transmite por vía oro-fecal y ha sido responsable de epidemias de origen hídrico, particularmente en poblaciones de Asia y Africa, y en México. Se ha logrado observar partículas virales en las heces de pacientes que tienen esta enfermedad y también se han desarrollado pruebas serológicas confirmatorias (54,55). La enfermedad es típicamente auto-limitada y no evoluciona hacia una hepatitis crónica. Se han observado con frecuencia cuadros colestáticos. Una característica particular de esta enfermedad es el hecho de observar hepatitis fulminante en embarazadas (56). La gammaglobulina estándar no se ha demostrado efectiva en la prevención de la hepatitis viral E y no se ha desarrollado todavía ninguna vacuna activa (56).

Finalmente, es probable la existencia de otras hepatitis virales que se lograrán poner de manifiesto en el futuro con el descubrimiento de uno o más virus y de pruebas serológicas apropiadas. Actualmente existen datos en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, EUA, de la existencia de otro tipo diferente de hepatitis, posiblemente la F (34,57,58).

REFERENCIAS

1. Shapiro CN, Coleman PJ, McQuillan GM, Alter MJ, Margolis HS. Epidemiology of hepatitis A. Seroepidemiology and risk groups. *Vaccine* 1992;1:S59-62.

2. Beker S, Labrador GG, Rodríguez-Amaya J, Plaz JF, Nath N, Mazzur S, et al. Frecuencia de anticuerpos a hepatitis por virus A (anti-HVA) en donantes de sangre, zona urbana Oeste de Caracas. *GEN* 1979;33:337-38 (Resumen)
3. Hepatitis A: a vaccine at last (editorial). *Lancet* 1992;339:1198.
4. McMahon BJ, Shapiro CN, Robertson BH. Hepatitis A. En: Haubrich W, Schaffner F, Berk JB, editores. *Bockus Gastroenterology*, 5th Edition. Filadelfia: WB Saunders Co, 1994.
5. Koff RS. Viral hepatitis. En: Schiff L, Schiff ER, editores. *Diseases of the liver*, 7th Edition. Filadelfia: JB. Lippincott, 1993;Vol 1:492-577.
6. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus (HBV encoded antigens in acute and chronic HBV infection. *J Immunol* 1990;145:3442-49.
7. Eddetone ALWF. Overview of HBV pathogenesis. En: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, editores. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991:234-37.
8. Peters M. Mechanism of action of interferons. *Sem Liver Dis* 1989;9:235-39
9. Sjogren MH. Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterol Clin N Amer* 1994;23:457-77.
10. Thomas HC, Carman WF. Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. *Gastroenterol Clin N Amer* 1994;23:499-514.
11. Hu KQ, Vierling JM. Molecular diagnostic techniques for viral hepatitis. *Gastroenterol Clin N Amer* 1994;23:479-98.
12. Ellis RV, editor. *Hepatitis B vaccines in clinical practice*. New York: Marcel Dekker, 1993.
13. Towards the elimination of hepatitis B: A guide to the implementation of national immunization programs in the developing world. *Global Perspectives on Hepatitis* (July) 1994;5:18.
14. Williams WS, Hickon MA, Kane MA, Kendal P, Spika JS, Hinman AR. Immunization policies and vaccine coverage among adults: The risk for missed opportunities. *Ann Intern Med* 1988;108:616-25.
15. Hoofnagle JH. Toward universal vaccination against hepatitis B Virus. *N Engl J Med* 1989;321:1333-34.
16. Beker S, Labrador G, Rodríguez-Amaya J, Plaz JF, Mazzur S, Nath N, et al. Frecuencia de marcadores del virus de la hepatitis B (VHB) en donantes de sangre, zona urbana Oeste de Caracas. *GEN* 1979;33:337-38 (Resumen).
17. Hoofnagle JH, Peter M, Mullen KD, Jones DB, Rustg V, Di Bisceglie A, et al. Randomized controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic B hepatitis. *Gastroenterol* 1988;318-25.
18. Perrillo RP, Mason AL. Therapy for hepatitis B virus infection. *Gastroenterol Clin N A* 1994;23:581-601.
19. Perrillo RP. The management of chronic hepatitis B. *Am J Med* 1994;96(Suppl 1A):43S-40S.
20. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Park Y. Alpha interferon treatment of patients with clinically apparent cirrhosis due to chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993;104:1116-21.
21. Mutchnick MG, Appelman HD, Chung HT, Aragona E, Gupta TP, Cukmmings GD, et al. Thymosin treatment of chronic hepatitis B: A placebo-controlled pilot trial. *Hepatology* 1991;14:409-15.
22. Davis SE, Portmann B, O'Grady JG, Aldis PM, Chaggar K, Alexander GJM, et al. Hepatic histology following transplantation for chronic hepatitis B virus infection including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. *Hepatology* 1991;13:150-57.
23. Samuel D, Bismuth A, Mathieu D, Arulnaden JL, Reynes M, Benhamou JP. Passive immunoprophylaxis after liver transplantation in HBsAg-positive patients. *Lancet* 1991;337:813-15.
24. Dienstag HL, Perillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicaru C, Rubin M. Double-blind, randomized, three-month, dose-ranging trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 1994;20 (Pt2):199A.
25. Rizzeto M, Verme G, Recchia S, Bonino F, Farci P, Arico S, et al. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of delta antigen. *Ann Intern Med* 1983;98:437-41.
26. Conjeevaram HD, Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis D. En: Zuckerman AJ, Thomas HC, editores. *Viral hepatitis*. Edimburgh: Churchill Livingstone, 1993:341-50.
27. Farci P, Mandas A, Coiana A, Lai ME, Desmet V, Van Eyken P, et al. Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a. *N Engl J Med* 1994;330:88-94.
28. Hadler S, Monzon M, Ponzetto A, Anzola E, Rivero D, Mondolfi A, et al. Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yuca Indians of Venezuela. *Ann Intern Med* 1984;100:339-44.
29. Ottobrelli A, Marzano A, Smedile A, Recchia S, Salizzoni M, Cornu C, et al. Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology* 1991;101:1649-55.
30. Choo Q-1, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood borne non-B viral genome. *Science* 1989;244:359-62.
31. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka K, Sugai Y, Akahame Y, et al. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region.

- Jap J Expe Med 1990;4:215-22.
32. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for C virus in person with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992;149:3339-44.
 33. Sherlock S. Chronic hepatitis C. *Disease a Month* 1994;40(3):117-196.
 34. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander AW, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
 35. Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin N Amer* 1994;23:437-55.
 36. Linares J. Comunicación personal. Banco de Sangre (2a generación + RIBA 2), sobre 3, 128 muestras 1992.
 37. Urdea M. Synthesis and characterization of branched DNA (bDNA) for the direct and quantitative detection of CMV, HBV, HCV and HIV. *Clin Chemistry* 1993;39:725.
 38. Jeffers LJ, Hasan F, De Medina M, Reddy R, Parker T, Silva M, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among patients with cryptogenic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1992;15:187-90.
 39. Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, De Medina M, Parker T, Cheinquer H, et al. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 1993;18:1326-33.
 40. Wright TL, Hsu H, Donegan E, Feinstone S, Greenberg H, Read A, et al. Hepatitis C virus not found in fulminant non-A, non-B hepatitis. *Ann Intern Med* 1991;115:111-12.
 41. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Perrillo RP, et al. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa: A multicenter randomized, controlled trial. *N Engl J Med* 1982;321:1501-06.
 42. Tiné F, Magrin S, Croxi A, Pagliaro L. Interferon for non-A, non-B chronic hepatitis: a meta-analysis of randomized clinical trial. *J Hepatol* 1991;13:192-99.
 43. Lindsay KL, Davis GLL, Schiff E, Bodenheimer HC, Balart L, Dienstag J, et al. Long-term response of higher doses of interferon (IFN) alfa 2b treatment of patient with chronic hepatitis C: A randomized controlled multicenter trial. *Hepatology* 1993;18:106A-
 44. Yano M, Yatsushashi H. HCV viral load, genotypes and efficacy of IFN therapy. *Curr Ther* 1993;11:87-91.
 45. Davis GL, Lau JYN, Urdea MS, Neuwald PD, Wilber JC, Lindsay K, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA by a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon treated patients. *Hepatology* 1994;19:1337-1341
 46. Laurent-Puig P, Dussaix E, Altman C, Laval C, Stuyver L, Wilber JC, et al. Genotyping of hepatitis C virus (HCV) and quantitation of HCV RNA after 4 weeks of interferon therapy predict the response of INF. Presentado en el VI Symposium Internacional de Hepatitis Viral, 3-5 Febrero, 1994; Madrid-España.
 47. Van Thiel DH, Gavalier JS, Wright HI, Friedlander L. Responses to alfa interferon (IFN) therapy are influenced by the iron content of the liver. *Gastroenterology* 1992;102:A904.
 48. Lau JYN, Davis GL, Kniffen J, Qian KP, Urdea MS, Can CS, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993;341:1501-04.
 49. Shindo M, Di Bisceglie AM, Cheung L, Shih JWK, Cristiano K, Feinstone SM, et al. Decrease in serum hepatitis C viral RNA during alpha-interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 1991;115:700-4.
 50. Lau JYn, Mizokami M, Ohno T, Diamond DA, Knifen J, Davis GL, et al. Discrepancy between biochemical and virological responses to interferon-alpha in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993;342:1208-09.
 51. Davis GL, Lau JYN, Lim HL. Therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin N Amer* 1994;23:603-13.
 52. Bodenheimer HC, Lindsay KL, Davis GL, Lewis IH, Thung SN, Mahaney K, et al. Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;20:A441.
 53. Tandon BN, Gandhi BN, Gandhi BM, Josi YK, Irshad M, Gupta H. Hepatitis virus non-A, non-B: The cause of the major public health problem in India. *Bull WHO* 1985;63:931-34.
 54. Ticehurst J. Identification and characterization of hepatitis E Virus. En: Hollinger BF, Lemon SM, Margolis HS, editores. *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991:501-13.
 55. Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Alexandrov AG, Alter MJ, et al. Serologic identification of hepatitis E virus infection in epidemic and endemic settings. *J Med Virol* 1992;36:246-50.
 56. Purdy MA, Krawczynski K. Hepatitis E. *Gastroenterol Clin N Amer* 1994;23:537-46.
 57. Buti M, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Quer J, Esteban R, Guardia J. Non-A, non-B, non-C, non-E acute hepatitis: does it really exist? En: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, editores. *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag, 1994;77-79.
 58. Tassopoulos NC, Hatzakis A, Kuhns M, Miriagou V, Delladetsima I, Koutelou MG, et al. Clinical and laboratory features of acute community-acquired non-B, Non-C hepatitis. En: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, editores. *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag, 1994:80-84.

BEKER S