

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE UN SISTEMA "ANTIGENO ANTICUERPO"  
ASOCIADO CON LA HEPATITIS NANB.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del  
Programa de Estudios de Posgrado en Biología para  
optar al grado de Magister Scientiae.

MAYRA LIZETH TAYLOR CASTILLO

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica.

1991

**Dedicatoria:**

Dedico esta tesis a mi esposo Leo quien me acompañó y apoyó durante toda mi carrera y a mis padres Teresa y Hugo sin cuya ayuda, espiritual, amorosa y económica no habría alcanzado esta meta.

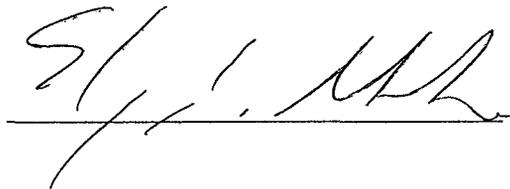
**Agradecimientos:**

Quiero agradecer profundamente a Kirsten Visoná, por brindarme todas las facilidades del laboratorio, sus conocimientos y consejos para llevar a cabo este proyecto. De igual forma a todo el personal del ICMRT por el apoyo brindado en especial a Carlos, Marvin y Rosa por toda su desinteresada colaboración. A mis profesores consejeros, Edgardo Moreno, Libia Herrero, José Bonilla y Pedro León sin cuya orientación no hubiera sido posible encausar y escribir este trabajo.

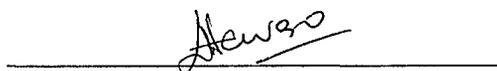
Finalmente agradezco a Waldo, Magda, Rodolfo y a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido en el desarrollo y consecución de esta tesis.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae."

Dr. Edgardo Moreno Robles  
Tutor de la Tesis.



Dra. Libia Herrero Uribe  
Profesor Consejero.



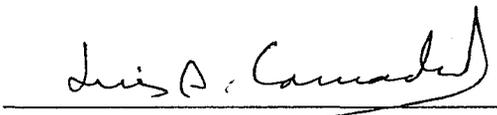
Dr. José Bonilla Vargas  
Profesor Consejero.



Dr. Pedro León Azofeifa  
Profesor Consejero.



Dr. Luis Camacho Naranjo  
Decano del SEP.



Dra. Julieta Carranza Velázquez  
Directora del SEP Escuela de Biología.



Mayra Lizeth Taylor Castillo  
Estudiante.



## INDICE

	Página
RESUMEN	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA:	
Reseña Histórica	4
Epidemiología de la HNANB	7
Hepatitis Epidémica NANB o Hepatitis E	7
Hepatitis Percutánea y Esporádica	9
Características Clínicas	12
Hallazgos Histopatológicos	15
Marcadores Indirectos	17
Evidencia de Dos o Más Virus:	
a- Agentes asociados	18
b- Purificación de probables antígenos y desarrollo de pruebas serológicas	20
c- Características biológicas y bioquímicas de posibles agentes asociados a la HNANB	27
d- Estudios en marmosetas, monos y voluntarios humanos	28
Características Inmunológicas y Genéticas	30
Tratamiento	31
Hepatitis C	32

## MATERIALES y METODOS

I- Sistema Serológico NANB-ICMRT:	41
1- Reoforesis	41
2- Inmunoaderencia	41
3- ELISA	42
II- Caracterización del Sistema:	
1- Producción de Anticuerpos Policlonales	43
2- Producción de Anticuerpos Monoclonales	43
3- Tratamientos Bioquímicos	44
4- Cromatoenfoque en Columna	44
5- Western Blot	44
III- Análisis del Sistema en Diferentes Poblaciones	
1- Muestras	45
2- Marcadores del Sistema NANB-ICMRT	46
3- Marcadores de Hepatitis A, B y CMV	47
4- Determinación de Anti-VHC	48
5- Estudios Preliminares por PCR	48
RESULTADOS:	
I- Caracterización del Sistema	49
II- Análisis del Sistema en Diferentes Poblaciones:	
1- Marcadores de Hepatitis A, B y CMV	54
2- Inmunoaderencia	57
3- ELISA	67
4- Determinación de Anti-VHC	71
5- Análisis preliminares por PCR	710
DISCUSION	74
BIBLIOGRAFIA	87

## RESUMEN

Se seleccionó por reforesis un grupo de 60 sueros procedentes de donantes que reaccionaron entre sí. El sistema serológico sirvió para diagnosticar hepatitis NANB y fué descrito como el "sistema LSU-ICMRT". Dos de estos sueros (19 y 36) fueron analizados en forma parcial física y bioquímicamente, lo que permitió concluir que el suero 19 se comporta como el anticuerpo del sistema y el 36 como el antígeno. El anticuerpo posiblemente reconoce una estructura de membrana y un componente soluble ya que es neutralizado por eritrocitos del grupo sanguíneo A y reaccionó con dos bandas de proteína (200 y 120 Kd) presentes en sueros positivos por el antígeno y en algunos negativos que pertenecen al mismo grupo sanguíneo. Posteriormente, se intentó la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, sin resultados satisfactorios.

Se analizaron un total de 3693 muestras procedentes de pacientes con hepatitis NANB, pacientes con de hepatitis pero negativos por los marcadores de VHA, VHB y CMV, casos de hepatitis A, hepatitis B, muestras con marcadores de CMV, hemofílicos, así como personal, pacientes y sus familiares de la Unidad de Hemodiálisis, personas de consulta antivenérea, diabéticos, mujeres embarazadas y donantes.

Cada una de las muestras fue analizada por los marcadores del sistema en estudio, por las técnicas de Inmunoadherencia (IA), ELISA y reforesis y por marcadores directos e indirectos de hepatitis A, B, C y CMV.

La técnica de IA fue seleccionada como el método de referencia. Con ella se demostró una prevalencia en los casos de HNANB de 48.1%, y en los casos de hepatitis negativos por marcadores de VHA, VHB y CMV de 34.6%. Ninguna de las otras hepatitis virales, ni los marcadores de CMV, ni otros factores como la diabetes, el embarazo, la edad o el sexo, alteraron la prevalencia general del sistema que osciló entre un 9% y un 20%.

La distribución del antígeno y el anticuerpo del sistema serológico NANB-ICMRT en los grupos estudiados fue alterna, lo cual indica que el anticuerpo no es neutralizante. En mujeres embarazadas se demostró la presencia de falsos positivos probablemente debidos a complejos inmunes circulantes. El grupo de los hemofílicos se vio muy afectado por la hepatitis B (40.4%) y la hepatitis C (60%), datos que concuerdan con estudios de otros países; para el sistema NANB-ICMRT, presentaron un predominio de antígeno que se puede atribuir, a la exposición constante de este grupo a la sangre y sus derivados y a su sistema inmune alterado. Estos datos demuestran que el sistema serológico NANB-ICMRT es un sistema asociado a casos de hepatitis esporádica y a poblaciones expuestas a contacto parenteral, que tiene relación con un componente normal asociado al grupo sanguíneo A. Son necesarios más estudios para saber si se trata de una respuesta normal alterada o de un agente viral. Además la posible relación con el VHB está en estudio por técnicas de PCR y análisis de secuencias del ADN aislado.

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1: Características Clínicas de la HNANB Percutánea o Esporádica.
- Cuadro 2: Prevalencia de HNANB en Diferentes Grupos de Riesgo.
- Cuadro 3: Importancia de los Marcadores Indirectos para Prevenir HPT NANB.
- Cuadro 4: Agentes Asociados a Cuadros de HNANB.
- Cuadro 5: Tratamientos Utilizados en Casos de HNANB.
- Cuadro 6: Diferentes Tipos de Hepatitis Virales.
- Cuadro 7: Relación Entre el Grupo Sanguíneo y el Sistema Serológico NANB-ICMRT.
- Cuadro 8: Prevalencia de Hepatitis B en las Poblaciones Estudiadas.
- Cuadro 9: Distribución de los Marcadores del Sistema Serológico NANB-ICMRT en Donantes Según el Nivel de ALT.
- Cuadro 10: Distribución de los Marcadores del Sistema Serológico NANB-ICMRT en Donantes Según Reactividad al Anti-HBs.
- Cuadro 11: Relación entre los Marcadores Virales de Hepatitis B y del Sistema NANB-ICMRT en Diferentes Grupos.
- Cuadro 12: Distribución de los Marcadores del Sistema Serológico NANB-ICMRT Según Marcadores de CMV.
- Cuadro 13: Prevalencia de Anti-VHC en las Distintas

Poblaciones del Estudio

Cuadro 14: Detección de HBsAg y HBcAg por PCR en 127

Donantes de Honduras y 44 Casos de HNANB Agudos.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Reacción Contra el Suero 19 o el 36 de las Fracciones de Purificación por Columna de Sephacryl-300.
- Figura 2: Western Blot del Suero 36 Revelado con el Suero 19.
- Figura 3: Niveles de ALT en las Poblaciones de Donantes Estudiadas.
- Figura 4: Distribución de los Casos Agudos de Hepatitis Según Niveles de ALT.
- Figura 5: Distribución de los Marcadores del Sistema Serológico NANB-ICMRT en los Casos de HNANB y Casos Negativos por VHA, VHB y CMV.
- Figura 6: Distribución de los Marcadores del Sistema Serológico NANB-ICMRT Según el Tipo de Hemofilia.
- Figura 7: Comparación de la Detección del Anticuerpo del Sistema Serológico NANB-ICMRT por ELISA e IA en las Poblaciones Estudiadas.
- Figura 8: Comparación de la Detección del Anticuerpo del Sistema Serológico NANB-ICMRT por ELISA e IA en los Casos de Hepatitis Virales.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC= Complejo Avidina biotina  
ADCC= Antibody dependent cytotoxicity (Citotoxicidad dependiente de anticuerpos)  
ADN= Acido desoxirribonucleico  
ADNc= Acido desoxirribonucleico copia  
ALT= Alaninoaminotrasferasa  
Anti-HBc= Anticuerpos contra el antígeno core  
Anti-HBe= Anticuerpos contra el antígeno e  
Anti-HBs= Anticuerpos contra el antígeno de superficie  
ARN= Acido ribonucleico  
BCIP= 5-Bromo 4-cloro indolil fosfato  
CEA= Carcinoembrionic antigen (Antígeno carcinoembriónico)  
CMV= Citomegalovirus  
CHC= Carcinoma hepatocelular  
CR= Costa Rica  
CsA= Ciclosporina A  
CsCl= Cloruro de cesio  
°C= Grados centígrados  
DIV= Drogadictos intravenosos  
DTT= Ditiotreitól  
EBV= Virus de Epstein Bar  
ELISA= Enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo inmunoenzimático)  
HBeAg= Antígeno e  
HBsAg= Antígeno de superficie

HCA= Hepatitis crónica activa  
HCL= Hepatitis crónica lobular  
HCP= Hepatitis crónica persistente  
HNANB= Hepatitis noA noB  
HPT= Hepatitis postransfusional  
IA= Inmunoadherencia  
ICMRT= International Center of Medical Research and Training  
(Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento  
Médico)  
IgG= Inmunoglobulina G  
IgM= Inmunoglobulina M  
IL= Interleucina  
INF= Interferón  
LUV= Luz ultravioleta  
ME= Microscopía electrónica  
NBT= p-Nitro blue tetrazolium  
NK= Natural killer (Asesinas naturales)  
OK432= Cepa de Streptococcus chugai  
ORF= Open reading frame (Encuadre de lectura abierta)  
PAP= Peroxidasa antiperoxidasa  
PEG= Polietilenglicol  
PI= Punto isoeléctrico  
pIIINP= Péptido aminoterminal del procolágeno III  
RIA= Radioimmunoassay (Radioinmunoensayo)  
SDS-PAGE= Sodium duodesil sulfate-Poliacrilamide gels (Geles  
de poliacrilamida con duodesil sulfato de sodio)  
SOD= Superóxido dismutasa

TA= Temperatura ambiente

TÑBP= Trin-(n-butil)-fosfato

UI/l= Unidades internacionales por litro

VHA= Virus de la hepatitis A

VHB= Virus de la hepatitis B

VHC= Virus de la hepatitis C

VHE= Virus de la hepatitis E

VLPs= Virus like particles (Partículas semejantes a virus)

vs= Versus

Abreviaturas para los tampones.

PBS= Phosphate buffer saline (Tampón salino de fosfatos)

PCT= PBS caseína Tween-20

PST= PBS suero fetal bovino Tween-20

TBG= Tampón barbital gelatina

TE= Tris EDTA

TR= Tampón de recubrimiento

T-Na= Tris NaCl

## INTRODUCCION

Desde el siglo V antes de Cristo, escritos de Hipócrates y del Talmud Babilonio describen cuadros de ictericia, signo asociado a la hepatitis (43). Esta enfermedad puede ser causada por fármacos, tóxicos, alcohol, problemas obstructivos, depósitos de cobre, autoanticuerpos, obesidad, parásitos, bacterias, virus, etc. (95).

Las epidemias por hepatitis virales han dejado secuelas como enfermedades crónicas en millones de personas en el mundo. Hasta 1988 se conocían 3 agentes hepatotrópicos clásicos: el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis Delta (VHD) (43, 110). Existen además virus hepatotrópicos secundarios (cuyo órgano principal de ataque no es el hígado), como el citomegalovirus (CMV), Epstein Bar virus (EBV) y virus exóticos como el de la fiebre amarilla, fiebre de Ebola, fiebre de Marburg, etc. Si se excluyen todas las causadas por virus o tóxicos, queda un grupo de hepatitis que se ha clasificado como hepatitis No A No B (HNANB) (43, 95).

Actualmente la HNANB se ha dividido en tres grupos: Una parte causada por el virus de la hepatitis E (VHE) descubierto por Balayan *et al.* en 1983 (13), otra por el virus de la hepatitis C (VHC) descubierto por Choo *et al.* en 1988 (38) y otra que aún permanece en estudio y que se denomina HNANB.

Para la hepatitis A y B existen métodos diagnósticos y

posibilidad de inmunización pasiva y activa. Para el VHC, VHD y VHE actualmente se cuenta sólo con métodos de diagnóstico (16, 17, 38, 76).

Por sus características de transmisión estos agentes virales se clasifican en:

A- Virus entéricos, transmitidos principalmente vía fecal-oral como el VHA y el VHE que no dejan secuelas crónicas. En Costa Rica cerca del 80% de la población adulta posee anticuerpos contra el VHA (200). Sobre el VHE que ha causado grandes epidemias en India, Africa y México no se poseen datos. Sin embargo, debido a su cercanía con México, no se puede descartar su existencia en Centroamérica.

B- Virus que se transmiten principalmente por vía parenteral, sexual, vertical o comunitaria como el VHB, VHC, VHD, y el o los virus de HNANB. En Costa Rica el VHB tiene una prevalencia del 10% (200) y el VHD, cuya existencia depende de casos agudos o crónicos del VHB por ensamblarse dentro del HBsAg de este, posee una prevalencia muy baja en Centroamérica (110).

En los países desarrollados, el VHC se ha asociado a las hepatitis postransfusionales desde un 20% a un 90% y con las esporádicas de un 5 a un 40% ambas anteriormente clasificadas como HNANB (55, 80, 157). Queda un porcentaje variable según la ubicación geográfica con etiología desconocida.

Científicos como Suh (176), Trepo (185), Prince (143), Ogori (135) y Seto (165), han tratado de caracterizar sistemas antígeno-anticuerpo o un agente viral relacionado

con las HNANB. Sin embargo, no han obtenido resultados convincentes y actualmente una parte de estos casos se han asociado con el VHC.

El Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico (CIIAM), conocido por sus siglas en inglés como ICMRT, ha trabajado con un sistema descubierto al reaccionar entre si sueros de dos donantes que se estaban estudiando por HBsAg con bandas de precipitación en placas de reoforesis. Posteriormente, la reactividad de estos sueros se asoció con casos de HNANB y se seleccionaron los que mejor correlación dieron. Los sueros fueron numerados consecutivamente y se denominó arbitrariamente a los sueros pares como antígenos y a los sueros impares como anticuerpos (198, 199). Este es el sistema que se ha denominado sistema serológico NANB-ICMRT.

El presente trabajo consistió en la evaluación de la prevalencia de la hepatitis NANB, mediante el sistema serológico NANB-ICMRT en casos de HNANB, hepatitis B agudos y crónicos, casos de hepatitis A agudos, muestras con marcadores de CMV, personal de la unidad de hemodiálisis, pacientes de la misma y sus familiares, hemofílicos, personas de consulta antivenérea, diabéticos, mujeres embarazadas y donantes. También se hicieron estudios bioquímicos e inmunológicos para caracterizar dicho sistema y se comparó con el sistema desarrollado por Abbott para detectar anti-VHC (38).

## REVISION BIBLIOGRAFICA

## Reseña Histórica

Desde el siglo V antes de Cristo se describen cuadros de ictericia en el Talmud Babilonio y en escritos de Hipócrates, la cual, era atribuida a la obstrucción de los ductos biliares y se denominaba ictericia catarral (21, 43).

En 1885, en una vacunación contra la viruela, se produjeron cuadros de ictericia en la mayoría de los vacunados en diferentes partes del mundo. En 1900 se describió de nuevo en pacientes con enfermedades venéreas, artritis reumatoide, diabéticos, niños inoculados con sueros hiperinmunes contra sarampión y paperas, en receptores de sangre o sus derivados y en militares vacunados contra la fiebre amarilla (21).

Hasta después de la segunda guerra mundial se pensó en etiologías virales por los resultados obtenidos en experimentos de transmisión a voluntarios humanos (21, 43).

En los años 1940, se sugirió la existencia de al menos dos tipos de hepatitis (21, 43, 47, 59): La hepatitis infecciosa o hepatitis A con un período de incubación de 15 a 45 días y de transmisión fecal-oral, conocida también como, hepatitis epidémica, hepatitis de período de incubación corto, "Jaunisse des camps" y "Soldaten Gelbsuscht"; y la hepatitis sérica o hepatitis B con un período de incubación de 45 a 150 días y de transmisión parenteral ( sangre o sus derivados ). Otros sinónimos para esta hepatitis fueron

hepatitis por inóculo, hepatitis de largo período de incubación, hepatitis "hippy" y hepatitis "Tatto." En 1965, Blumberg *et al.* (22), descubrieron un antígeno al que denominaron antígeno Australia y en 1968 Prince *et al.* (141) lo denominaron antígeno de superficie (HBsAg) y lo relacionaron con la enfermedad. En 1973, Feinstone (60) observó el virus de la hepatitis A (VHA) al microscopio electrónico, en las heces de un mono infectado con el agente de transmisión fecal-oral (21). Poco tiempo después, Provost *et al.* (144) lograron replicar en cultivo de tejido una cepa del VHA de un extracto de heces facilitada por el ICMRT de un paciente de Costa Rica. En 1977, Rizzetto *et al.* (155) describieron el agente llamado delta o D, el cual existe como una co-infección a la hepatitis B, ya que utiliza el HBsAg como su cubierta.

A mediados de los años 70, se inició el tamizaje de donantes de sangre para detectar HBsAg por distintas metodologías. Sin embargo, la hepatitis postransfusional (HPT) permanecía muy alta, y de todos los casos sólo un porcentaje pequeño era producido por el Epstein Bar virus (EBV), el citomegalovirus (CMV), pocos por hepatitis B y rara vez por hepatitis A (8, 156). A partir de 1974, de todos los casos de hepatitis un 85% a un 95% se clasificaron como ni A ni B, de allí su nombre, hepatitis no A no B (HNANB) (137, 143, 156) y se acumularon las siguientes evidencias de la existencia de otros agentes causantes de Hepatitis:

1- Múltiples ataques de hepatitis aguda, en una misma

persona, principalmente en hemofílicos, pacientes de hemodiálisis, de transplante renal y drogadictos intravenosos (DIV) (21, 59, 65,67,156). 2- Períodos de incubación de 45 a 55 días que son intermedios entre los de la hepatitis A y B con casos de períodos de incubación más cortos y otros más largos (17, 116, 156). 3- El poseer anticuerpos contra el HBsAg (Anti-HBs), no protege contra la HPT (21, 47, 65). 4- El estudio de las HPT demostró que hay casos no relacionados con el VHA, con el VHB, ni con otros 24 agentes (43). 5- Diferentes patrones de la enzima alaninoaminotransferasa (ALT): monofásico con retorno rápido a la normalidad, bifásico y polifásico con decaimiento progresivo (21, 47, 48, 116, 153).

En 1983, Balayan et al. (13) aislaron un virus entérico causante de hepatitis epidémica transmitida por el agua conocido ahora como el virus de la hepatitis E (VHE) el cual fue clonado en 1990 (152). En 1988 Choo, Kuo y colaboradores (38, 104) describieron un nuevo agente causal de hepatitis parenteral denominado virus de la hepatitis C (VHC).

Actualmente se cuenta con métodos de diagnóstico para el VHA, VHB, el agente D, VHE y VHC; además existen métodos de vacunación pasiva y activa contra el VHA y VHB. Las vacunas contra el VHB son derivadas de plasmas humanos o recombinantes y la de VHA son de virus muertos o atenuados en cultivo de fibroblastos (76, 166).

### Epidemiología de la HNANB.

Por su modo de transmisión la HNANB se ha clasificado en 3 tipos (116): Hepatitis epidémica, hepatitis asociada a sangre o contacto percutáneo y hepatitis esporádica.

### Hepatitis Epidémica NANB o Hepatitis E:

La hepatitis E es epidémica y endémica en India, Argelia, Burma, Somalia, Nepal, Pakistán, Costa de Marfil y México. Es transmitida vía fecal-oral, se presenta principalmente en épocas lluviosas y en regiones de malas condiciones higiénicas, pobreza extrema, falta de alcantarillado de aguas negras, etc.. Produce alta mortalidad en mujeres en el tercer trimestre del embarazo (18, 21, 27, 47, 124, 140, 145, 156, 166).

Epidemiológica y clínicamente se asemeja a una hepatitis A, por lo que al principio se creyó que el agente era un mutante del VHA. El período de incubación promedio es de 40 días y afecta principalmente adultos jóvenes (15-40 años) (27, 43, 122, 123, 140, 145, 166, 180). Sin embargo, en Nueva Delhi, India, pacientes con hepatitis E ya poseían anticuerpos Anti-VHA, asimismo chimpancés inmunes al VHA que han sido inoculados con heces de varios brotes se han infectado, lo que indica que no hay inmunidad cruzada ni relación serológica. Partículas del virus se han aislado de extractos de heces y probadas por hibridación con sondas de ADN copia (ADNc) del VHA, del virus de la polio, y del virus de la encefalomiocarditis, y no se ha observado reacción.

Esto indica que el agente de la hepatitis E no es un picornavirus(145). Tampoco se ha observado reacción cruzada por inmunomicroscopía electrónica (82).

El VHE puede ser transmitido a voluntarios sanos y a primates como el Cynomolgus macaque y Sanguinus mystax. Las partículas semejantes a virus o VLPs (siglas en inglés), son icosaédricas de 27 a 34 nm, con proyecciones en la superficie. Son destruidas por el cloruro de cesio (CsCl) y altas concentraciones de sal, tienen un coeficiente de sedimentación en sacarosa de 183 S, se degradan en 3 a 5 días a 4-8°C, se conservan en nitrógeno líquido y se excretan en heces cuando se elevan las transaminasas. El VHE no se ha cultivado "in vitro" a pesar de que Pillot *et al.* (140) reportaron en 1984 su crecimiento en hepatocitos PLC/PRF5. Es un calicivirus semejante al de los felinos (13, 27, 152, 166).

Se han desarrollado pruebas de ELISA para detectar el VHE en heces (18, 140). Los anticuerpos tipo IgM son detectados durante la fase aguda, sin embargo, los tipo IgG de la fase convaleciente son de bajos títulos, lo que indica que no hay protección prolongada (27).

El VHE ha sido purificado de heces y bilis y luego de construir una biblioteca genética con ADNc en el fago gt10, se seleccionaron 16 clonas exógenas, que eran las que no reaccionaban con el genoma de un ser humano ni de un Cynomolgus macaque (Cyno) no infectados, pero que hibridaban con un ARN de 7.6 kilodaltons (kd) de un Cyno infectado.

Pruebas posteriores permitieron seleccionar una clona denominada ET 1.1 y el péptido que produce tiene secuencia de consenso con ARN polimerasas ARN dependientes presentes en virus ARN (+). Además, hibridó con ADNc hecho a partir de ARN del virus purificado de heces de humanos procedentes de 5 regiones distintas pero no con material genético de fagos y bacterias. El análisis se hizo por medio de las técnicas de PCR (polimerase chain reaction) y una modificación especial denominada SISPA (Sequence-independent single primer amplification) (152).

En Costa Rica aún no se han reportado casos, pero se pueden presentar en cualquier momento por la llegada de inmigrantes o turistas provenientes principalmente de México, donde su presencia ha sido demostrada. Se han dado casos de hepatitis fulminante en franceses que han vuelto a Francia procedentes de Asia y Africa (115).

#### Hepatitis Percutánea y Esporádica:

La hepatitis percutánea, al igual que la hepatitis B, es transmitida principalmente por sangre y sus derivados a politransfundidos (cuyo riesgo aumenta con el número de unidades recibidas y la calidad del donante), DIV, hemofílicos, pacientes de hemodiálisis, de transplantes, de plasmaferésis, etc. (21, 35, 47, 65, 89, 90, 95, 116, 132, 133, 148). En Estados Unidos se reporta una incidencia de un 4-12% y representa en varios países cerca de un 90% de las hepatitis postransfusionales (21, 67, 89, 146).

La hepatitis esporádica es adquirida en una comunidad, ya sea por transmisión homo, bi o heterosexual, contactos familiares, contacto nosocomial, trabajadores de salud y otras vías no bien identificadas, pero en menor proporción que la hepatitis B (1, 21, 47, 116, 180, 193). Hay poca evidencia de transmisión por saliva, pero la posibilidad no se descarta (1, 46, 77). Su severidad en pacientes mayores de 60 años es confirmada por algunos autores (47, 159) y negada por otros (70). Uno de los primeros reportes lo dió en Costa Rica el grupo de Villarejos en el ICMRT (194, 195).

Los cuadros clínicos y bioquímicos asociados con las hepatitis percutáneas y esporádicas, agudas o crónicas, tradicionalmente son diagnosticados por exclusión, esto es, serología negativa de marcadores de hepatitis A aguda (IgM Anti-VHA), de hepatitis B aguda (IgM Anti-HBc) o crónica (HBsAg, HBeAg, título de IgG Anti-HBc, Anti-HBe), de infección reciente o reactivada de CMV (IgM Anti-CMV, títulos elevados de IgG Anti-CMV en dos o más muestras del paciente), de infección por EBV (IgM Anti-EBV), ausencia de sustancias o medicamentos tóxicos (oxifenisatinas, metildopa, isoniazida, etc.), ausencia de enfermedades obstructivas, enfermedades autoinmunes, obesidad y depósitos de cobre o enfermedad de Wilson. El papel del CMV se ha discutido mucho debido a que la técnica de fijación de complemento empleada para su diagnóstico ha dado títulos muy bajos y no reproducibles, además, sueros almacenados no pueden ser evaluados. En un estudio de 57 pacientes con hepatitis postransfusional (HPT),

50 con hepatitis no postransfusional, y 50 controles, evaluados con la prueba de hemaglutinación indirecta, el 21%, 4% y 0% respectivamente, tuvieron aumento de 4 veces el título. En este tipo de hepatitis el período de incubación es muy corto, no se produce cronicidad y su diagnóstico es importante en neonatos y en pacientes inmunosupresos por causas naturales o inducidas (8, 43, 47). Otros factores que son causales de cuadros de hepatitis pero que no se utilizan para el criterio de exclusión son virus menos comunes como el de la fiebre amarilla, de Marburg, de Lassa, de Ebola, Cocksackie, Rift Valley, herpes simplex, rubeola, varicela zoster, otros patógenos como toxoplasma, brucella, micobacterias, espiroquetas, rickettsias, hongos, deficiencia de  $\alpha$ -1 antitripsina, hemocromatosis, porfirias, tumores, congestión pasiva del hígado por falla ventricular derecha y shock séptico (21, 47, 67, 95, 153, 193).

La HNANB causaba hasta 1988, según la región geográfica, del 65% al 95% de las HPT y del 15% al 25% de las hepatitis esporádicas (43, 47, 67, 89). En Suecia se reportó de un 23% a un 40% (205), en Estados Unidos de un 3% a un 20% (153), en Kuwait un 9% (6), en Italia de un 11% a un 58% (68), en Grecia un 13% (182) y en otros países como Costa Rica 0.3% en donantes y 5 casos en San Ramón y Palmares (195, 196, 197), Brasil con 20% de casos (101) y España con 14% (16).

Casos de hepatitis B y NANB se han reportado en pacientes receptores de gamaglobulinas en Italia, Inglaterra, Estados Unidos y Suiza, cuando éstas han sido fraccionadas

por el método de Cohn. Sin embargo, con gamaglobulinas tratadas con pepsina no se transmitió la enfermedad. Los niveles de ALT no correlacionaron con la clínica presentada en estos casos y la transmisión se dio sólo en unos receptores debido a una distribución desigual del agente en cada vial y un factor de dilución limitante (106, 158, 210).

#### Características Clínicas.

En la HNANB el cuadro agudo es más leve que el de la hepatitis B. En un estudio de 203 casos de hepatitis fulminantes, un 36.9% correspondieron a HNANB y un 43.3% a la B, de los primeros un 0 a un 13% se recuperan y en B lo hacen de un 17% a un 33% (65, 99, 116, 193). El cuadro clínico es semejante a otras hepatitis virales (159), y se resume en el cuadro 1.

La edad, el peso, el sexo, la raza, la historia clínica y la exposición previa a sangre, no afectan la incidencia de las HPT pero sí el volumen y el tipo de transfusión (16, 17, 65, 116, 175, 193). Actualmente, según la zona geográfica, de un 20% a un 90% de las HPT y de un 2% a un 40% de las hepatitis esporádicas catalogadas como NANB se incluyen en el grupo de la hepatitis C (193). Estudios realizados en diferentes grupos de riesgo en diferentes regiones, muestran una prevalencia muy variada como se aprecia en el cuadro 2.

El índice de riesgo para adquirir una HPT es calculado por la fórmula empírica  $V_s + T_s$  en donde  $V_s = (V - V) / V_{sd}$  y  $T_s = (T - T) / T_{sd}$ ,  $V$  = volumen de transfusión,  $V$  = volumen promedio

CUADRO 1  
 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA HEPATITIS NANB PERCUTANEA O  
 ESPORADICA

Período de incubación	2 a 26 semanas
Signos y síntomas más importantes	Mayoría asintomáticos, astenia, dolor abdominal, fatiga, vómito y fiebre.
Aumento de ALT y bilirrubinas	Leve a moderado
Ictericia	Reportes de 1.3% a 25% de los casos.
Hepatitis crónica	Reportes de 40% a 60%
HCA	Reportes de 38% a 61%
HCP	Reportes de 17% a 62%
Cirrosis	Reportes de 1% a 56% (según edad y modo de transmisión).
Carcinoma hepatocelular	Hasta un 20%
Referencias: 8, 21, 43, 47, 67, 78, 89, 95, 116, 137, 145, 153, 159, 178, 180, 216.	

CUADRO 2.  
PREVALENCIA DE HEPATITIS NANB EN DIFERENTES GRUPOS DE RIESGO

Grupo	Prevalencia (%)	Referencia
DIV	12 a 50	47, 65, 205, 208
Hemodiálisis	5 a 25	47
Hemofílicos	30 a 70	216
Donantes comerciales	17 a 34	16
Donantes voluntarios	0 a 6	16
Transfundidos	3 a 93	47, 65, 85
Cirugía de corazón	17 a 40	17, 65, 116, 148, 175, 193
Personal de salud	6 a 20	65, 67
Personal de salud con accidentes	Hasta 80	65, 67
Esporádicos familiares	10 a 50	10, 47, 216
Contactos Heterosexuales	11	10

de transfusión, Vds= desviación estandar del volumen, T= tiempo de circulación extracorporal, T= tiempo promedio, Tsd= desviación estandar del tiempo. Con esta fórmula se puede predecir la incidencia de la hepatitis NANB (116, 130, 135). Otra fórmula sugerida para calcular este riesgo denominada R es:  $R= 1-(1-C)^N$ , en donde C=tasa de portadores y N=# de bolsas. El valor de R ha disminuido con el uso de donantes voluntarios y un control adecuado de los mismos (116). La transmisión vertical durante el tercer trimestre del embarazo ya se ha reportado en varios estudios (21, 31, 65, 67, 209).

#### Hallazgos Histopatológicos.

En la HNANB aguda se presenta el cuadro típico de cualquier otra hepatitis, pero la mitad de los casos presentan cúmulos eosinofílicos en el citoplasma, esteatosis microvesicular, marcada actividad de células sinusoidales (43%), respuesta inflamatoria portal, periportal y parenquimal menos intensa que en la hepatitis A o B, con menos linfocitos, pero gran número de cuerpos acidófilos y partículas nucleares que son inversamente proporcionales al grado de inflamación y degeneración hepática. En hepatitis B, los cuerpos acidófilos y la infiltración son uniformes, en la hepatitis A el daño periportal es más severo, con células plasmáticas y colestasis intralobular; hay hepatocitólisis mediada por los linfocitos, esto puede ser el origen de la recurrencia episódica reflejada por la fluctuación de las transaminasas. En la hepatitis E se observa colestasis

celular y lobular, necrosis focal, embalonamiento de hepatocitos, cambios degenerativos acidófilos y microinflamatorios en el parénquima, con poco infiltrado en tractos portales. En mujeres embarazadas se presenta coagulación intravascular diseminada o Fenómeno de Shwartzman (27, 47, 50, 145, 193).

En la HNANB crónica se puede observar necrosis hepatocelular lobular periférica moderada, infiltración de células mononucleares con grado variable de fibrosis e hipertrofia portal. Generalmente, hay ausencia de anticuerpos antinucleares y antimusculares, pero se observa gran cantidad de complejos inmunes circulantes (47, 67). En la HCP hay infiltrado inflamatorio mixto en el tracto portal, y necrosis moderada (67). Mattsson (116) reporta en HPT de un 20% a un 49% de cirrosis y 50% de HCA. En DIV con hepatitis o en casos esporádicos la mayoría han desarrollado HCP y muy pocos cirrosis; en pacientes con hepatitis por gamaglobulinas se presenta un alto grado de cirrosis y en hemofílicos varía de un 13% a un 26%. En la HCA existen necrosis pieceneal, necrosis de la placa limitante de los hepatocitos alrededor del tracto portal y en más del 54% de los casos se presenta remisión espontánea bioquímica e histológica en 1 a 3 años, en el resto de los casos se produce fibrosis, necrosis, cirrosis e incluso muerte en un período de tiempo que oscila de 4 meses a 11 años. Además, existen complicaciones raras como encefalopatías, ascitis, várices esofágicas, anemia aplástica, artritis, púrpuras,

etc. (21, 43, 47, 116).

El diagnóstico histopatológico es controversial. En un estudio, Bianchi *et al.*, consultaron varios patólogos y cada muestra fue reinterpretada un año después. Sólo el 68% de los casos se clasificaron de la misma manera, con un 70% de consenso entre los médicos. Entre las posibles causas de controversia se citan: infecciones dobles, histología discreta y cambios no específicos (20).

#### **Marcadores Indirectos.**

Hasta 1989 no se contaba con ninguna prueba para identificar la HNANB. Se utilizaban marcadores indirectos como lo son: valores aumentados de ALT, presencia de Anti-HBc, valores aumentados de péptido aminoterminal del procolágeno tipo III (pIIINP), de hyaluronan, presencia de Anti-HBs (47, 78), Anti-albúmina humana polimerizada después de descartar VHA y VHB (21), guanasa sérica (116), niveles de antígeno carcinoembriónico (CEA), ácidos biliares (47), coliglisina sérica (78) y heopterina en orina (150).

El Anti-HBc y la ALT se utilizan como marcadores de infectividad para la HNANB ya que las circunstancias epidemiológicas y clínicas de ambos tipos de hepatitis son semejantes. Sin embargo, González *et al.* en 1990 (69) compararon un grupo de personas que habían recibido sangre con la prueba negativa con otro en donde la prueba no se había hecho y un 27.6% recibieron al menos una unidad Anti-HBc positiva y un 5.3% al menos una unidad con ALT

aumentada. La incidencia de hepatitis aguda fue de 9.3% y 10% respectivamente, sin diferencia significativa. Hanson *et al.* (73) en su trabajo en 1986 indican la importancia de la determinación del Anti-HBc pero señalan que al menos un 50% de los positivos no van a transmitir HNANB. La importancia de cada uno de estos marcadores se presenta en el cuadro 3.

La guanasa humana (Guanina deaminasa EC3.5.4.3) es una enzima que está presente en hígado, cerebro y riñón. Es considerada como un indicador más específico de daño hepatocelular que la ALT (86). El pIIINP se genera en la síntesis de tejido conectivo como respuesta a procesos fibróticos y es capturado y degradado por las células endoteliales hepáticas. Su aumento en suero se debe a diferentes procesos hepáticos, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, artritis reumatoide, etc. Se ha demostrado también su aumento en hepatitis A y B agudas, en HCA y en el avance de HNANB en hemofílicos (116, 120). El hyaluronan es un polisacárido sintetizado por la mayoría de las células, se libera al espacio extracelular y pasa a la sangre por la circulación linfática. Es degradado por las células hepáticas, aumenta en cirrosis alcohólica, cirrosis biliar primaria, hepatitis aguda viral, artritis, mesoteliomas y septicemias y normaliza rápidamente (116).

#### Evidencia de dos o más Virus.

##### a- Agentes Asociados.

Varios agentes se han asociado con cuadros de HNANB,

CUADRO 3.  
 IMPORTANCIA DE LOS MARCADORES INDIRECTOS PARA PREVENIR  
 HEPATITIS POSTRANSFUSIONAL NANB.

Marcador	Importancia relativa	Referencia
ALT *	++	7, 21, 47, 116, 153
Anti-HBc	++	7, 21, 47, 99, 116, 153, 187
ALT y Anti-HBc	+++	7, 21, 47, 99, 116, 153, 187
Anti-HBs	+	47, 78
Anti-Albúmina Humana Polimerizada	++	21
CEA	+	47
Acidos Biliares	+	47
Coliglicina Sérica	++	78
Heopterina en orina	++	150
Guanina deaminasa	+++	85, 116
Procolágeno tipo III Peptido aminoterminal	_+	117
Hyaluronam	_+	117

\* = >2.5 veces promedio normal  
 \_+ = muy poca  
 + = poca  
 ++ = bastante  
 +++ = mucha

entre ellos el VHB. Toda la información acerca de la reacción cruzada del NANB con el VHB, hizo pensar que al menos uno de los agentes causales de HNANB estaba relacionado a éste y presentaban mimetismo clínico, bioquímico y epidemiológico. Con el HBsAg no se ha reportado reacción cruzada excepto si se utiliza Anti-HBs monoclonal (67, 74, 99, 185). Un resumen de los posibles agentes con que pueda tener relación la HNANB se muestra en el cuadro 4.

#### b- Purificación de Probables Antígenos y Desarrollo de Pruebas Serológicas.

Las técnicas de inmunodifusión y contraelectroforesis (detectan 1 ug/ml) se han utilizado para tratar de caracterizar sistemas asociados al NANB. Chircu et al. en 1980 (37) trabajaron con una inmunodifusión y por los resultados obtenidos plantearon dos hipótesis: muy poca sensibilidad en la prueba o la presencia de al menos dos sistemas con antígeno temprano y anticuerpos de corta duración. En un sistema de Outcherlony, en donde los antígenos eran sueros de casos agudos y los anticuerpos sueros de casos convalescientes, se purificó por gradiente de sacarosa el antígeno que mejor respondió y con éste se evaluaron paneles internacionales. Un 55% de las hepatitis A y un 29% de las hepatitis B dieron antígeno positivo, no se formaron líneas de precipitación en presencia de EDTA, sueros negativos dieron positivos al ser calentados a 56°C por 20 min y un suero positivo dejó de serlo. Por lo

CUADRO 4.  
AGENTES ASOCIADOS A CUADROS DE HNANB

Agente	Relación	Importancia relativa	Referencia
VHB	Partículas semejantes ADN Pol., homología parcial del ADN,	+++	74, 75, 143, 156, 185, 201
	Reacción cruzada con HBeAg y HBcAg	+++	65, 201
Retrovirus	Actividad de TR.	++	99, 106
	Ninguna actividad	-	28, 87
Spumavirus	Aislados de casos	-	210
Togavirus	60 a 70 nm con envoltura y proyecciones	+++	56, 75, 112
Enterovirus			
Adenovirus	Aislados de		
Mixovirus	casos, pero	-	47
Parvovirus	sin relación		
Micoplasmas			

- = ninguna  
++ = bastante  
+++ = mucha

tanto, se llegó a la conclusión de que no se trataba de un sistema específico, quizás por la presencia de complejos inmunes que ocultaban el verdadero sistema (79, 176, 177). Deinstag (48) describió un método de inmunodifusión con sueros agudos y convalescientes de casos de HNANB y observó partículas de 30, 40 y 60 nm con una migración semejante a las globulinas, un peso molecular de 100 a 300 Kd y una densidad de 1.36 g/ml.

Del suero de un hemofílico con hepatitis en fase aguda Duermeyer (52, 53) aisló un antígeno denominado Ds por gradiente de CsCl (1.32 g/ml), con un peso molecular de 900 kd, estable 1 hora a 56°C a pH=3, altas concentraciones de CsCl o NaI y 20% de éter, pero se destruye a 98°C, pH=2, con cloroformo, cloro a 1 p.p.m. y formalina 1:4000 a 37°C por 72 horas. En una prueba de ELISA encontró 65% de antígeno en pacientes con PTH NANB, 9% en hemofílicos, 41% en prostitutas, 0.6% en donantes y no hubo reacción cruzada con otras hepatitis. Seto (165) describió una glicoproteína de 77 Kd aislada de un paciente con HNANB en un gel SDS-PAGE al 9% y diseñó un radioinmunoensayo (RIA) con el que detectó un 59% de positivos en casos esporádicos y obtuvo una reacción cruzada con una glicoproteína del HIV-1 a la que llamó gp-74. Schaff(162) aisló una glicoproteína semejante con técnicas histoquímicas e hibridaciones que dieron muy buena correlación. Burk (32) comparó el método de peroxidasa antiperoxidasa (PAP) con el sistema avidina-biotina (ABC) que utiliza el suero de un donante positivo por anticuerpo;

el ABC resultó 50 veces más sensible que el PAP. Vitvitski (201) desarrolló una técnica de inmunofluorescencia en tejido y encontró una reacción cruzada con el HBeAg y el HBcAg. Observó partículas de 20 a 25 nm y actividad de ADN polimerasa. Sin embargo, obtuvo muchas reacciones inespecíficas en sueros controles y bajos resultados en paneles ciegos, lo que implica posiblemente una prueba basada en complejos inmunes circulantes, una respuesta de una proteína hepática normal, autoanticuerpos o factor reumatoide (48). Spertini (173) precipitó el antígeno del sistema con PEG 6000, pH= 4.6 y realizó una doble inmunodifusión en donde obtuvo resultados semejantes a los de Vitvitski. Zhuang (215) realizó también pruebas de Ouchterlony con sueros de pacientes, trabajó con tinciones para proteínas, carbohidratos y lípidos, encontró un antígeno en gradiente de sacarosa (4 S) y de densidad 1.175 g/ml en CsCl, resistente a 60°C por 1 h. En SDS-PAGE observó 3 bandas de 47, 55 y 64.5 kd y material amorfo a microscopía electrónica (ME). Por todas estas características concluyó que probablemente se trataba de una lipoproteína asociada a todo proceso de daño hepático e ictericia. Ohori (136) aisló un antígeno de orina y el anticuerpo respectivo de suero. El antígeno aislado es una proteína de 250 kd en su forma nativa, con un coeficiente de sedimentación de 11.0 S, una densidad en CsCl de 1.215 g/ml, se observó una partícula de 11nm por ME y una banda de 38 kd en SDS-PAGE. Esta información hace pensar en una lipoproteína de un togavirus. Cada uno de los sueros

estudiados fue analizado contra cada uno de los antígenos y se encontraron dos anticuerpos distintos, uno de ellos correspondió al suero A y se denominó SO al sistema, y el otro correspondió al suero M o sistema MI. El sistema SO dio resultados más específicos que el MI.

Se ha comprobado que linfocitos de humanos y chimpancés transfectados con el EBV, producen anticuerpos que marcados con fluoresceína o peroxidasa, dan una buena correlación en algunos casos (167) y en otros reaccionan con tejidos de alcohólicos, infectados sólo con VHB o con el agente D (67, 108, 112). Akatsuka (4) detectó por hemaglutinación pasiva un antígeno de un paciente con HNANB al que denominó AN6520. Este es un polipéptido de 45 Kd reconocido por anticuerpos policlonales en su forma nativa. De un hibridoma entre células somáticas de bazo con mieloma NS-1 este autor aisló el anticuerpo monoclonal respectivo de líquido ascítico de ratones Balb/c y desarrolló un RIA para la detención de antígeno, y por bloqueo del anticuerpo lo detectó en las mismas placas. Este RIA resultó 60 veces más sensible que la hemaglutinación pasiva. Una vez probado el sistema en casos de HNANB, hepatitis A, hepatitis B y en otras hepatopatías, demostró que el AN6520 se encontraba en altas concentraciones en hígado con variaciones de individuo a individuo y en bajas concentraciones en hígado fetal, bazo, pulmón, riñón, páncreas, intestinos, etc. y por lo tanto era una proteína de origen celular que aumentaba en los casos de HNANB antes de la elevación de ALT sin ninguna relación con su estadío.

Esto se puede deber a un aumento real en la concentración del mismo, un aumento en la formación de los polímeros, o a una modificación durante la replicación viral que la hace más inmunogénica. (3 y 4).

En otro estudio, Luo *et al.*, purificaron un antígeno por gradiente de CsCl (1.225-1.325 g/ml) y el anticuerpo por columna de DEAE-52. Este se marcó por el método de la cloramina T para producir un RIA y se obtuvo de 2.3% a 4% de positividad de antígeno en los grupos control y un alto porcentaje en grupos de alto riesgo como DIV, homosexuales, prostitutas, pacientes de hemodiálisis, hepatitis esporádica, etc. (112). Shirashi (168) purificó un antígeno de 1.27 a 1.32 g/ml en CsCl (rango de las IgMs) con un coeficiente de sedimentación de 56 S, eluye a pH= 5.0-5.6 en columnas de P.I.. Es adsorbido por agregados de IgG e inestable en mercaptoetanol al igual que un factor reumatoide aberrante (prueba negativa). También purificó el anticuerpo y desarrolló un RIA pero presentó falsos positivos. El antígeno se detectó en sueros humanos y de chimpancés con hepatitis aguda y crónica.

En un estudio de más de 55000 donantes, Villarejos *et al.* (198, 199) describieron el sistema NANB-ICMRT. Cada donante fue probado en una placa de reoforésis con Anti-HBs en el centro y no reaccionaron contra éste sino que formaron una línea de precipitación entre dos sueros adyacentes en más de 30 oportunidades. Se realizaron pruebas de identidad entre ellos y se escogieron 6, se denominó arbitrariamente

anticuerpos a los pares y antígenos a los impares. El resto del estudio se realizó con los sueros #2 y #5. Casos de hepatitis en áreas rurales de Costa Rica, sus contactos familiares, casos de hepatitis A y B, y de otras enfermedades hepáticas o de otra naturaleza fueron analizados por reoforesis, contraelectroforesis, inmunoadherencia (IA) y ELISA. El marcador fue localizado en todos los casos crónicos y en 70% de los agudos, con una seroconversión de más del 40% en personas menores de 15 años, lo que indicó contacto temprano, 27% en familiares, 4% en casos de hepatitis A y B y 0.3% en donantes. El antígeno es estable 1h a 40°C, pH= 4 y pH= 10 a 37°C por 12 h, tiene una densidad en CsCl de 1.27 g/ml, se inhibe con Anti-IgG, se une parcialmente a proteína A, pesa 500kd y no es detectado por ELISA en mercaptoetanol. Todo esto sugiere que es una mezcla de lipoproteína, lípidos y complejos inmunes.

Se han probado desde las metodologías más sencillas como el Outcherlony, IA, ELISA y RIA, hasta las más complejas como el Western Blot, la ME, las hibridaciones, producción de anticuerpos monoclonales y clonaje, lo que ha dado como resultado una amplia gama de resultados acordes o no con la hepatitis en estudio, ya que dependen de la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad encontrados, parámetros que se ven afectados por autoanticuerpos contra autoantígenos o exoantígenos (de bacterias y alimentos). Las partículas semejantes a virus que oscilan entre los 11 y 140 nm observadas en suero o tejido hepático podrían

representar fragmentos subcelulares, organelas normales, partículas, lipoproteínas y otros virus adventicios, sin descartar la posible relación con el virus de la hepatitis B, retrovirus y otros (17, 21, 62, 65, 142).

Algunos autores han asociado las reacciones en casos de HPT NANB con isohemaglutininas del sistema ABO, y con un antígeno citoplasmático de los eritrocitos llamado CDA1, o con el antígeno T de la membrana de los mismos (142).

#### c- Características Biológicas y Bioquímicas de Posibles Agentes Asociados a la HNANB.

Existen al menos dos agentes asociados a la HNANB, o un agente que produce dos efectos distintos. Uno de ellos es sensible a 60°C por 10 h, al cloroformo y a la formalina lo que sugiere una composición lipídica y un ácido nucleico de banda simple. Es menor de 80 nm, produce estructuras tubulares en las cisternas del retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, que son fusiones intracitoplasmáticas de membranas circulares de 100 a 350 nm. Se puede purificar de plasma e hígado con métodos para recuperar virus ARN pequeños y posee una densidad de 1.14 g/ml. Este agente se ha denominado cepa H y se aísla principalmente del factor VIII. El otro agente es resistente al cloroformo, es mayor de 30 nm y es intranuclear, genera irregularidades en la membrana nuclear, condensación de la cromatina y forma vesículas y vacuolas. Se le ha denominado cepa F y se aísla principalmente del factor IX (9, 14, 15, 21, 48, 67, 88, 89,

116, 137, 142, 156, 178, 180). Las estructuras tubulares en el retículo endoplásmico se han observado en células de pulmón de diferenciación temprana, en células del endotelio vascular de riñón y piel, en linfocitos de pacientes con lupus eritematoso diseminado o SIDA, esclerosis sistémica, histiocitoma fibroso, atresia biliar, carcinoma, escleroderma, en polimiositis, infección por el agente D, infecciones por virus ADN o ARN, tumores malignos, leucemia de células T de adultos, etc., por lo que parece ser una respuesta metabólica común a ciertos tipos de daños de tejido, o ser arreglos cristalinos en el citoplasma de células endoteliales de sinusoides, etc. (21, 48, 204).

Se han observado agrupaciones densas en el citoplasma, agrupaciones intermedias con túbulos que son las más típicas y agrupaciones débiles en la periferia del núcleo. Esto genera dos hipótesis: 1- Son partículas no relacionadas al NANB que se producen en muchas células por estímulos variados, entre ellos los virales o 2- Son partículas relacionadas al NANB, al VHB y a otros virus que se encuentran en mayor frecuencia de lo esperado (45). Busachi (33) sugiere que los agregados densos y débiles son artificios y no diferentes tipos de agregados mientras que los intermedios si son específicos para el NANB.

#### d-Estudios en Marmosetas, Monos y Voluntarios Humanos.

Se han llevado a cabo estudios de infectividad de todos los posibles agentes causales de HNANB, en marmosetas

(Sanguinus mystax y S. labiatus), chimpancés (Pan troglodytes), macacos (Macacus cynomolgus), monos verdes (Cercopithecus aethiops) y voluntarios humanos y se ha demostrado que son transmisibles aún con niveles de transaminasas normales, además generan cronicidad y estados de portadores. Estos agentes producen reinfección en chimpancés seroconvalescientes de 6 meses a un año después de infectados lo que indica un corto período de duración de anticuerpos. La clínica e histología es semejante en chimpancés y humanos, aunque predomina la HCP en los primeros (2, 25, 43, 47, 48, 61, 116, 140, 142, 178). No se ha observado relación entre la severidad de la enfermedad, el volumen de inóculo, el estadio del cual procede el mismo o la vía de infección (48, 179). En marmosetas, chimpancés (72% de susceptibilidad) y humanos se han observado las lesiones tubulares citoplasmáticas y partículas nucleares. En marmosetas el porcentaje de infectividad es menor y el período de incubación es más largo que en chimpancés y humanos (48, 142, 179, 204). Infección con un suero de un paciente HNANB protege de reinfección consigo mismo, pero no con otro de otra fuente (213). En otros estudios, inóculos distintos han generado un cuadro clínico diferente pero un mismo período de incubación y las mismas estructuras, lo que sugiere un único agente (43, 204). Infecciones en marmosetas con el factor VIII (Cepa H) y en chimpancés con el factor IX (Cepa F) dieron hibridaciones inespecíficas con ADN del VHB (64).

Se reporta un fenómeno de interferencia viral entre estos agentes y los virus de hepatitis A y B, en algunos estudios (107, 116), pero no en otros (179). Chimpancés infectados con el VHB no desarrollaron infección al ser inoculados con sueros de casos de NANB y viceversa (30). Chimpancés que presentan inmunidad para el VHA desarrollan infección por NANB pero, chimpancés infectados por NANB desarrollan poca o ninguna patología al infectarse con el VHA (26).

La transmisión vertical en chimpancés se da en muy bajo porcentaje al igual que en humanos, debido a la baja replicación viral en el hospedero. La mayoría de los recién nacidos infectados son subclínicos (31, 179).

#### Características Inmunológicas y Genéticas.

El mecanismo de daño que se da en las HNANB ha sido causa de grandes controversias, para algunos el efecto citopático directo es el más importante, para otros, es la actividad viral y para otros es el mecanismo inmunológico sumado al efecto viral.

En casos de HNANB parenteral, se presentan los siguientes cambios inmunológicos: algunos pacientes elevan sus niveles de IL-1 y INF pero otros se mantienen normales (36). Los niveles de IgM e IgG se mantienen normales o aumentan las IgGs, es raro encontrar autoanticuerpos, se produce factor inhibidor de rosetas, células NK normales, aumento de células de Chang, relación Ts/Th baja (47).

Spengler (173) considera que en el daño hepatocelular es importante el infiltrado de células linfoides en el tejido hepático. La mayoría de estas células linfoides son células T con predominio de supresoras y citotóxicas. Las células de Kupfer están normales, las células NK o "natural killer" no son importantes y no hay evidencia de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), como en una hepatitis autoinmune, una colangitis esclerosante primaria o algunas cirrosis biliares. Dienes (51) afirma que la respuesta T dependiente flanqueada por la actividad de las células NK y el mecanismo ADCC es muy importante y Serrano (164) considera que lo más importante es el efecto viral.

Se conoce que las células T citotóxicas y en menor proporción las NK, degradan el ADN en fragmentos de 200 pb. Si se analiza el ADN circulante que se genera en cuadros de hepatitis A y B, por hibridación con la secuencia humana Alu-1 (secuencia de repetición) y con parte del genoma del VHB, se puede observar un patrón de escalera que indica lisis de membranas, actividad de nucleasas internas y cortes al azar del ADN que genera los fragmentos de 200 pb. En casos de NANB lo que se produce es una mancha continua debida al ataque de anticuerpos y del complemento o de células citotóxicas en un período corto de daño (23).

### **Tratamiento**

Tradicionalmente se aconsejaba reposo, mantener una dieta de 2000 calorías diarias, evitar el consumo de alcohol

y no utilizar corticoesteroides, excepto en HCA severa junto con azatioprina (21). Tanto para la hepatitis B como para la HNANB se han utilizado distintos tipos de drogas, gamaglobulinas, linfoquinas y monoquinas. Algunos de los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 5.

Estudios "in vitro" han demostrado que el INF no inhibe la replicación del VHB, ni afecta el comportamiento en casos de HNANB o personas normales (125). También se han ensayado agentes bloqueadores del calcio, análogos de la prostaciclina, inhibidores de la tromboxanosintetasa, antagonistas del factor activador de plaquetas (K-NAAP), etc. (183).

### Hepatitis C

En uno de los intentos por encontrar el agente causal de la HNANB se aisló ARN de hepatocitos infectados y se creó una biblioteca genética de ADNc en el fago  $\lambda$ -gt10 y se determinó la secuencia diferencial con ADNc de hígados normales e infectados. Sin embargo, sólo se encontró material genético del hospedero (108). Posteriormente Choo (38), extrajo el ADN y el ARN de un chimpancé infectado, e hizo la biblioteca genética en el fago  $\lambda$ -gt11. Los experimentos de hibridación con material genético de humano y chimpancé normales e infectados, permitieron seleccionar una clona grande y específica para NANB (clona 81), de la cual se derivó la clona 5-1-1. La señal se perdió al tratar con ribonucleasas, pero no con desoxiribonucleasas y sólo una de las bandas de

CUADRO 5.  
TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN CASOS DE HNANB

Tratamiento	Resultado	Referencia
Alfa-INF* a largo plazo	+++1	163, 206
Alfa-INF* + OK 432 <sup>^</sup>	+++1	136
Beta-INF** a largo plazo	+++1	11, 134
Ciclosporina A	+++1	183
Ciclosporina A+ prolactina	En estudio	183
Acyclovir	-	137

\* = Estudios "In Vitro" demostraron que el INF no inhibe la replicación del VHD ni afecta el comportamiento de los casos de HNANB (125)

\*\* = Se cree que a corto plazo y bajas dosis podría ser una buena terapia postransfusional. (11, 134)

<sup>^</sup> = Inmunopotenciador Streptococcus chugai.

la clona hibridó, lo que indicó que era un ARN de simple banda. Esta clona codifica por un péptido inmunorreactivo generado en 1 sólo encuadre de lectura abierta (ORF), tiene un peso de 55 kd y se expresó tanto en Escherichia coli como en levaduras, unido al gen de la enzima humana superóxido dismutasa (SOD). Con este péptido se hicieron inmunoblots de sueros normales, agudos y crónicos de humanos y chimpancés, con resultados excelentes. Se comprobó que el agente es un togavirus con envoltura lipídica (soluble en solventes orgánicos), con un tamaño menor a los 80 nm. Actualmente se le conoce como el VHC de la compañía "Chiron" (38). El péptido generado en levaduras se denominó C 100-3, es de 363 aminoácidos (aproximadamente 4% del virus). Pruebas con este péptido demostraron que la hepatitis C es la principal causa de hepatitis comunitaria y de hepatitis crónicas en Italia y Japón (104, 216). Actualmente, existen pruebas de ELISA para detectar anticuerpos contra el VHC producidas por Abbott y Ortho. Muchos estudios han demostrado la prevalencia de este agente en distintas poblaciones. En un estudio realizado en niños, 2 de 5 casos de HNANB aguda y 2 de 5 casos crónicos, fueron positivos (24). En 14 de 40 casos de cirrosis alcohólica la prueba dió positiva lo que puede ser la causa de su cronicidad (29). Los grupos de riesgo son los mismos que para la HNANB (72).

Los Anti-VHC se detectan usualmente después de 6 meses de la infección en el 86% de los politransfundidos, 70% de los DIV, 62% de los pacientes con hepatitis crónica o

cirrosis, 64-76% de los hemofílicos, 44% en HCA autoimune pero de bajo título, 38% de hepatitis alcohólica, criptogénica o cirrosis biliar primaria, 10-22% de pacientes de hemodiálisis, 8% de homosexuales, 6% de compañeras de DIV y 0.6-1.2% de donantes sanos. Estos anticuerpos desaparecen con el tiempo (55, 92, 111, 118, 131, 160, 189, 190, 214).

Makris y Morgan (114, 126) demostraron un aumento significativo en la prevalencia de HNANB en los hemofílicos infectados con el VIH con respecto a los negativos, en los que reciben factores calentados contra los que los recibieron sin calentar, en los portadores de hepatitis B con respecto a los negativos y en los de transaminasas elevadas o Anti-HBc positivo contra los de valores normales y AntiHbc negativo, aunque en otros estudios el valor de ALT no pareció ser tan importante (41). La determinación de los niveles de ALT y el Anti-HBc se excluye de un 30 a un 40% de los donantes Anti-VHC positivos (92, 93).

Los Anti-VHC también se han reportado en casos de HNANB después de cirugía abierta de corazón (161, 190), en casos de enfermedad criptogénica crónica (161), en leucémicos politransfundidos aunque en un bajo porcentaje por la inmunosupresión (128), en un 90% de pacientes con trasplante de hígado (72, 170), en enfermos mentales (127) y en 75% de las hepatitis crónicas esporádicas con un número más constante de crónicos que en la HPT (80). En varios estudios de pacientes con cirrosis y carcinoma hepatocelular se ha demostrado que el VHC es un factor de riesgo (44, 99, 160,

191). La transmisión sexual y la vertical no parecen ser muy importantes (66, 77, 149, 209), pero sí la transmisión intrafamiliar (96). En Alemania, se realizó otro trabajo de clonaje de ARN y ADN extraído de hígado infectado, con prevalencia parecida de Anti-VHC en hemofílicos, hemodialisados, DIV, HPT, etc. y también con anticuerpos tardíos (157).

La superinfección con el VHC parece jugar un papel importante en los portadores crónicos de hepatitis B que son Anti-HBe positivos (58, 160) ya que se intensifica el desarrollo de una enfermedad fatal (129), el VIH favorece la infección con el VHC y éste a su vez acelera el cuadro de SIDA en una relación de sinergismo (66).

A la prueba de ELISA utilizada para detectar el Anti-VHC se le han atribuido falsos positivos por calor, congelamiento y descongelamiento (49, 127). En hemofílicos se ha reportado hasta un 82% de positividad, con falsos positivos debidos a la alta concentración de complejos inmunes circulantes (40, 118). Al evaluar estas muestras por la técnica de RIBA (Recombinant Immuno Blot Assay), que es más específica, confirman en un 92%, principalmente las que dan lecturas altas (40, 171). Otra probable fuente de falsos positivos son los anticuerpos contra la SOD (84), presencia de factor reumatoide sin importar el título (184) y autoanticuerpos, anti-idiotipos o anticuerpos de reacción cruzada con otros patógenos, además de los sueros denominados pegajosos (54, 118).

Para resolver esta situación, se montó el ELISA con lavados en urea 8 M, que hizo desaparecer los anticuerpos de baja afinidad o de reacción débil; sin embargo, estos son característicos de muestras de período agudo y quizás sean de importancia para diagnóstico temprano (71, 212). Este problema aunado a que la prueba no discrimina si los anticuerpos son protectores en una enfermedad fatal a largo plazo, ha generado discusiones éticas a cerca de si se debe o no realizar la prueba en poblaciones sanas como donantes o mujeres embarazadas, o si se les debe comunicar el resultado (63).

Cristiano y Weiner establecieron una relación entre la presencia del VHC en hígado, mediante PCR y los anticuerpos circulantes mediante RIA (equivalente al ELISA Ortho). Algunos casos fueron positivos sólo por PCR y otros sólo por RIA, de manera que los primeros eran de muestras tempranas y las segundas tardías con respecto a la infección (42, 207).

Dussaix (54) considera que en pacientes con enfermedades autoinmunes, los resultados se deben interpretar con mucho cuidado porque no se puede determinar si el VHC es la causa de la enfermedad o sólo es un factor asociado, si la infección es actual o es una reinfección, o si por una activación policlonal defectiva, se generan anticuerpos de reacción cruzada contra el VHC. La purificación de factores de coagulación a través de anticuerpos monoclonales, no es suficiente para impedir la transmisión del VHC (19).

La detección de ARN en suero de pacientes con HNANB, es

difícil debido a su baja concentración; sin embargo, por PCR, reamplificación del mismo (PCR-PCR') y producción de clonas específicas, se han podido detectar y comparar con la secuencia de "Chiron". y se ha demostrado gran diversidad en los aislamientos (11). Kubo (103) encontró un 79.8% de homología entre nucleótidos y 92% entre aminoácidos en sus aislados con la secuencia de "Chiron".

Otra técnica empleada ha sido la quimioluminiscencia, que utiliza el antígeno marcado con sales de acridina, para detectar el anticuerpo del paciente, o marcar el antígeno con biotina y luego una anti-biotina marcada con la sal de acridina; los resultados son semejantes al ELISA (81). La inmunofluorescencia también ha sido utilizada para detectar el antígeno en el hígado de chimpancés infectados (102).

Cultivos de hepatocitos de primates suplementados con factores de crecimiento y hormonas, han permitido cultivar y replicar el VHB, el agente D y el VHC lo que se verifica por ME al distinguir partículas semejantes a virus de un diámetro de 39 a 46 nm, con una envoltura y una cubierta interna de 37 nm, lo que demuestra que si se puede cultivar (91).

En cuanto a tratamientos, se han ensayado los mismos que para la HANANB. El  $\alpha$ ,  $\beta$  y gama interferón han dado buenos resultados (5, 34, 181). Reizu-boj (154) observó que el interferón induce la modulación positiva del subgrupo de células llamadas células gamma-delta cuyo número aumenta en la hepatitis crónica con necrosis celular activa. Simon (169) habla también de un efecto beneficioso al administrar

Anti-VHC en forma pasiva a un paciente. El acyclovir oral no parece otorgar ningún beneficio (192), ni tampoco los esteroides (113).

Por lo tanto, se puede resumir que la hepatitis es causada por más de 5 agentes virales (cuadro 6).

CUADRO 6  
DIFERENTES TIPOS DE HEPATITIS VIRALES

Hepatitis	Agentes	Patología	Aislamiento	Diagnóstico	Tratamiento
A	VHA	ALT alta no cronicidad	Cultivo. Purificado de heces	IgM Anti-VHA	Ninguno Hay vacuna
B	VHB	ALT alta 10% de cronicidad	Purificado de suero. Clonaje. Modelos animales	IgM Anti-HBc HBsAg Anti-HBs Anti-HBe HBeAg	Alfa y Beta interferón Hay vacuna
C	VHC	ALT leve o moderada 50% de cronicidad	Segmento de ARN aislado de hígado	IgM Anti- VHC	Alfa y Beta interferón No hay vacuna
D	VHD	Depende de infección por VHB	Encapsidado en HBsAg	IgM Anti- VHD	Ninguno No hay vacuna
E	VHE	ALT alta no cronicidad alta mortalidad en embarazadas	Purificado de bilis. Clonado	IgM Anti- VHE	Ninguno No hay vacuna
NANB	Virus semeja al VHB Otros	ALT leve o moderada 50% de cronicidad	No	Por exclusión	Alfa y Beta interferón

## MATERIALES y METODOS

### I- Sistema serológico NANB-ICMRT:

Se tomaron 30 sueros (20 con numeración par y 10 impar) pertenecientes al sistema serológico NANB-ICMRT descrito por Villarejos *et al.* (198, 199). Los sueros 19 y 36 fueron los que reaccionaron contra todos los otros sueros del grupo con buena reproducibilidad, por lo que se escogieron como los representantes del sistema en estudio para todos los análisis posteriores. El suero 19 corresponde a un donador sano de 18 años de edad con todos los marcadores conocidos de hepatitis negativos y valores de ALT normales por un período de más de 5 años. El suero 36 corresponde a un contacto no familiar ni sexual del donante 19, masculino de 35 años, sin hogar, que era albergado por la familia del 19. Se utilizaron 3 técnicas serológicas diferentes para el estudio del sistema:

#### 1- Reoforesis.

Se siguió el método descrito por Villarejos (198), que consiste en: preparar placas de agarosa 0.8% en tris EDTA 0.1 M pH=7.6 (TE), colocar 50µl del suero 19 o 36 en el pozo central y 50µl de muestra en los 6 pozos de alrededor. Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente (TA) por 48 h y analizar las bandas de precipitación que se forman.

#### 2- Inmunoaderencia.

Se titularon suero de cuilo para complemento,

eritrocitos del grupo sanguíneo O que no presentaran reacciones débiles o inespecíficas, el suero 19 y el 36, para obtener las diluciones óptimas para el buen funcionamiento de la prueba. Los 3 sueros se diluyeron 1:100 y los eritrocitos a la dilución cuya hemólisis correspondiera a una lectura de 1.2 de densidad óptica a 540 nm. A cada muestra se le agregó  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final del 1% y se incubó 15 min a TA, luego se diluyeron 1:10 en tampón barbital 0.19 M, gelatina 0.12%, pH=7.4 (TBG). Se colocaron 25 $\mu$ l de TBG en cada uno de los pozos de una placa de fondo en U (Linbro/Titertek, 76-311-05, Flow Laboratories). Se agregaron 25 $\mu$ l de cada muestra diluida en el primer pozo de cada hilera y se hicieron diluciones seriadas dobles. A cada pozo se le agregó 25 $\mu$ l del suero 19 o 36 diluido 1:100 en TBG, se incubó 45 min a 56°C y 1 h a 37°C. Se agregaron 25 $\mu$ l del complemento diluido en TBG y se incubó 40 min a 37°C. Se añadieron 25 $\mu$ l de ditiotreitól (DTT) 0.2 M en TBG y 25 $\mu$ l de los eritrocitos diluidos en el mismo tampón. Se agitó e incubó al menos 1 h a TA y se observó aglutinación.

### 3- ELISA.

Se tomaron 7ml de los sueros 3, 5, 7, 19, 36, 38 y sueros negativos por el sistema y se pasaron por una columna de Sephacryl-300 con tampón tris 0.01M, NaCl 0.5M, pH=7.4 (T-Na) (Pharmacia 1978). Se recogieron fracciones de 1 ml y cada una fue evaluada por IA, luego se hizo un "pool" con las fracciones positivas del suero 36 y se diluyó 1:20 en tampón

de recubrimiento (TR), 3 partes de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M y 7 partes de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M a pH=9.6, esto se usó para recubrir tiras de 8 pozos (Nunc 4-69649, Microwell Module F8), con 100 $\mu$ l en cada uno. Estas fracciones se concentraron de 5 a 10 veces en conos Centriflo (Amicon CF50A) y las proteínas se conjugaron con fosfatasa alcalina por el método del glutaraldehído (83). Se diluyeron las muestras 1:2 en PBS 4% de albúmina bovina, 0.05% Tween (PAT) y se colocaron 100 $\mu$ l de cada una en los pozos que se incubaron 1½ h a 40°C. Se lavaron 3 veces con PBS Tween-20 0.5%. A cada pozo se le agregó el conjugado a una dilución de 1:300 en PAT y se incubó de la misma manera. Se agregó el p-nitrofenilfosfato y se leyó 1 h después a 405 nm en el lector de ELISA. Se consideraron positivas todas aquellas muestras con valores mayores a 2.5 veces el valor del control negativo.

## II- Caracterización del Sistema.

### 1- Anticuerpos policlonales.

Se inyectaron 6 conejos vía intramuscular con un macerado de 20 bandas de precipitación por reoforesis del sistema NANB-ICMRT, con adyuvante completo de Freund. Se dió un refuerzo a los 15 días con adyuvante incompleto.

### 2- Anticuerpos monoclonales.

Se inmunizaron 4 ratones Balb/c con el mismo macerado y se procedió a la formación de un hibridoma según el método descrito por Köeler y Milstein en 1975 (100). La presencia de anticuerpos producidos por cada una de las clonas obtenidas

fue evaluada por ELISA. Este proceso fue repetido en dos oportunidades más.

### 3- Tratamientos Bioquímicos:

Los sueros 19 y 36 fueron sometidos a los siguientes procesos: Purificación por columnas de proteína A, Sepharosa 6B-CL y Sepharosa azul (138), precipitación con sulfato de amonio al 30% y 35%, temperaturas de 56°C por 1 h, 60°C por 1 h y ebullición 5 min, resistencia a pH=2, 5, 9 y 13, tratamiento con proteasa (P-4130 Sigma) , tripsina(T-8253, Sigma), quimotripsina (C-3142, Sigma) y neuraminidasa (N-2876 Sigma) todas a 1.0 mg/ml 1 h a 37°C., tratamiento con mercaptoetanol al 1%, 2% y 5% y de óxido-reducción con cloramina T y metabisulfito de sodio a 1 mg/ml, adsorción con eritrocitos del grupo sanguíneo A, B y O. Cada proceso fue evaluado por ELISA e IA después de terminado el tratamiento.

### 4- Cromatoenfoque en columna.

El punto isoeléctrico de ambos reactivos fue calculado al pasar las fracciones obtenidas en la columna de Sephacryl-300 por una columna de cromatoenfoque de Pharmacia según el método descrito por dicha casa en 1982 (139). Además, se corrieron geles de agarosa para punto isoeléctrico, con transferencia a nitrocelulosa por el método automático de Pharmacia o Phast System.

### 5- Western Blot.

Se corrieron geles de acrilamida al 8% y 12% para SDS-PAGE según Laemmli (105), con transferencia a

nitrocelulosa (147). En cada corrida se montaron los sueros 19 y 36, así como otros sueros del sistema, sueros negativos y positivos conocidos y de los distintos grupos sanguíneos. Cada papel de nitrocelulosa fue incubado con el suero 19 o el 36 diluido 1:50 en PBS 2% de caseína 0.01% Tween (PCT) 16 hrs a TA. Luego el papel se lavó 3 veces y se agregó Anti-IgG y Anti-IgM humanas marcadas con biotina diluidas 1:5000 en PCT (B-1140 y B-1265 Sigma) y se incubó 1½ h a TA, se lavó 3 veces. A cada papel se agregó extra-avidina marcada con fosfatasa alcalina diluida 1:4000 en el mismo tampón (E-2636 Sigma) y se reveló con sustratos precipitables "p-nitro blue tetrazolium" (NBT) (Bio-Rad 170-6532) y "5-bromo 4-cloro indolil fosfato" (BCIP) (Bio-Rad 170-6539).

### III- Análisis del Sistema en Diferentes Poblaciones:

#### 1- Muestras.

Se analizaron 3663 muestras de los siguientes grupos: 52 casos seriados de hepatitis agudas y crónicas clasificadas como HNANB. Estos casos pertenecen a un estudio de hepatitis realizado en San Ramón y Palmares (199). En este estudio se utilizó la siguiente definición de HNANB: casos de hepatitis aguda con elevación de ALT, AST o ambas, negativos por IgM Anti-VHA, por los marcadores de hepatitis B aguda o crónica y de CMV ya mencionados y de EBV; 26 casos con diagnóstico de hepatitis de diferentes hospitales con marcadores de VHA, VHB y CMV negativos; 156 muestras de casos de hepatitis A agudos, seleccionados por serología al presentar IgM Anti-VHA

positiva; 206 muestras de casos de hepatitis B agudos y crónicos (Caso Agudo: IgM Anti-HBc positiva con o sin otros marcadores. Caso Crónico: IgM Anti-HBc negativa, HBsAg positivo, IgG Anti-HBc positiva con o sin HBeAg o Anti-HBe); 71 muestras con IgM Anti-CMV positiva o con título de IgG Anti-CMV >12800 por ELISA; 136 muestras de hemofílicos del banco de sueros del ICMRT; 86 muestras de 38 pacientes de hemodiálisis del Hospital México, recolectadas durante un brote de hepatitis B; 21 miembros del personal de la unidad de hemodiálisis y 27 familiares de los pacientes; 300 muestras de personas que asisten a la consulta antivenérea del Ministerio de Salud (personas de comportamiento sexual promiscuo), con títulos de VDRL entre 2 y 64 diluciones; 60 muestras de pacientes diabéticos del Hospital Calderón Guardia; 300 muestras de mujeres embarazadas que acudieron a consulta prenatal en 7 hospitales del país (Escalante Pradilla, Valverde Vega, San Juan de Dios, Liberia, Tony Facio, Monseñor Sanabria y San Carlos); 710 muestras de donantes voluntarios sanos de Costa Rica (310 de San Isidro del General y 400 de San Carlos); 1000 muestras de donantes voluntarios sanos de Tegucigalpa y Honduras y 560 muestras de donantes voluntarios sanos de El Salvador.

## 2- Marcadores del sistema NANB-ICMRT.

Cada una de las muestras fue analizada por las metodologías de reoforesis, ELISA e IA ya descritas para la caracterización del sistema. La IA se eligió como la técnica de referencia.

### 3- Marcadores de Hepatitis A, B y CMV.

La determinación de ALT se llevó a cabo por el método colorimétrico (97) en todos los casos y en el resto de las muestras por el método de LUV de Abbott en los laboratorios de procedencia.

Todas las muestras fueron evaluadas por HBsAg y Anti-HBs por un RIA producido en el ICMRT según el método descrito por Walsh en 1970 (202). Todos los casos y aquellas muestras HBsAg positivas se evaluaron por IgM Anti-HBc, HBeAg, Anti-HBe y por RIA producidos en el ICMRT según metodologías ya descritas (39, 46). Todos los casos fueron analizados por la técnica de IA descrita por Tsuda en 1975 (188) para determinar títulos de IgG Anti-HBc y para determinar la IgM Anti-VHA se utilizó un RIA descrito por Decker en 1981 (46) y producido en el ICMRT. La IgM Anti-CMV se analizó por un RIA desarrollado recientemente en el ICMRT de la siguiente forma: se cubrieron tiras de 12 pozos de poliestireno (Immulon 2, 011-010-6302 Dynathec) con 100µl de Anti-IgM humana desarrollada en conejo a 10 mg/ml (Accurate A091) y diluida 1:10000 en TR; se agregaron 100µl de cada muestra diluida 1:100 en PBS, 10% de suero fetal bovino y 0.5% de Tween-20 (PST). Se incubó 1½ h a 40°C, se lavó 3 veces con PBS Tween 0.5% y se agregaron 100µl de CMV comercial (AD169 Advanced Biotechnologies), marcado con <sup>125</sup>I por el método de la cloramina T (83). Se incubó 1½ h a 40°C, se lavó y se analizó en un contador gamma (ANSR de Abbott). La técnica de ELISA para detectar las IgGs se desarrolló de la siguiente

manera: Placas de poliestireno (Immulon M129A, Dynathec), se cubrieron con 100µl de CMV comercial diluido 1:2000 en TR. Se agregaron 100µl de cada muestra en diluciones seriadas desde 1:800 hasta 1:25600 en PST, se incubaron 1½ h a 40°C y se lavaron 3 veces. Luego se agregaron 100µl de Anti-IgG humana desarrollada en conejo (Accurate, A090), marcada con fosfatasa alcalina por el método de glutaraldehído (94) y diluida 1:500 en PST. Se incubó 1½ h a 37°C, se lavó y se agregó el sustrato (p-nitrofenilfosfato), se incubó 1 h a 37°C y se leyó en un lector de ELISA a 405 nm (Reader 510 Organon Teknika).

#### 4- Determinación de Anti-VHC.

La prueba de anti-VHC se llevó a cabo por el método de ELISA comercial de Abbott en las instalaciones de la compañía en Estados Unidos. Se colocaron 200 µl de la muestra diluida 1:40 en una placa, se le agregó una perla cubierta con el antígeno. Se incubó 1 h a 40°C, se lavó y se agregó el conjugado Anti-humano peroxidasa, se volvió a incubar 1 h a 40°C, se lavó y se agregó el sustrato respectivo. Se incubó 30 min a TA y se leyó la absorvancia a 490 nm.

#### 5- Estudios Preliminares con PCR.

Se estandarizó una técnica de PCR en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Louisiana, en donde se utilizan "primers" o imprimadores que corresponden a una región del HBsAg y a una del HBcAg.

## RESULTADOS

Los sueros pares del sistema utilizado en este estudio fueron positivos por IA y por reoforesis, mientras que los sueros impares fueron positivos por las tres metodologías. El suero 19 y el 36 presentaron los mayores títulos por IA (1:512, 1:1024, respectivamente).

### I- Caracterización del sistema.

Uno de los primeros pasos realizados para tratar de establecer la naturaleza del sistema en estudio, fue la producción de anticuerpos poli y monoclonales. Sin embargo, en cada una de las oportunidades, se obtuvieron muchas reacciones inespecíficas que no permitieron aislar un anticuerpo apropiado.

En la purificación de los sueros por la columna de Sephacryl-300, el 36 y el 38 presentaron una sección única de fracciones positivas por las técnicas de ELISA e IA, mientras que el 3, el 7 y el 19 presentaron 3 zonas, una inicial positiva sólo por ELISA, una intermedia positiva por ambas y una final positiva por IA (Fig. 1). Sueros negativos fueron purificados de la misma forma y sólo mostraron reacción débil al ELISA en 3 o 4 fracciones intermedias.

La purificación por columna de Sepharosa 6B, produjo una sección única de reactividad para ambos sueros del sistema, en las fracciones del 17 al 25 para el suero 36 y de la 18 a la 28 para el 19. En la columna de Sepharosa azul, la

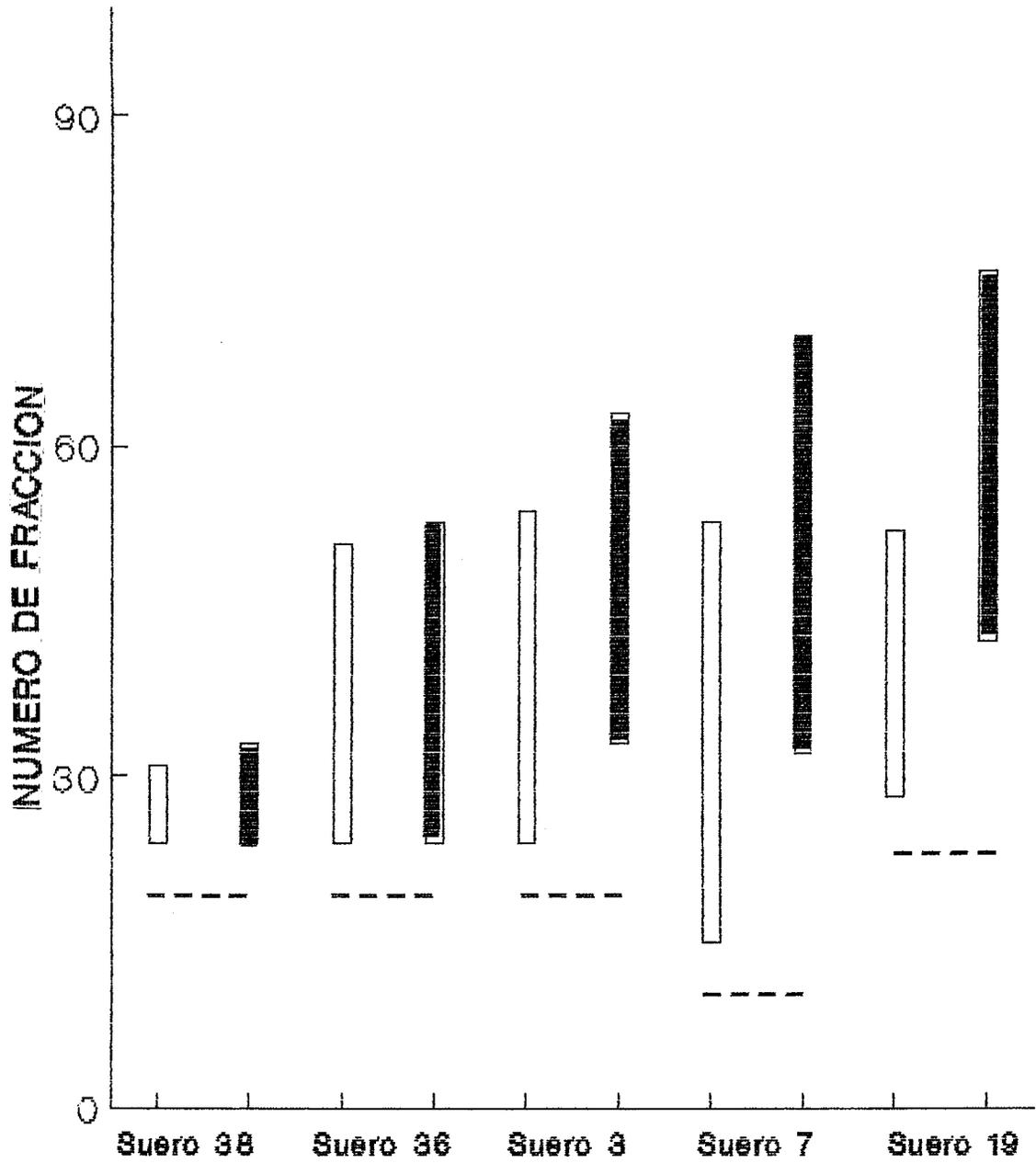


Fig. 1. Reacción por ELISA (■) y por IA (□) de las fracciones de cada uno de los sueros purificados por columna de Sephacryl-300.

actividad de ambos sueros se mantuvo en el pico I. Al pasarlos por columna de proteína A, la actividad del suero 36 fue detectada únicamente en el pico I y la del 19 como una reacción débil en el pico II.

Al tratar los sueros con sulfato de amonio al 30%, ambos precipitaron parcialmente, el 19 reaccionó tanto en el sobrenadante como en el precipitado y el 36 sólo en el sobrenadante. Con sulfato de amonio al 35% la precipitación fue completa y ambos sueros reaccionaron tanto en el sobrenadante como en el precipitado.

La reacción del suero 19 por ELISA e IA fue destruida al someterlo a ebullición por 5 min, pero el suero 36 no sufrió daño. Al someterlos a 56°C por 1h, ninguno de los sueros perdió su actividad; almacenados a -20°C o temperaturas menores se mantienen estables, pero en refrigeración el suero 19 disminuye su actividad después de 3 semanas.

Al ser sometidos a un pH extremo como pH=2 o pH=13, el suero 36 no perdió su actividad sino que disminuyó su título por IA a pH=13; por el contrario, el suero 19 si se destruyó. A pH=5 y pH=9 el suero 36 se conservó y el 19 disminuyó 1 o 2 títulos por IA.

El tratamiento con 2 proteasas, la tripsina y la quimotripsina, destruyó la actividad de ambos sueros. La neuraminidasa no le produjo daño al suero 36 pero bajó en 2 títulos la IA del 19.

El mercaptoetanol fue inocuo para ambos sueros a concentraciones  $\leq 2\%$  pero a mayor concentración se destruyó la

actividad de ambos. El proceso de óxido-reducción que se genera con cloramina T y metabisulfito de sodio para la marcación con  $^{125}\text{I}$ , produjo un leve cambio en el suero 36 porque disminuyó en 2 títulos por IA.

Tanto el suero 19 como el 36 se conservaron intactos al ser adsorbidos con eritrocitos lavados O y B (dos personas distintas por grupo). Sin embargo, al repetir el proceso con eritrocitos A, el suero 19 fue neutralizado. Debido a esto se estudio la relación del sistema con los grupos sanguíneos en las poblaciones de estudio. En donantes de CR y El Salvador la distribución fue de 57.0% y 63.7% de grupo O, 30.3% y 22.9% de grupo A, 11.3% y 12.0% de grupo B y 1.4% del AB en ambos. Al asociar esto con la IA para NANB se obtuvo que un 94% de los sueros que son positivos por antígeno son del grupo A y que un 100% de los positivos por anticuerpo son del grupo O (Cuadro 7). En Honduras, se obtuvieron los grupos únicamente de los sueros positivos por alguno de los marcadores estudiados y todos los sueros positivos por antígeno fueron de tipo A y los positivos por anticuerpo son de tipo O, lo que coincide con los otros 2 países. En los hemofílicos, sucedió lo mismo para los positivos por anticuerpo, pero los antígenos se distribuyeron en una forma más homogénea, con 48% de grupo A, 36% de grupo O y 16% de grupo B (Cuadro 7).

El punto isoeléctrico (PI) de ambos sueros fue determinado en las fracciones purificadas por columna de Sephacryl-300, el suero 19 presentó 2 zonas de actividad a

CUADRO 7  
RELACION ENTRE EL GRUPO SANGUINEO Y EL SISTEMA SEROLOGICO  
NANB-ICMRT EN COSTA RICA Y EL SALVADOR

Poblacion de donantes	N	Marcador del Sistema (IA)	Grupo Sanguíneo			
			O	A	B	AB
Donantes Costa Rica	710	Antígeno	1	31	1	0
		Anticuerpo	63	0	0	0
Hemofílicos Costa Rica	119	Antígeno	9	12	4	0
		Anticuerpo	7	0	0	0
El Salvador	573	Antígeno	1	24	0	1
		Anticuerpo	43	0	0	0
Total	1359					

pH=4.5 y a pH=7.0 y el 36 presentó su PI a pH= 2.3 (1.3-2.8). En geles de acrilamida con anfolitos en el rango de 4.0 a 6.5 y en el de 5.0 a 8.0, no se reveló ninguna banda específica por tinción o por revelado inmunológico con los reactivos del sistema.

En los Western Blots en que se corrió el suero 19 y fueron revelados con el suero 36, se visualizaron bandas de 100, 66, 45, 40, 32 y 21 kd y en aquellos en los que se corrió el 36 y se revelaron con el 19, se observaron bandas de 200, 120, 97, 66, 50 y 42 kd. Las bandas de 200 y 120 kd aparecieron también en algunas oportunidades cuando se corrieron sueros del grupo sanguíneo A negativos por el sistema y que eran revelados con el suero 19 (Fig. 2).

## II- Análisis del sistema en diferentes poblaciones.

### 1- Marcadores de Hepatitis A, B y CMV.

La prevalencia de hepatitis B (HBsAg+Anti-HBs), en las poblaciones estudiadas osciló entre el 3.1% en los donantes de Honduras y el 76.3% en pacientes de la unidad de hemodiálisis (Cuadro 8). San Isidro del General, CR, fue escogido para el estudio debido a su ya conocida alta prevalencia de hepatitis B, dato que fue confirmado al encontrarse un 34.6%. Todas las muestras HBsAg positivas fueron positivas por Anti-HBe. En todos los sueros la IgM Anti-VHA fue negativa excepto en los 156 casos de Hepatitis A, y todos los casos fueron negativos por IgM Anti-CMV, con títulos de IgG  $\leq 1:3200$  excepto en las muestras seleccionadas

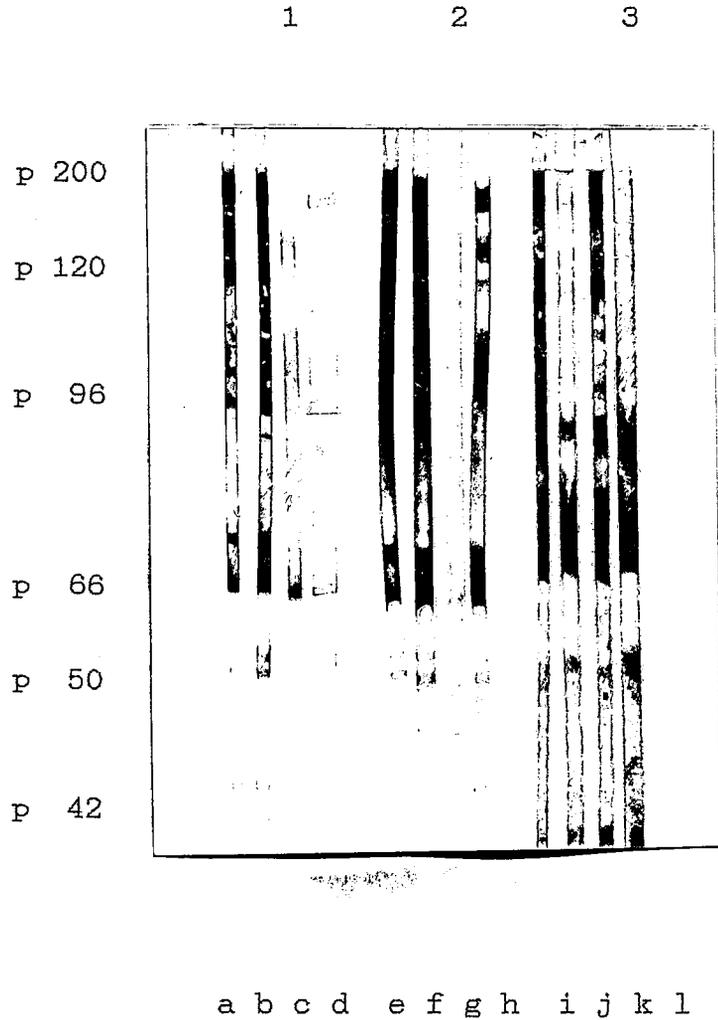


Fig. 2. Gel de SDS-PAGE al 8%. 1-Suero de un donante positivo por el antígeno del sistema revelado con dos sueros positivos por anticuerpo (a,b) y dos sueros negativos (c,d). 2-Suero de un donante negativo por el antígeno del sistema pero del grupo sanguíneo A, revelado con dos anticuerpos positivos (e,f) y dos negativos (g,h). 3-Suero 36 revelado con 2 anticuerpos positivos (i,k) y dos negativos (j,l).

CUADRO 8  
PREVALENCIA DE HEPATITIS B EN POBLACIONES ESTUDIADAS

Población	N	HBsAg RIA	Anti-HBs RIA	Prevalencia (%)
Diabéticos	60	1	2	5.0
Mujeres Embarazadas	300	3	34	12.3
Donantes San Isidro	310	6	129	43.6
Donantes San Carlos	400	3	49	13.0
Donantes Tegucigalpa	1000	2	29	3.1
Donantes El Salvador	578	3	40	7.4
Consulta Antivénerea	300	2	23	8.4
Pacientes Hemofílicos	136	1	54	40.4
Pacientes Hemodiálisis	38	18	11	76.3

por IgM Anti-CMV, y títulos  $\geq 1:12800$ .

La mayoría de las muestras de donantes evaluadas por sus niveles de ALT, presentaron valores menores a dos veces el promedio de cada grupo, tanto en CR como en Honduras y El Salvador. El comportamiento en los valores altos, esto es,  $\geq 2.0$  veces el valor promedio, es semejante en las 3 poblaciones, con un leve aumento en el rango de 3.0 a 5.0 veces el valor promedio. Sin embargo, se observan porcentajes 2 a 3 veces más bajos en CR, debido a que las determinaciones se realizaron semanalmente (Fig. 3).

En el estudio de casos de hepatitis, los 95 casos de hepatitis A aguda evaluados, presentaron niveles de ALT elevados, con un 65.3% con valores superiores a 250 UI/l. En hepatitis B, 57 de los casos seroconvalecientes y 25 crónicos presentaron niveles de ALT menores a 50 UI/l y en 102 de los casos agudos un 10% tuvo valores menores de 50 UI/l, pero se catalogaron como hepatitis agudas por presentar IgM Anti-HBc positiva y 74.4% con valores superiores a 250 UI/l. De los casos clasificados como HANANB agudos y 8 crónicos, 27.4% presentaron valores  $\leq 50$  UI/l, pero con valores altos de AST, con un predominio entre 50 y 250 UI/l (Fig. 4).

## 2- Inmunoadherencia.

En las poblaciones de donantes con valores de ALT menores a 2.5 veces el promedio de la población, la prevalencia del sistema por IA osciló entre el 9.6% y el 14%. En las subpoblaciones de ALT  $\geq 2.5$  veces el valor promedio,

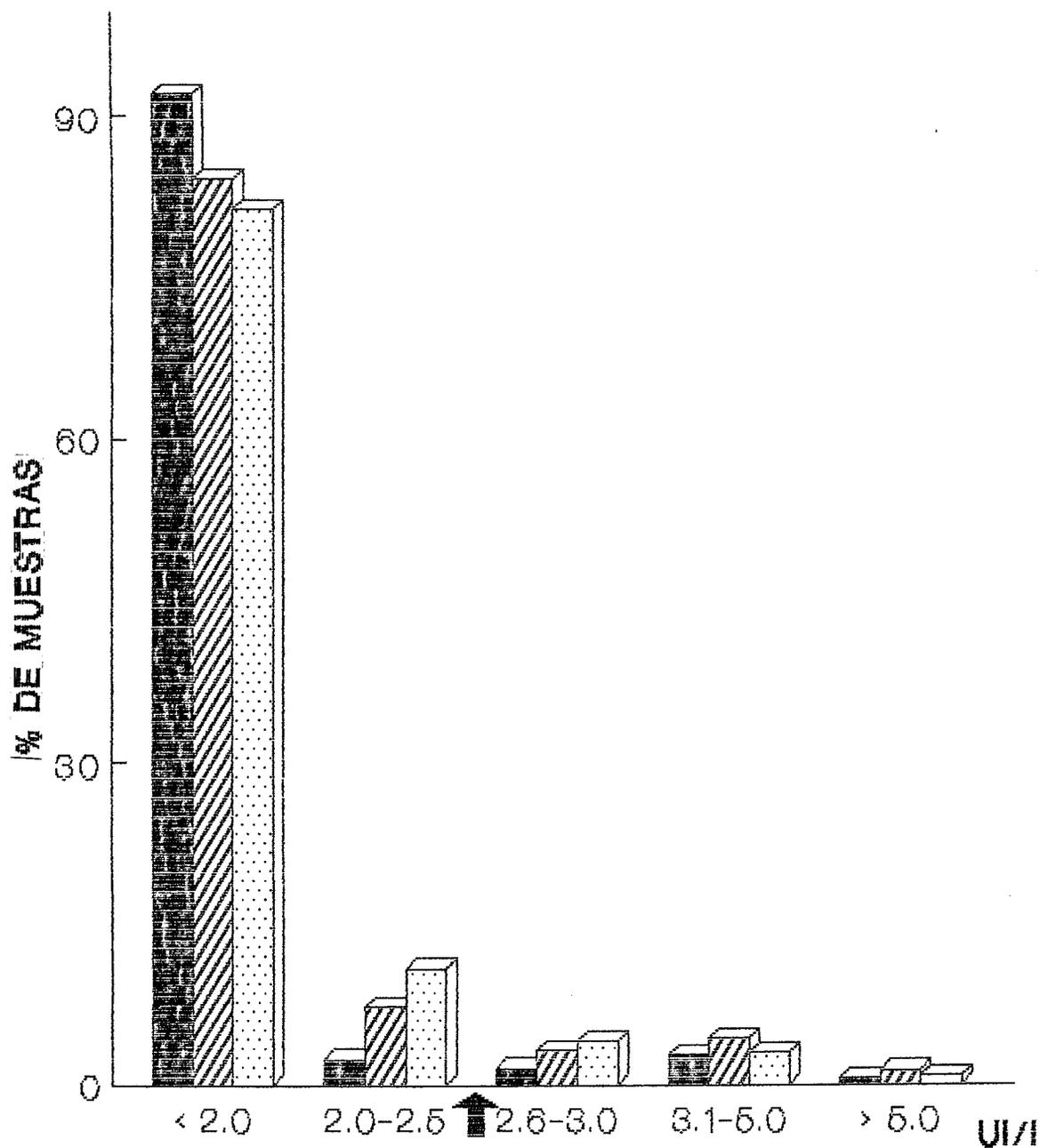


Fig. 3. Distribución de los niveles de ALT en donantes de Costa Rica (■), Honduras (///) y El Salvador (⋮). La flecha indica que valores superiores a ese punto son patológicos.

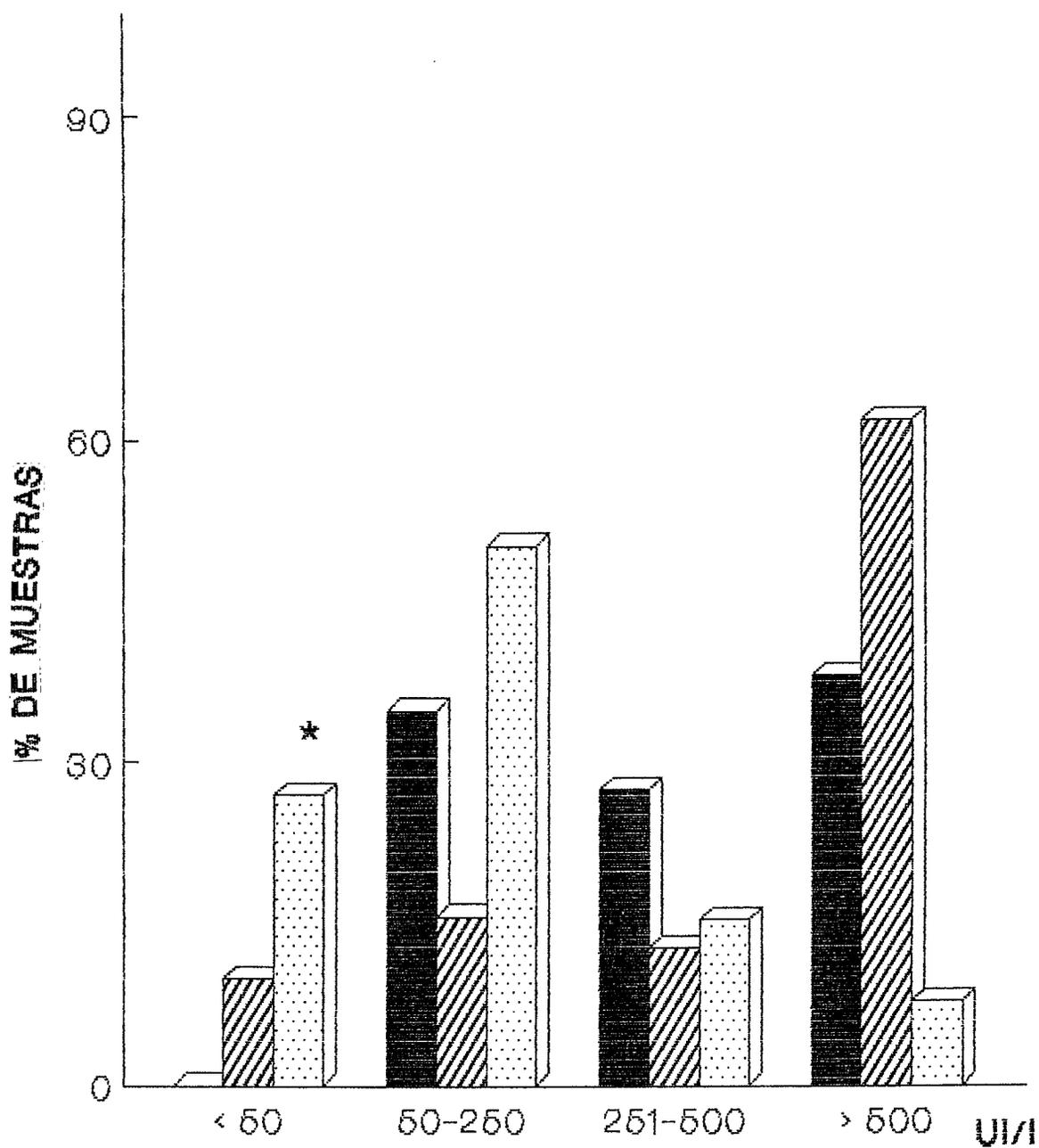


Fig. 4. Distribución de los niveles de ALT en los casos de hepatitis A (■), hepatitis B (///) y HNANB (●●●). El \* indica que esos casos de HNANB presentaron AST alterada.

consideradas de importancia para la HNANB, la prevalencia del sistema no presentó cambios apreciables (Cuadro 9).

El análisis de la influencia del Anti-HBs o de la importancia del mismo como marcador indirecto para el sistema, no mostró ninguna relación en las poblaciones de donantes excepto en Honduras donde el anticuerpo del sistema aumentó cerca de 5 veces en las muestras Anti-HBs positivas (Cuadro 10). Las mujeres embarazadas positivas por HBsAg y 31 de 34 positivas por Anti-HBs fueron negativas por IA del sistema serológico NANB-ICMRT. Del total estudiadas, 3.0% presentaron antígeno y 11.0% anticuerpo para una prevalencia del 14%. En los diabéticos, el antígeno se detectó en un 11.7%, de los cuales sólo uno tenía Anti-HBs y el anticuerpo en un 8.3% lo que correspondió a 20% de prevalencia. De la población del Ministerio de Salud (VDRL +), 8.3% presentaron antígeno y 14.7% anticuerpo, para una prevalencia del 23%. Los 2 HBsAg de esta población fueron negativos por el sistema y 1 de 23 Anti-HBs fue positivo por el antígeno del sistema y 4 por el anticuerpo. En pacientes de hemodiálisis, 76.3% fueron positivos por marcadores para hepatitis B por ser muestras obtenidas durante un brote de hepatitis B. Para el sistema en estudio, la presencia de anticuerpo fue de un 29.0% y de antígeno, que se evaluó sólo en 14 muestras, fue de 21.4% (Cuadro 11). En 21 miembros del personal de la unidad de hemodiálisis y 27 familiares de los pacientes, sólo 1 de cada grupo presentó HBsAg y 4 de cada uno Anti-HBs, 9 (43%) miembros del personal y 1 de los

CUADRO 9  
DISTRIBUCION DE LOS MARCADORES DEL SISTEMA SEROLOGICO  
NANB-ICMRT EN DONANTES SEGUN LOS NIVELES DE ALT\*

Población	N	Marcadores del Sistema		Prevalencia (%)
		% Antígeno	% Anticuerpo	
San Isidro	302 <sup>^</sup> 8 <sup>■</sup>	6.0 12.5	6.0 -	12.0 12.5
San Carlos	370 <sup>^</sup> 30 <sup>■</sup>	3.2 3.3	10.8 10.0	14.0 13.3
Honduras	914 <sup>^</sup> 86 <sup>■</sup>	2.7 5.8	6.9 3.5	9.6 9.3
El Salvador	524 <sup>^</sup> 44 <sup>■</sup>	5.0 -	7.8 4.5	12.8 4.5
Total	2278			

\*= El valor promedio de ALT UI/1 fue de 23.6 para San Isidro, 27.0 para San Carlos, 22.3 para Honduras y 32.0 para El Salvador.

<sup>^</sup>= Muestras de suero con ALT <2.5 veces el valor promedio.

<sup>■</sup>= Muestras de suero con ALT ≥2.5 veces el valor promedio.

CUADRO 10  
 DISTRIBUCION DE LOS MARCADORES DEL SISTEMA SEROLOGICO  
 NANB-ICMRT EN DONANTES SEGUN PRESENCIA O AUSENCIA DE ANTI-HBs

Población	N	Marcadores del Sistema		Prevalencia (%)
		% Antígeno	% Anticuerpo	
San Isidro	129* 181^	6.2 6.1	3.1 7.7	9.3 13.8
San Carlos	76* 324^	2.6 3.4	11.8 10.5	14.5 13.9
Honduras	30* 970^	3.3 6.3	16.7 3.0	20.0 9.3
El Salvador	40* 538^	5.0 4.5	7.5 7.4	12.5 11.9
Total	2278			

\* = Muestras de suero positivas por Anti-HBs.

^ = Muestras de suero negativas por Anti-HBs.

CUADRO 11  
 RELACION ENTRE LOS MARCADORES VIRALES DE HEPATITIS B Y NANB  
 EN DIFERENTES GRUPOS

Población	Marcador del Sistema	Anti-HBs Positivo	HBsAg Positivo	VHB Negativo (%)	Total (%)
Hemo_ diálisis	Antígeno	1/11	1/18	1/9	25.0
	Anticuerpo	4/11	2/18	5/9	28.9
Hemo_ fílicos	Antígeno	17/54	0/1	13/81	22.0
	Anticuerpo	2/54	0/1	6/81	5.9
Casos de Hepatitis B	Antígeno	15/131	1/35	0/29	7.7
	Anticuerpo	6/131	1/35	1/29	3.8

familiares presentaron anticuerpos y no se evaluaron por antígeno. En los hemofílicos, el portador de hepatitis B y 70.4% de los Anti-HBs, fueron negativos por IA, la prevalencia fue de 28.0%, con 22.1% de antígeno y 5.9% de anticuerpo (Cuadro 11).

Si se analizan ahora los diferentes tipos de hepatitis, en casos por VHA se presentó un 5.8% antígeno vs un 4.5% de anticuerpo. En muestras con marcadores de CMV fue de 9.9% y 7.0%, y en casos de VHB (Cuadro 11) fue de 7.8% y 3.8%, respectivamente. No hubo ningún aumento apreciable de la prevalencia del sistema con relación a los grupos de donantes ni con la presencia de Anti-HBs. En casos de hepatitis B, ninguno de los 12 sueros positivos sólo por IgM Anti-HBc o por Anti-HBe reaccionaron contra los marcadores del sistema. En las muestras con título de IgG Anti-CMV  $\geq 12800$  se presentaron más anticuerpos positivos del sistema, mientras que en muestras con títulos  $\geq 25600$  se detectaron más antígenos, pero los números fueron muy pequeños para evaluar si fue un efecto real (Cuadro 12). En los casos con marcadores de hepatitis A, B y CMV negativos, el sistema presentó una prevalencia de 34.6% (Fig. 5). De los casos catalogados como HNANB, 44 fueron agudos y 8 crónicos. En los agudos la prevalencia general fue de 48.1% (Fig. 5), o sea más alto que lo observado en los otros grupos analizados.

Con respecto a la distribución por sexo del sistema, en los casos de hepatitis B se comportó como se esperaba en este tipo de hepatitis con prevalencia en hombres. Sin embargo, en

CUADRO 12  
 DISTRIBUCION DE LOS MARCADORES DEL SISTEMA NANB-ICMRT SEGUN  
 MARCADORES DE CMV EN 71 MUESTRAS\*

Marcador por IA	Anti-IgM RIA	Anti-IgG 12800 EIA	Anti-IgG ≥25600 EIA
Antígeno del sistema	1/21	1/18	5/32
Anticuerpo del sistema	0/21	3/18	2/32

\* = Muestras de pacientes con adenopatías, TORCH o Hepatitis.

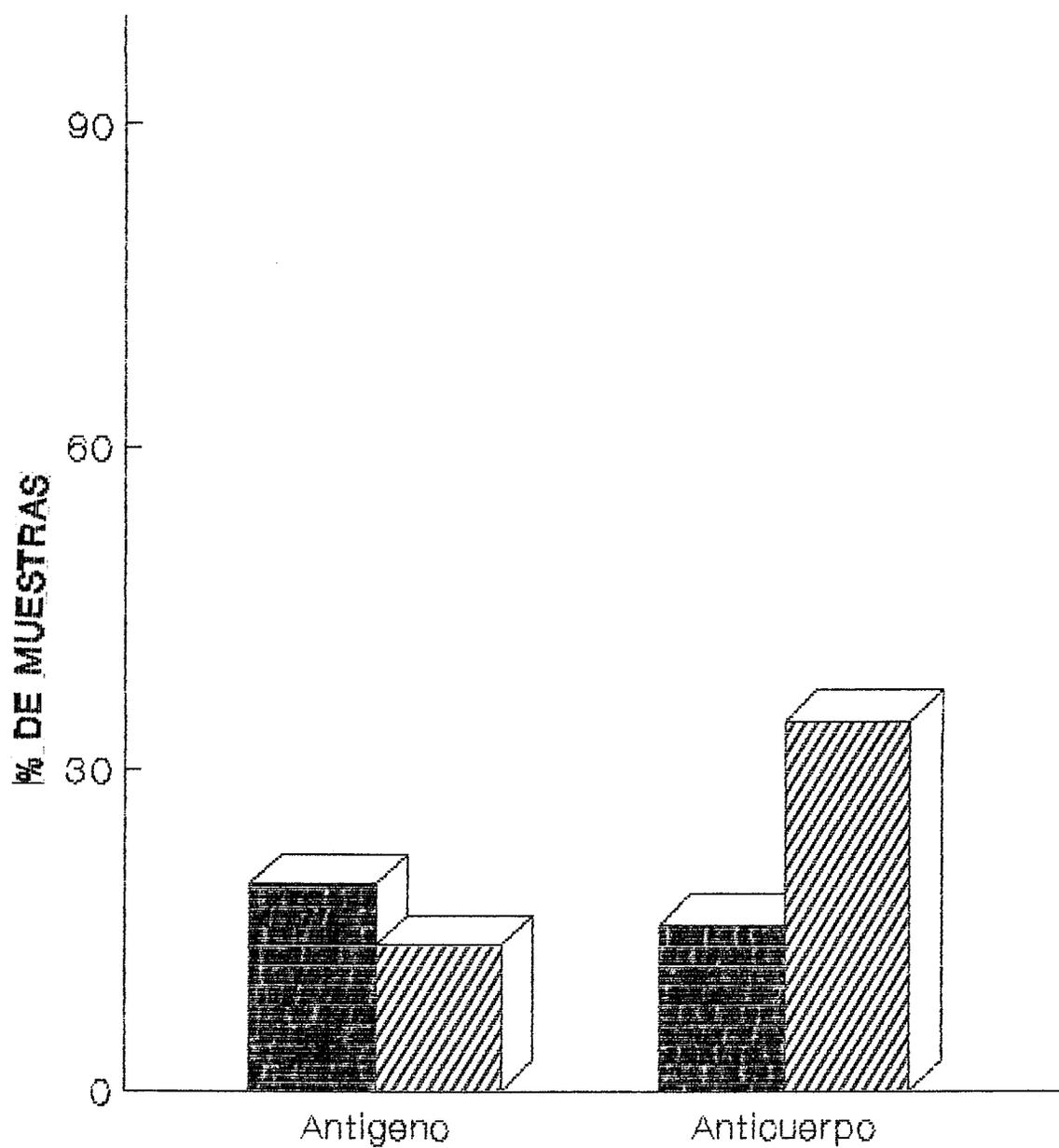


Fig. 5. Distribución de los marcadores del Sistema Serológico NANB-ICMRT en casos de hepatitis negativa por VHA, VHB y CMV (■) y casos agudos de HNANB (//). Algunos casos de HNANB tuvieron que ser excluidos por no contar con el análisis del antígeno.

casos de hepatitis A no hubo una distribución pareja, sino que predominaron las mujeres con marcadores positivos. En los casos de HNANB, 47.1% de mujeres y 55.6% de hombres fueron positivos por el sistema.

La distribución del sistema por grupo etario, también reflejó el comportamiento de este factor en los casos de hepatitis A o B. En los casos de HNANB, hubo una distribución muy homogénea en todas las edades, con un 72% de positivos entre los 10 y los 40 años. En la distribución por tipo de hemofilia, se destaca una prevalencia de antígeno en los hemofílicos B (Fig. 6).

### 3- ELISA

Cada uno de los grupos fue evaluado por la técnica de ELISA para detectar anticuerpos. La prevalencia osciló entre 11.6% y 84.6%, lo cual fue mucho más alto que lo obtenido por IA (Figs. 7 y 8). En las poblaciones de donantes y diabéticos, la reacción positiva por ELISA se mantuvo cerca del 15% excepto en Honduras donde se duplicó (Fig. 7). En las otras poblaciones se dio un aumento paulatino hasta presentarse una marcada positividad en embarazadas, en la población del Ministerio de Salud y en los hemodializados (Fig. 7). En los casos de las distintas hepatitis, la positividad fue cercana al 30% con un aumento apreciable en los 2 grupos de HNANB (Fig. 8). En los 26 casos de muestras negativas por VHA, VHB y CMV ésta positividad fue la mayor debido a que fueron seleccionados preferiblemente con este

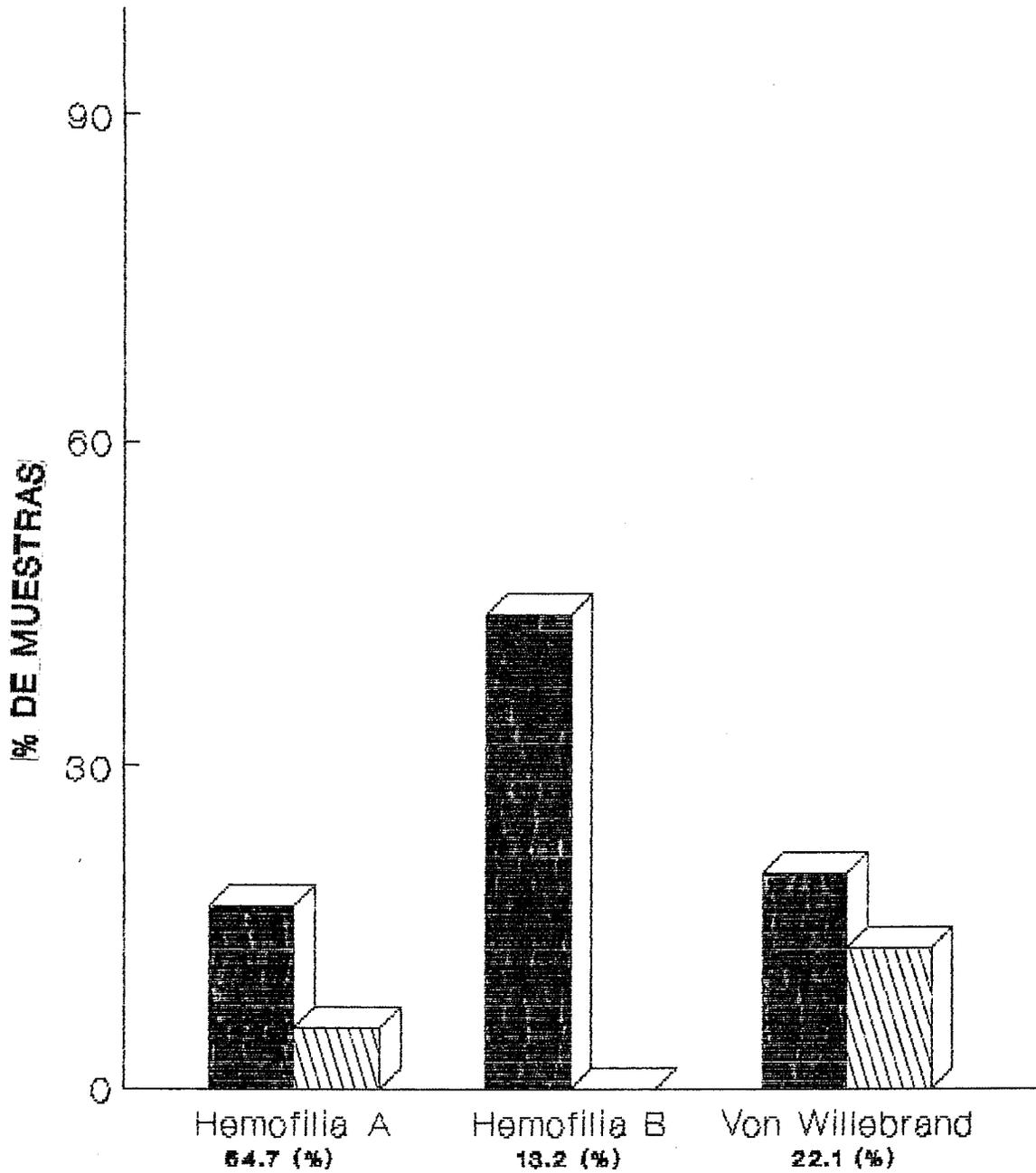


Fig. 6. Distribución del antígeno (■) y del anticuerpo (▨) del Sistema Serológico NANB-ICMRT por tipo de Hemofilia.

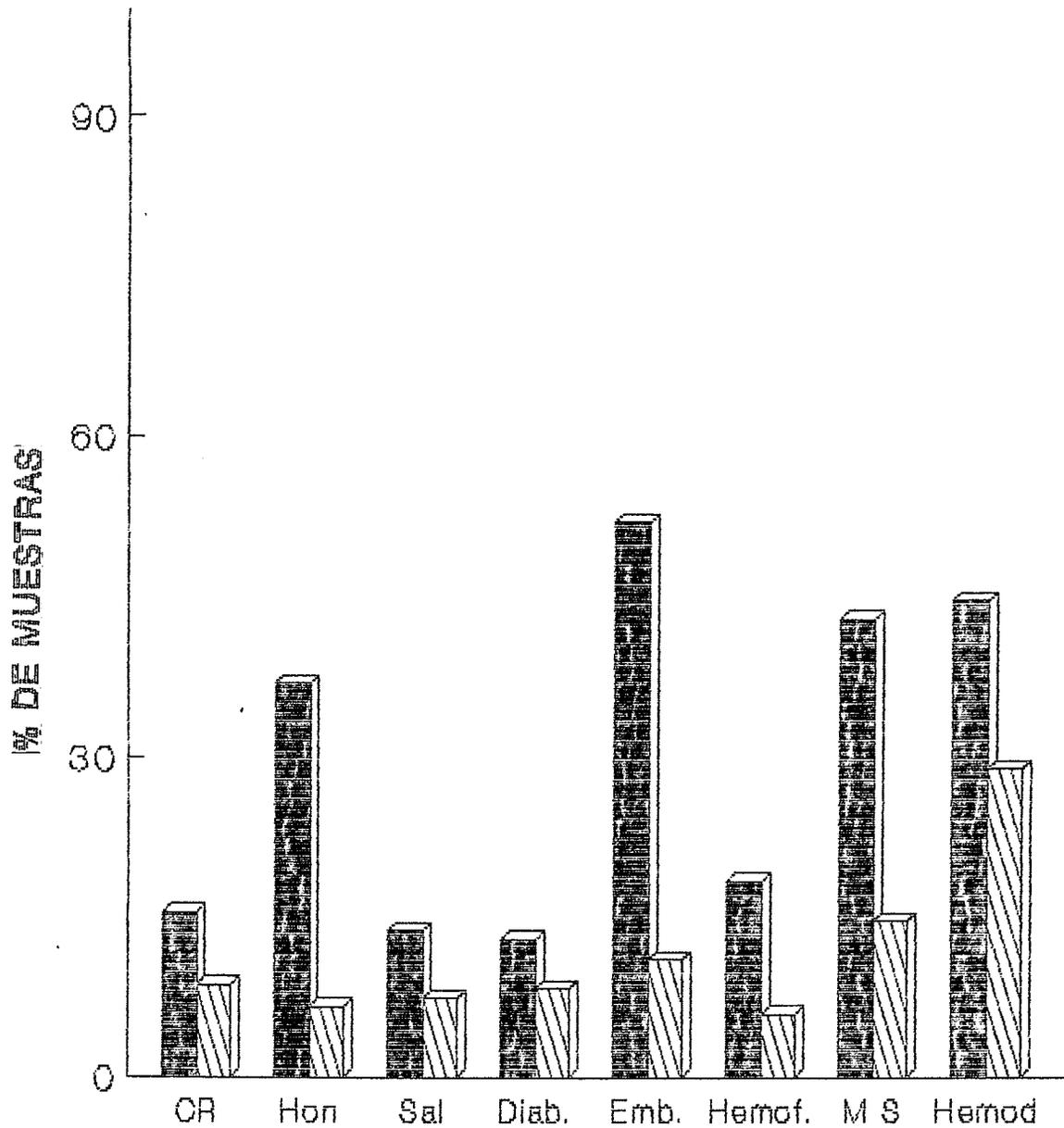


Fig. 7. Comparación de la detección del anticuerpo del Sistema Serológico NANB-ICMRT por ELISA (■) e IA (\\) en donantes de Costa Rica (CR), Honduras (Hon), El Salvador (Sal), diabéticos (Diab), embarazadas (Emb), hemofílicos (Hemof), población del Ministerio de Salud (MS) y hemodializados (Hemod).

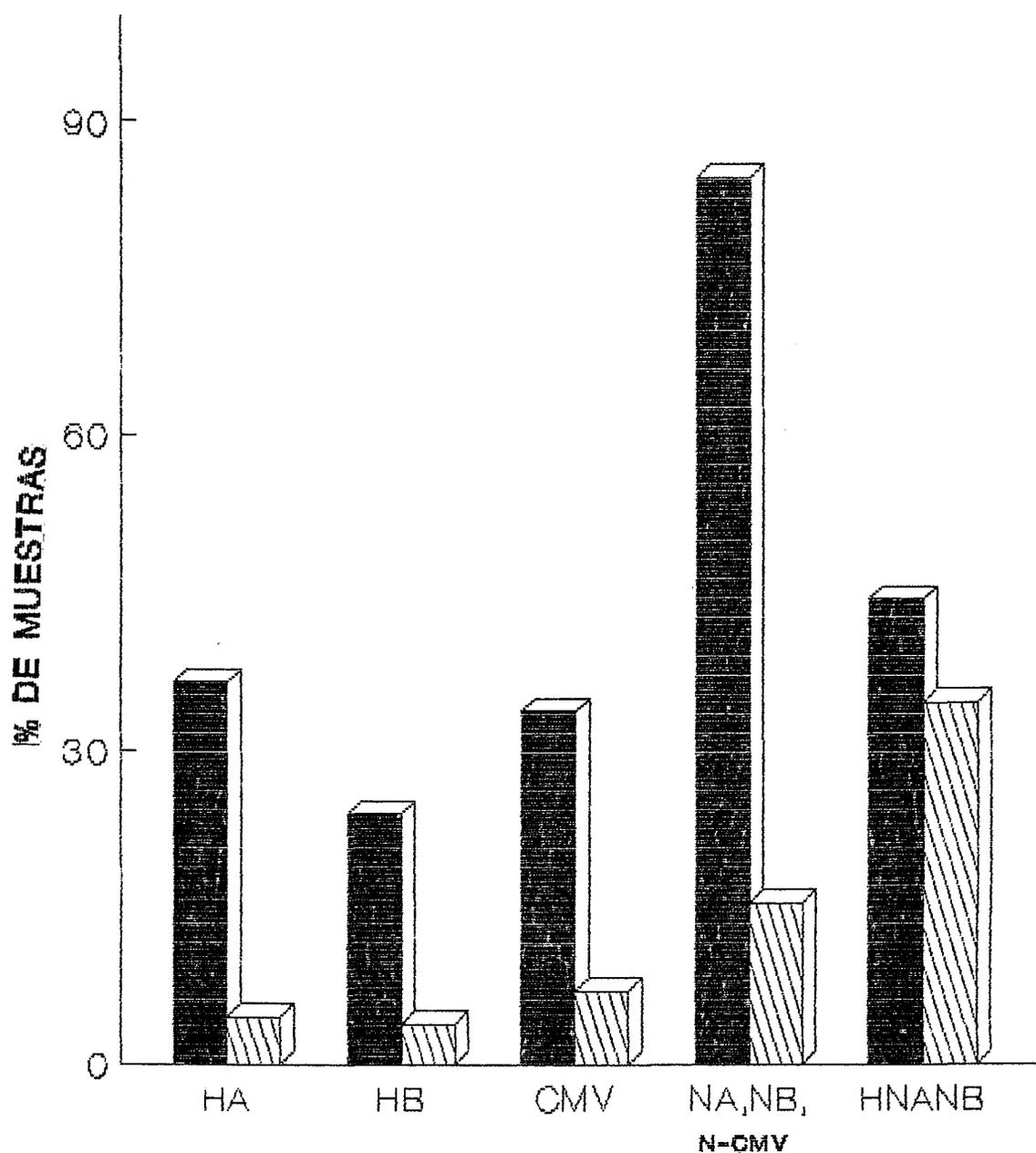


Fig. 8. Comparación de la detección del anticuerpo del Sistema Serológico NANB-ICMRT por ELISA (■) e IA (▨) en casos de hepatitis A (HA), hepatitis B (HB), muestras con marcadores de citomegalovirus (CMV), casos negativos por VHA, VHB y CMV (NA,NB,NCMV) y en casos agudos de NANB (HNANB).

marcador positivo. Se intentó diseñar un ELISA de competencia para la detección del antígeno; sin embargo, en 3 oportunidades con 3 modificaciones distintas no fue posible obtener resultados satisfactorios. La técnica de reoforesis dió resultados muy similares al ELISA en la detección de anticuerpos y un resultado de pocos positivos por antígeno con respecto a la inmunoadherencia (1 de cada 4).

#### 4- Determinación de Anti-VHC.

La técnica de ELISA para la detección de anticuerpos Anti-VHC reveló una prevalencia que osciló entre de 0.3% y 60.0% (Cuadro 13). De los 15 sueros positivos en donantes y mujeres embarazadas, 3 son anticuerpos del sistema positivo y de 100 sueros positivos en los pacientes de consulta antivenérea, hemofílicos y casos de HNANB, 18 presentaron antígeno y 1 anticuerpo.

#### 5- Análisis preliminares por PCR.

Se estudiaron 127 muestras de Honduras que presentaron positivo algún factor evaluado y 44 muestras de casos agudos de HNANB de CR, por PCR utilizando imprimadores de una región del HBsAg y HBcAg. De cada grupo, 29 fueron positivas, lo que representa cerca del 70% de los 44 casos (Cuadro 14).

CUADRO 13  
PREVALENCIA DE ANTI-VHC EN LAS DISTINTAS POBLACIONES DE ESTUDIO

Población	Anti-VHC
Donantes San Carlos	2/600
Donantes Honduras	5/1000
Donantes El Salvador	7/578
Mujeres Embarazadas	1/250
Consulta Antivenérea	22/124
Consulta Antivenérea 2	3/150
Prostitutas	3/150
Hemofílicos	75/125
Casos HNANB	3/52

CUADRO 14  
 REACCION AL PCR PARA HBsAg Y/O HBcAg EN 127 DONANTES  
 DE HONDURAS Y 44 CASOS AGUDOS DE HNANB

Marcador	Donantes (+)/N	Casos (+)/N
Antígeno	7/29	1/29
Anticuerpo	6/29	7/29
Anti-HBs+		
Anti-HBc	8/29	7/29
ALT		
>50 UI/l	14/29	15/29

## DISCUSION

Después del análisis realizado con los 2 sueros del sistema serológico NANB-ICMRT, se puede concluir que el suero 19 tiene componentes de naturaleza protéica con cierto grado de glicosilación, los cuales son purificados en el pico II de una columna de proteína A y son muy heterogéneos tanto en peso molecular como en PI. Todo esto concuerda con las características atribuidas a las inmunoglobulinas, por lo que se considera que en este suero se encuentra el anticuerpo del sistema. Por otra parte, el suero 36 presenta componentes protéicos de alto peso molecular en una región única semejante a otros sistemas estudiados (48, 52,53), su resistencia a condiciones extremas de pH y temperatura concuerda con las condiciones descritas en otros posibles agentes virales como el denominado cepa F (9, 14, 88, 137) aunque también se han observado posibles agentes lábiles como la cepa H (9, 14, 137, 147, 178) y el antígeno Ds (52, 53, 156, 215). Su PI es bastante ácido y no está asociado con la albúmina, por lo que se concluye que es el antígeno del sistema. Este enfoque es lo opuesto a lo que propusieron Villarejos *et al.* en 1983 (198).

Se evaluó la influencia del grupo sanguíneo sobre el sistema en estudio debido a la asociación con antígenos eritrocitarios descrita para otros sistemas (142). Se encontró una relación importante por lo que se planteó la hipótesis de si el sistema está relacionado con anticuerpos

contra antígenos del grupo ABO o si se trata de una reacción cruzada con un antígeno soluble del mismo. De ser un reconocimiento de grupo, el anticuerpo del sistema reconocería al antígeno en la mayoría de las personas grupo A. Sin embargo, sólo se obtuvo cerca de un 18%. Lo mismo sucedió con el anticuerpo y su predominio en el grupo O donde la positividad fue cercana al 19%. Queda entonces abierta la posibilidad de que se trate de una reacción cruzada entre una proteína normal y el antígeno del sistema. La predominancia del antígeno en los sueros grupo A, se explicaría por esta reacción cruzada que hace que el sistema inmune reconozca al antígeno como algo propio y por lo tanto no produzca los anticuerpos respectivos, pero en las personas grupo O y B los anticuerpos si se forman. La no detección de anticuerpos en personas grupo B en este estudio, se puede atribuir a la baja prevalencia de este grupo en la población de Centroamérica. En los hemofílicos la distribución del antígeno del sistema si fue más homogénea por factores que pueden atribuirse al alto grado de exposición de este grupo a componentes sanguíneos y a un sistema inmune que ya se encuentra alterado.

En los Western Blots se encontraron 2 bandas posiblemente asociadas al sistema, pero nuevamente dieron reacción cruzada con el grupo sanguíneo A, lo que refuerza la hipótesis de una relación entre una proteína del sistema con un componente del grupo sanguíneo. La asociación de proteínas virales con proteínas normales humanas ya se ha establecido

en otras oportunidades (57). Además se debe considerar el hecho de que la infección puede alterar o producir en mayor cantidad una proteína normal y que ésta sea la que se detecta en la infección, tal y como se ha descrito recientemente para casos de HNANB (121).

Es importante hacer notar que las personas que asistieron a la consulta antivenérea tuvieron una prevalencia de VHB esperada para una población de donantes (200) y no alta como se da en grupos de comportamiento sexual promiscuo (21, 47, 95, 166). En los pacientes de hemodiálisis la prevalencia fue mayor de la esperada (47, 89, 166), debido a que se tomaron las muestras durante un brote de hepatitis B en la unidad.

El nivel de ALT en las poblaciones de donantes predominó a niveles menores a dos veces el promedio normal. A pesar de que los valores mayores o iguales a 2.5 veces el promedio de ALT en una población se han asociado a la hepatitis C (47, 153), en este estudio pocos casos se presentaron en este nivel. En la mayoría de los casos de hepatitis A y B los niveles de ALT fueron altos, mientras que en la hepatitis NANB se concentraron en valores intermedios, lo cual concuerda con las características atribuidas a estos tipos de hepatitis (166, 200). Estos niveles aumentados de ALT no fueron un factor determinante para la detección de los marcadores serológicos del sistema NANB-ICMRT.

Otra prueba utilizada como marcador indirecto para prevenir la HPT NANB es el Anti-HBs (47, 48); sin embargo,

la presencia o ausencia de Anti-HBs en los donantes estudiados no fue un factor influyente en el comportamiento de los marcadores del sistema, pues la reacción no disminuyó ni aumentó si el Anti-HBs estuvo presente. Una excepción fueron los Anti-HBs positivos de Honduras en donde el anticuerpo aumentó más de 5 veces (Cuadro 10), pero esto podría deberse a un fenómeno al azar, ya que de existir algún tipo de asociación debería observarse en el resto de las poblaciones. Por lo tanto, ni los niveles de ALT ni el Anti-HBs están asociados como marcadores indirectos de casos de hepatitis que se relacionen con el sistema en estudio ya sea agudo o crónico.

La prevalencia del sistema tampoco se vio afectada por estados alterados del organismo como el embarazo y la diabetes, aunque sí se presentó un leve aumento en este último grupo, en las personas de consulta antivenérea y en los hemofílicos que es un grupo de alto riesgo para las hepatitis virales (14, 55, 111, 114,120).

Este aumento de la prevalencia del sistema serológico NANB-ICMRT en poblaciones afectadas también por la hepatitis B, hace pensar en un factor de transmisión común vía parenteral ya demostrado en hepatitis B y C (9, 16, 21, 47, 55, 68, 90,95, 132, 166, 214). Como la prevalencia en el grupo de consulta antivenérea del Ministerio de Salud casi no aumentó, parece que la transmisión sexual no es un factor importante lo cual concuerda con lo encontrado respecto a la transmisión del VHC (10, 66, 77, 149, 209).

El anticuerpo predominó en los grupos de donantes, mujeres embarazadas, personas de consulta antivenérea, en pacientes de hemodiálisis y en los dos grupos de casos de NANB, mientras que en los diabéticos, hemofílicos y los otros grupos de hepatitis predominó el antígeno. Esto sugiere que el anticuerpo del sistema no es neutralizante ya que está presente en sanos y enfermos. Sin embargo, en mujeres embarazadas el predominio de anticuerpos fue 4 veces mayor que de antígeno y se presentó la situación inversa en el grupo de los hemofílicos. Esto se puede explicar por un reconocimiento específico del antígeno sumado a los falsos positivos por los complejos inmunes circulantes presentes en las mujeres embarazadas. Por otra parte, los hemofílicos, debido a su constante exposición a derivados sanguíneos tienen una predominancia de antígeno circulante el cual es reconocido por el anticuerpo del sistema. Este predominio, muestra una vez más la gran susceptibilidad de este grupo a todas las infecciones transmitidas por la sangre y sus derivados (14, 111, 114, 126). Cabe señalar además, que el antígeno se duplicó en los casos de hemofilia B (Fig. 6), grupo que a recibido gran cantidad de productos comerciales a diferencia de las otras hemofilias en donde los pacientes requieren menos tratamiento y generalmente reciben crioprecipitados nacionales.

En los pacientes de hemodiálisis se presentó más del doble de la prevalencia para ambos sueros del sistema o sea cuatro veces mayor con respecto a la población de donantes,

situación que es de esperar en una población de riesgo como ésta (21, 65, 67).

De acuerdo al comportamiento del sistema ante otros tipos de hepatitis virales como la hepatitis A, la hepatitis B y el CMV se demostró que no está asociado a ninguna de ellas pues en todas se obtuvo una prevalencia semejante al grupo de donantes. El estadio agudo o crónico en la hepatitis B tampoco afectó a este sistema. Sin embargo, en las muestras con título de IgG Anti-CMV de 12800, el anticuerpo fue 3 veces mayor que el antígeno y lo inverso para los títulos  $\geq 25600$ , esto probablemente se deba a un fenómeno numérico por el bajo número de muestras y no a un efecto real como el estudiado para la hepatitis C (8).

A pesar de que en los 52 casos esporádicos catalogados como HNANB, se presentó un 48.1% de prevalencia del sistema que no se modificó por la presencia o ausencia de Anti-HBs ni por los valores de ALT, esta prevalencia es de 2 a 4 veces más alta que en todos los demás grupos estudiados. En los casos referidos al ICMRT y seleccionados por no reaccionar al VHA, VHB o CMV, la prevalencia del sistema fue 2 a 3 veces mayor que el de las poblaciones control. Se estableció así una relación con el marcador en estudio y los casos clasificados como HNANB.

La distribución del sistema parece no ser influenciada por el sexo aunque en los casos de hepatitis A hubo un leve predominio en mujeres y en los casos de hepatitis B y NANB se presentó un leve predominio en hombres.

Otro factor analizado fue la edad, que en todos los casos estuvo relacionada con el tipo de hepatitis principal (A o B), pero en los casos catalogados como HNANB la distribución fue homogénea. Parece entonces que no se puede definir una población determinada más susceptible como tampoco se ha podido demostrar en otros estudios de HNANB (16, 17, 65, 116, 175, 193).

La prueba de ELISA dió mayor cantidad de reacciones que las otras pruebas en todos los grupos estudiados pero en el de las mujeres embarazadas, en las personas de consulta antivenérea y en los pacientes de hemodiálisis fue mucho mayor. Esto sugiere una posible asociación de falsos positivos por la técnica de ELISA, debida a la presencia de complejos inmunes aumentados en estos tipos de poblaciones. Reacciones falsas por la técnica de ELISA, han sido reportadas en la hepatitis C y en otros sistemas en estudio relacionados a casos de HNANB, por la presencia de complejos inmunes circulantes (40, 118), factor reumatoide (184), congelación y descongelación de muestras (49, 127) y autoanticuerpos que presentan reacción cruzada (54, 118 (79, 176, 177)).

El Anti-VHC no tuvo una prevalencia importante en ninguno de los grupos bajo estudio excepto en el de los hemofílicos en donde alcanzó a un 60%, valor semejante al reportado en otros estudios (114, 126, 131). En el grupo de personas de consulta antivenérea llegó a un 17.7% a pesar de que en este grupo la prevalencia de hepatitis B y Anti-VIH

fue muy baja, según datos del ICMRT. Debido a esto, otro grupo con las mismas características y un grupo de prostitutas fueron evaluados recientemente con el fin de verificar si este porcentaje era real. Se obtuvo una prevalencia únicamente de un 2%, lo que sugiere un alto porcentaje de falsos positivos en el grupo anterior por razones que aún se desconocen (Cuadro 13). No hubo ninguna relación entre la presencia del Anti-VHC y el sistema serológico NANB-ICMRT.

Para el estudio de las HNANB, es preciso descartar primero aquellos casos de hepatitis B que no expresan marcadores serológicos pero tienen el genoma viral integrado (cirrosis, hepatomas y leucemias con quimioterapia), y tratar de encontrar partículas, ADN o antígenos de reacción cruzada en todos los casos que se traten de relacionar con el VHB (143, 185, 186). No se debe olvidar la existencia de mutaciones en el VHB por integración incorrecta, rearreglo de genes o metilación de los mismos; que ocasionan la no expresión de los marcadores serológicos, además, concentraciones menores a 10 partículas por mililitro no son detectables. Es también posible contar con casos de hepatitis B que pierden sus marcadores serológicos con el tiempo o que hallan sido suprimidos por infección con NANB. Debe recordarse también, las reacciones falsas positivas o negativas por fenómenos de inmunosupresión (48). Por lo anteriormente citado y al igual que en algunos estudios realizados para caracterizar la hepatitis C (12, 42), se

estudia la relación de este sistema con posibles hepatitis B crípticas, y se considera la posibilidad de que exista un agente semejante que da reacción cruzada a nivel de su material genético (143, 186, 187), cuando se analiza por PCR. Este análisis muestra una prevalencia de un 22.8% en donantes, de los cuales cerca del 50% presentaron valores alterados de ALT y de reacción positiva al sistema NANB-ICMRT. Este hecho dirige la investigación a una posible relación con el virus de la hepatitis B. Podría por lo tanto tratarse de una reacción cruzada, ya que solamente el 28% de estos positivos por PCR presentaron marcadores serológicos contra la hepatitis B. Por otra parte, en los casos catalogados como HNANB, se presentó un 65.9% de reacción a este PCR, con cerca de un 50% de ALT alterada pero únicamente un 24% de reacción con marcadores del sistema y sólo un antígeno. Esto hace pensar en un posible predominio de casos de hepatitis B críptica, junto con un porcentaje menor de otro agente causante de hepatitis NANB que da reacción cruzada. Esta hipótesis sigue en estudio en el ICMRT y en la Universidad de Lousiana por medio del análisis de más poblaciones de este tipo por PCR y el análisis de la secuencia de los segmentos de ADN aislados.

La dificultad para hallar los posibles agentes causantes de la HNANB se puede atribuir a: 1- Que este exista dentro del hepatocito con una mínima cantidad de antígeno viral circulante. 2- Que sean agentes muy lábiles que se destruyan por los métodos clásicos de purificación viral. 3- Que sean

antígenos no virales distintos a los de cualquier otro agente asociado a las hepatitis. 4- Que produzcan una respuesta inmunológica muy baja de manera que el nivel de anticuerpos no es detectable por métodos convencionales. 5- La gran cantidad de complejos inmunes por anticuerpos no específicos, autoanticuerpos, o aloanticuerpos presentes en la enfermedad, limitan la detección del antígeno. 6- Presencia de múltiples agentes o, múltiples sistemas antígeno anticuerpo asociados a unos o pocos agentes (48).

A pesar de que no se ha caracterizado por completo el sistema encontrado en el ICMRT porque aún no se conoce su naturaleza, se ha logrado demostrar que está relacionado con casos de HNANB esporádicos o transmitidos por vía parenteral. La técnica que dió mejores resultados fue la de IA y ni las otras hepatitis virales, las diabetes o el embarazo alteraron su especificidad. De esta forma, se puede decir que la IA del sistema serológico NANB-ICMRT para la detección de casos asociados con HNANB es de gran utilidad en el seguimiento tanto de casos agudos como crónicos y quizás en un futuro cercano pueda ser utilizada como prueba preventiva en donantes de sangre, si se logra esclarecer su naturaleza y su relación con el grupo sanguíneo A.

Queda entonces abierta la posibilidad de continuar la investigación sobre la posible reacción cruzada de las proteínas encontradas en este sistema y el VHB, proyecto que se lleva a cabo en la Universidad de Louisiana. Además, se deben continuar las investigaciones para determinar la

relación del sistema con el grupo sanguíneo A, con experimentos de neutralización con lectinas específicas para este grupo y de ser posible con antígenos de membrana conocidos cuya expresión este ligada al mismo.

Se le deberá dar prioridad a la purificación del antígeno mediante métodos como gradientes de CsCl o Sacarosa, lo cual no ha sido posible debido a no contar con el equipo necesario; a procesos de purificación y análisis como electroforesis en dos dimensiones y a proteólisis limitada. Se debe volver a intentar la producción de anticuerpos monoclonales a partir de un antígeno más puro para poder desarrollar una prueba de ELISA o RIA que permita dignosticar la enfermedad en casos y portadores sanos y prevenir su transmisión.

Finalmente, es importante recordar que los marcadores indirectos y su gran variabilidad han generado problemas como los siguientes:

-Pérdida de unidades de sangre por la determinación de ALT, la cual se estima en un 3%; además su implementación representa gastos económicos en reactivos, técnicos, información al donante, seguimiento biológico y clínico de los casos, problemas logísticos del ajuste de las necesidades vs la pérdida de bolsas, problemas médicos y éticos en cuanto a si se debe o no informar al donante el significado de ello y el apropiado seguimiento (8, 153, 156).

-El aumento de la ALT se da en otras patologías como alcoholismo, diabetes y obesidad. Existen fluctuaciones según

edad, sexo, tratamientos con antihipertensivos o diuréticos, bajas condiciones socioeconómicas, raza y región geográfica, lo que implica un estudio de niveles normales en cada zona (48, 119, 156).

-El porcentaje de anti-HBc positivos en una población depende de la prevalencia de la hepatitis B en diferentes zonas geográficas, lo que significa una pérdida muy considerable en regiones de alta prevalencia.

Por lo tanto, se hace necesario tomar una serie de precauciones para disminuir las posibilidades de adquirir una hepatitis vía parenteral:

1-Educar al personal médico respecto a la preparación de un buen historial médico, al uso de la sangre y sus derivados y el uso de las gamaglobulinas.

2-Minimizar el uso de mezclas de sangre.

3-Selección apropiada del donante, por exclusión de los donantes comerciales y los donantes con algún marcador indirecto positivo (HBsAg, AntiHBs, AntiHBc, ALT aumentada, etc.).

4-Promover la donación voluntaria y sobre todo la donación autóloga preoperatoria.

5-Utilizar calor (60°C 30 h), solventes lipídicos (cloroformo), inactivación fotoquímica, agentes químicos como trin-(n-butyl)-fosfato (TNBP), colato de sodio,  $\beta$ -propionilactona con luz ultravioleta (LUV) y psorolem con LUV; estos dos últimos inactivan virus ADN, ARN de simple y doble banda.

6-No olvidar las precauciones higiénicas universales (lavado de manos, uso de guantes, descarte de materiales punzocortantes, desinfección, esterilización de equipos etc.) (43, 48, 78, 116, 153).

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Abe K., Kurata T. and Shikata T. 1989. Non-A, Non-B Hepatitis: Visualization of Virus-Like Particles from Chimpanzee and Human Sera. *Arch. Virol.* 104: 351-355.
- 2- Abe K., Kurata T., Shikata T., Sugitani M. and Oda T. 1987. Experimental Transmission of Non-A, Non-B Hepatitis by Saliva. *J. Infect. Dis.* 155: 1078.
- 3- Akatsuka T., Tohmatsu J., Yoshihara N., Katsuhara N., Okamoto T., Shikata T. and Okada T. 1986. Detection of an Antigen (AN6520), Possibly Related to Non-A, Non-B Hepatitis, by Monoclonal Antibodies. I. *J. Med. Virol.* 20: 32-42.
- 4- Akatsuka T., Tohmatsu J., Abe K., Shikata T., Ishikawa T., Nakajima K., et al. 1986. Non-A, Non-B Hepatitis Related AN6520 Ag is a Normal Cellular Protein Mainly Expressed in Liver. II. *J. Med. Virol.* 20: 43-56.
- 5- Alberti A., Chemello L., Benvegnù L., Belussy F., Tagger A. and Ruol A. 1990. Pilot Study of Interferon Alpha-2a Therapy in Preventing Chronic Evolution of Acute Hepatitis C. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 176p.
- 6- Al-Kandari S., Norkenfelt E. Al-Nakib B., Radakrishnan S. and Al-Nakib W. 1987. Acute Non-A, Non-B Hepatitis in Kuwait. *Scand. J. Infect. Dis.* 19: 111-116.
- 7- Allain J., Duermeyer W., Hellings J., Gazengel C., Laurian Y. and Verroust F. 1984. Non-A, Non-B Hepatitis in Haemophilic Patients with Inhibitor Treated with Activator

Prothrombin Complex Concentrates: Lack of Correlation with an Antigen Possibly Related to Non-A, Non-B Hepatitis. *Vox Sang.* 47: 47-55.

8- Alter H., Purcell R., Feinstone S. and Tegtmeier G. 1981. Non-A, Non-B Hepatitis: Its Relationship to Cytomegalovirus to Chronic Hepatitis, and to Direct and Indirect Tests Methods. Viral Hepatitis 1981 International Symposium. Eds. W. Szmunes, H. Alter, J. Maynard. USA. Pp: 279-294.

9- Alter H. 1988. Transfusion-Associated Non-A, Non-B Hepatitis: The First Decade. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA Pp: 537-542.

10- Alter M., Coleman P., Alexander W., Kramer E., Miller J., Hadler S. and Margolis H. 1989. Importance of Heterosexual Activity in the Transmission of Hepatitis B and Non-A, Non-B Hepatitis. *JAMA* 262: 1201-1205.

11- Arima T., Nagashima H., Shimomura H., Tsuji T. and Jitoku M. 1988. Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Human  $\beta$ -Interferon. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 898-901.

12- Arima T., Mori Ch., Takamizawa A., Nakajima T. and Kanai K. 1989. Cloning of Serum RNA Associated with Hepatitis C Infection Suggesting Heterogeneity of the Agent(s) Responsible for the Infection. *J. Soc. Gas.* 24: 685-691.

13- Balayan M., Andzhaparidze A., Savinkaya S., Kitiladze E., Braginskys D., Savinov A. and Poleschuk V. 1983. Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted Via the Fecal-Oral Route. *Intervirology* 20: 23-31.

- 14- Bamber M., Murray A., Kernoff P. and Thomas H. 1981. Short Incubation Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted by Factor VIII Concentrated in Patients with Congenital Coagulation Disorders: A Preliminary Report of an Antigen/Antibody System. *Med. Lab. Sci.* 38: 373-378.
- 15- Bamber M., Murray A., Lewin J., Thomas H. and Sherlock Sh. 1981. Ultrastructural Features in Chronic Non-A, Non-B (NANB) Hepatitis: A Controlled Blind Study. *J. Med. Virol.* 8: 267-275.
- 16- Barcena R., Suarez E., Grande L., Garcia-Hoz F., Ruiz L., Moreira U. et al. 1983. Estudio Prospectivo de Hepatitis Postransfusional Ni A Ni B. Incidencia y Factores de Riesgo. *Gastroenterología y Hepatología* 6: 1-4.
- 17- Barcena R., Suarez E. and Pascasio J. 1983. Hepatitis Postransfusional NANB. *Gastroenterología y Hepatología.* 6: 487-496.
- 18- Belabbes E-H., Bouguermouh A. and Pillot J. 1988. Waterborne Non-A, Non-B Hepatitis in Argelia. Epidemiological Study and Development of a Test. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 152-153.
- 19- Berntrop E., Nilsson I., Ljung R. and Widell A. 1990. Hepatitis C Virus Transmission by Monoclonal Antibody Purified Factor VIII Concentrate. *The Lancet* 335: 1531-1532.
- 20- Bianchi L., Desmet V., Popper H., Scheuer P., Aledort L. and Berk P. 1987. Histologic Patterns of Liver Disease in Hemophiliacs with Special Reference to Morphologic

Characteristics of Non-A, Non-B Hepatitis. Seminars in Liver Disease 7: 203-207.

21- Blum H. and Vyas G. 1982. Non-A, Non-B Hepatitis: A Contemporary Assessment. Haematologia 15: 153-173.

22- Blumberg B., Alter H. and Visnick S. 1965. A New Antigen in Leukemia Sera. JAMA 191: 541-546.

23- Boender P. and Hellings J. 1988. Fragmented Chromosomal DNA in Sera of Patients with Hepatitis A, B and Non-A, Non-B. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 588-591.

24- Bortolotti F., Tagger A., Cadrobbi P., Crivellaro C., Ribero M. and Alberti A. 1989. Antibodies to Hepatitis C Virus in Children with Acute or Chronic Viral Hepatitis. The Lancet ii: 1162.

25- Bradley D., Maynard J., Popper H., Ebert J., Cook E., Fields H. and Kemler B. 1981. Persistent Non-A, Non-B Hepatitis in Experimentally Infected Chimpanzees. J. Infect. Dis. 143: 210-217.

26- Bradley D., Krawczynski K., Humphrey Ch. and McCaustland K. 1987. Biochemically Silent Posttransfusion Non-A, Non-B Hepatitis Interferes with Superinfection by Hepatitis A Virus. Intervirology 27: 86-90.

27- Bradley D., Andjaparidze A., Cook E., McCaustland K., Balayan M., Stetler H. et al. 1988. Aetiological Agent of Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis. J. Gen. Virol. 69: 731-738.

28- Brahm J., McClure M., Sommerfelt M., Exley M., Weiss R.,

Fagan E. and Williams R. 1988. Lack of Reverse Transcriptase Activity in Serum in Sporadic Post-Transfusional and Presume Epidemic or Water-Borne Forms of Severe Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Med. Virol.* 25:157-164.

29- Brillanti S., Barbara L., Miglioli M. and Bonino F. 1989. Hepatitis C Virus: A Possible Cause of Chronic Hepatitis In Alcoholics. *The Lancet* ii: 1390-1391.

30- Brotman B., Prince A., Huima T., Richardson L., Ende MC. and Pfeifer V. 1983. Interference Between Non-A, Non-B and Hepatitis B Virus Infection in Chimpanzees. *J. Med. Virol.* 11: 191-205.

31- Brotman B., Boehle W. and Prince A. 1989. Absence of Perinatal Transmission of Blood-Borne Non-A, Non-B Hepatitis Virus by Chimpanzees with Acute and Chronic Infection. *J. Med. Virol.* 28: 13-15.

32- Burk K., Oefinger P. and Dreesman G. 1984. Detection of Non-A, Non-B Hepatitis Antigen by Immunocytochemical Staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3195-3199.

33- Busachi C., DeGiorgi L., Alberti A., Tremolada F., Laschi R., Realdi G. and Pisi E. 1984. Intranuclear Particles in Non-A, Non-B Hepatitis. *Hepatology* 4: 571-572.

34- Caselmann W., Eisenburg J., Meyer M., Koshi R. and Hofschneider P. 1990. A Pilot Trial of Human Recombinant Beta-and Gamma-Interferon in Parenterally Transmitted Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. *The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress.* April 4-8. 182p.

- 35- Carnelli V., Gomperts E., Friedman A., Aledort L., Hilgartner M., Dietrich Sh. and Fedor E. 1987. Assessment for Evidence of Non-A, Non-B Hepatitis in Patients Given n-Heptane-Suspended Heat-Treated Clotting Factor Concentrate. *Thrombosis Research* 46: 827-834.
- 36- Castilla A., Serrano M., Morte S., Subirá M., Civeira M. and Prieto J. 1988. Monocyte Function in Chronic Non-A, Non-B Hepatitis: Relationship with the Activity of Liver Disease. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 568-571.
- 37- Chircu L., Pezzella M., Lacana V. and Rica G. 1980. Post-Transfusion Hepatitis. Antigen/Antibody Systems Correlated with Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Med. Virol.* 6: 147-151.
- 38- Choo Q-L., Kuo G., Weiner A., Overby L., Bradley D. and Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA Derive from a Blood-borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genoma. *Science* 244: 359-362.
- 39- Cohen B. J. 1978. The IgM Antibody Responses to Core Antigen of Hepatitis B Virus. *J. Med. Virol.* 3: 141-149.
- 40- Colombo M., Rumi M. and Mannucci P. 1990. Specificity of Hepatitis C Antibody Elisa in Patients with Haemophilia. *The Lancet* 335: 1345.
- 41- Couroucé A., Jullien A., Vedrenne J. and Habibi B. 1990. Anti-Hepatitis C Antibodies in Prospectively Followed-up Transfused Patients. *Vox Sang.* 58: 226-227.
- 42- Cristiano K., Baker B., DiBisceglie A. and Feinstone S.

1990. Detection of Hepatitis C Virus RNA by the Polymerase Chain Reaction. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 174p.

43- CZaja J. and Davis G. 1982. Hepatitis Non-A, Non-B: Manifestations and Implications of Acute and Chronic Disease. Mayo Clin. Proc. 57: 639-652.

44- Dazza M-C., Meneses L-V., Girard P-M., Villaroel C., Brechot C. and Lorouzé B. 1990. Hepatitis C Virus Antibody and Hepatocellular Carcinoma. The Lancet 335: 1216.

45- De Vos R., Vanstapel M., Desmyter J., De Wolf-Peters Ch., Groote G., Colaert J. et al. 1983. Are Nuclear Particles Specific for Non-A, Non-B Hepatitis?. Hepatology 3: 532-544.

46- Decker R., Kasakowski S. and Vanderbilt A. 1981. Diagnosis of Acute Hepatitis by HAVAB-M, a Direct Radioimmunoassay for IgM Anti-HAV. Am. J. Clin. Pathol. 76: 140-147.

47- Deinstag J. 1983. Non-A, Non-B Hepatitis. I. Recognition, Epidemiology and Clinical Features. Gastroenterology 85: 439-462.

48- Deinstag J. 1983. Non-A, Non-B Hepatitis. II. Experimental Transmission, Putative Virus Agents and Markers, and Prevention. Gastroenterology 85: 743-768.

49- Desmyter J. and Goubau P. 1990. False Positivity in the Ortho Anti-Hepatitis C Virus Elisa Upon Storage and Handling of Sera. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8.

173p.

50- Dienes H., Popper H., Arnold W. and Loberck H. 1982. Histologic Observations in Human Hepatitis Non-A, Non-B. *Hepatology* 2: 562-571.

51- Dienes H. P., Hütteroth T., Hess G. and Stefan C. 1987. Immunoelectron Microscopic Observation on the Inflammatory Infiltrates and HLA Antigens in Hepatitis B and Non-A, Non-B. *Hepatology* 7: 1317-1325.

52- Duermeyer W., Stute R. and Hellings J. 1983. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for an Antigen Related to Non-A, Non-B Hepatitis and its Antibody: Partial Characterization of the Antigen and Chimpanzee Transmission. *J. Med. Virol* 11: 11-21.

53- Duermeyer W., Hellings J. and Stute R. 1983. Characterization of DS-Antigen. An Antigen Related to Non-A, Non-B Hepatitis 1. Physico-chemical Properties. *J. Virol. Meth.* 6: 225-232.

54- Dussaix E., Maggiore G., DeGiocomo C., Mondelli M., Martres P. and Alvarez F. 1990. Autoimmune Hepatitis in Children and Hepatitis C Virus Testing. *The Lancet* 335: 1160-1161.

55- Esteban J., Esteban R., Viladomio L., López-Talavera J., González A., Hernández J. et al. 1989. Hepatitis C Antibodies Among risk Groups in Spain. *The Lancet* i: 294-297.

56- Fagan E., Ellis D., Tovey G., Lloyd G., Portmann B., Tan K-C. et al. 1990. Toga-like Viruses in Fulminant Sporadic Non-A, Non-B Hepatitis and After Liver Transplantation. *The*

- 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 17p.
- 57- Fauci A. 1988. The Human Immunodeficiency Virus: Infectivity and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* 239: 617-622.
- 58- Fattovich G., Tagger A., Brollo L., Pontisso P., Realdy G., Ferroni P. and Alberti A. 1989. Liver Disease in Anti-HBe Positive Chronic HBsAg, Carriers and Hepatitis C Virus. *The Lancet* ii: 797-798.
- 59- Feiman C., Berris B., Sinclair J. and Wrobel D. 1980. Hepatitis Non-A, Non-B. *CMA J.* 123: 181-184.
- 60- Feinstone S., Kapikian A. and Purcell R. 1973. Hepatitis A: Detection by Immune Electron Microscopy of a Virus-Like Antigen Associated with Acute Illness. *Science* 182: 1026-1028.
- 61- Feinstone S., Alter H., Dienes H., Shimizu Y., Popper H., Blackmore D. et al. 1981. Non-A, Non-B Hepatitis in Chimpanzees and Marmosets. *J. Infect. Dis.* 144: 588-597.
- 62- Feinstone S. and Hoofnagle J. 1984. Non-A, Maybe-B Hepatitis. *New Eng. J. Med.* 311: 185-188.
- 63- Flegg P. 1989. Ethics of Screening for Hepatitis C Virus. *The Lancet* ii: 1221.
- 64- Fowler M., Manjardino J., Weller I., Bamber M., Karayiannis P., Zuckerman A. and Thomas H. 1983. Failure to Detect Nucleic Acid Homology Between Some Non-A, Non-B Viruses and Hepatitis B Virus DNA. *J. Med. Virol.* 12: 205-213.

- 65- Gerety R., Tabor E., Schaff Z., Seto B. and William G. 1984. Non-A, Non-B Hepatitis Agents. Viral Hepatitis and Liver Disease. Eds. G. Vyas, J. Deinstag and Hoofnagle J. USA. Pp:23-47.
- 66- Giovannini M., Tagger A., Ribero M., Zuccotti G., Pogliani L., Grossi A. et al. 1990. Maternal-Infant Transmission of Hepatitis C Virus and HIV Infection: A Possible Interaction. *The Lancet* 335: 1166.
- 67- Gitnick G. 1984. Non-A, Non-B Hepatitis. Etiology and Clinical Course. *Ann. Rev. Med.* 35: 265-278.
- 68- Giusti G., Galanti B., Gaeta G.B. and Gallo C. 1987. Etiological, Clinical and Laboratory Data of Post-Transfusion Hepatitis: A Retrospective Study of 379 Cases from 53 Italian Hospitals. *Eur. J. Clin. St. Treats. Infect.* 15: 111-114
- 69- González A., Esteban J., Viladomiu L., Hernández J., Sánchez C. et al. 1990. Lack of Efficacy of Surrogate Marker Testing for Preventing NANB Postransfusion Hepatitis in a Prospective Randomized and Controlled Study. *The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8.* 172p.
- 70- Goodson J., Taylor P., Campion E., Richter J. and Wands J. 1982. The Clinical Course of Acute Hepatitis in the Elderly Patient. *Arch. Inter. Med.* 142: 1485-1488.
- 71- Gray J., Wreghitt T., Friend P., Wight D., Sundaresan B. and Calore R. 1990. Differentiation Between Specific and Non-Specific Hepatitis C Antibodies in Chronic Liver Disease. *The Lancet* 335: 609-610.

- 72- Grendele M., Gridelli B., Colledam M., Rossi G., Fassati R., Ferla G. et al 1989. Hepatitis C Virus Infection and Liver Transplantation. *The Lancet* ii: 1221-1222.
- 73- Hanson M. and Polesky H. 1986. Evaluation of Routine Anti-HBc of Volunteer Blood Donors: A Questionable Surrogate Test for Non-A, Non-B Hepatitis. *Transfusion* 27: 107-108.
- 74- Hantz O., Vitvitski L. and Trepo C. 1980. Non-A, Non-B Hepatitis: Identification of Hepatitis B-like Virus Particles in Serum and Liver. *J. Med. Virol.* 5: 73-86.
- 75- Hellings J., Van Der VEEN-Du P. and Boender P. 1988. Transmission of Non-A, Non-B Hepatitis by Leucocyte Preparations. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA Pp: 543-549.
- 76- Herrera G., Taylor L. and Visoná K. 1990. Respuesta Inmune Humoral Contra la Vacuna del Virus de la Hepatitis B (H-B-vax) en el Personal Hospitalario. *Revista de Ciencias Médicas, CCSS.* 9: 41-47.
- 77- Hess G., Massing A., Rossol S., Schiitt H., Clemens R., Meyer K. and Buschenfelded Z. 1989. Hepatitis C Virus and Sexual Transmission. *The Lancet* ii: 987.
- 78- Holland P. and Alter H. 1981. Non-A, Non-B Viral Hepatitis. *Human Pathol.* 12: 1114-1122.
- 79- Hoofnagle J. 1981. Precipitin System Detected in Sera From Patients with Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Med. Virol.* 7:315-319.
- 80- Hopf U., Moller B., Kuther D., Stemerowicz R., Lokeck H., Ludtke-Handjery A. et al. 1990. Long-term Follow-up

Posttransfusion and Sporadic Chronic Hepatitis Non-A, Non-B and Frequency of Circulating Antibodies to Hepatitis C Virus (HCV). *J. Hepat.* 10: 69-76.

81- Hu R., Mackowiak J., Lukas S. and Madsen G. 1990. The Microparticle Based Chemiluminescence Sandwich Assay for HCV Antibody. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 174 P.

82- Humphrey C., Andjaparidze., Cook Jr. E. and Bradley D. 1988. Identification of Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis Virus Particles by Solid-Phase Immune Electron Microscopy. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA Pp: 148-151.

83- Hunter W. 1978. Handbook of Experimental Immunology. Cap. 14. 3<sup>rd</sup> Ed. Ed. Weier. Vol. I Immunochemistry. Pp: 14.1-14.16.

84- Ikeda Y., Toda G., Hashimoto N. and Kurokawa K. 1990. Antibody to Superoxide Dismutase, Autoimmune Hepatitis and Antibody Test for Hepatitis C Virus. *The Lancet* i: 1345-1346.

85- Ishida N. 1981. Non-A, Non-B Hepatitis: An Overview. In: Viral Hepatitis 1981 International Symposium. Eds. W. Szmunes, H. Alter and J. Maynard. USA. Pp: 275-277.

86- Ito S., Tsuji Y., Kitagawa N., Akihiko I., Syundo J., Tamura Y. et al. 1988. Clinical Value of the Guanase Screening Tests in Donor Blood for Prevention of Posttransfusional Non-A, Non-B Hepatitis. *Hepatology* 8: 383-384.

- 87- Itoh Y., Iwakiri Sh., Kitajima K., Gotanda T., Miyaki M., Miyakawa Y. and Mayumi M. 1986. Lack of Detectable Reverse Transcriptase Activity in Human and Chimpanzee with a High Infectivity for Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Gen. Virol.* 67: 77-79.
- 88- Iwarson S., Schaff Z., Seto B., Norkrans G. and Gerety R. 1985. Retrovirus-like Particles in Hepatocytes of Patients with Transfusion-acquired Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Med. Virol.* 16: 37-45.
- 89- Iwarson S. A. 1987. Non-A, non-B hepatitis: Dead ends or new horizons?. *Brit. Med. J.* 295: 946-948.
- 90- Iwarson S., Wejstål R., Ruttimann E., Björkander J., Seto B., Snoy P. and Gerety R. 1987. Non-A, Non-B Associated with the Administration of Intravenous Immunoglobulin Transmission Studies in Chimpanzees. *Serod. Immunoth.* 1: 261-266.
- 91- Jacob J., Burk K., Eichberg J., Dreesman G. and Lanford R. 1990. In Vitro Replication of Non-A, Non-B Hepatitis Virus. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 175p.
- 92- Janot C., Couroucé A. and Maniez A. 1989. Antibodies to Hepatitis C Virus in French Blood Donors. *The Lancet* ii:796-797.
- 93- Jett B., Shih J., Genesca J., Melpolder J., Peters T., Fenner L. and Alter H. 1990. Antibody to Hepatitis C Virus and Surrogate Markers for Non-A, Non-B Hepatitis. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease:

The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 173p.

94- Johnson G., Holborow E. and Doling J. 1978. Handbook of Experimental Immunology. Cap.15. 3<sup>ra</sup> Ed. Ed. Weier D. Vol. I Immunochemistry. Pp: 15.24- 15.25.

95- Jové J., Sánchez-Tapias J., Bruguera M., Mas A., Costa J., Barrera J. and Rodés J. 1988. Post-transfusional vs Sporadic Non-A, Non-B Chronic Hepatitis. A Clinic-pathological and Evolutive Study. Liver 8: 42-47.

96- Kamitsukasa H., Harada H., Yakura M., Kukuda A., Fukuda A., Ohbayashi A. et al. 1989. Intrafamilial Transmission of Hepatitis C Virus. The Lancet ii: 987.

97- Karmen A., Wroblewski F. and La Due J. 1955. Transaminase Activity in Human Blood. J. Clin. Invest. 34: 126-133.

98- Kew M., Houghton M., Choo Q-L. and Kuo G. 1990. Hepatitis C Virus Antibodies in Southern African Blacks with Hepatocellular Carcinoma. The Lancet 335: 873-874.

99- Kline W. 1987. AntiHBc Testing in an Effort to Reduce the Incidence of Posttransfusion Non-A, Non-B Hepatitis. Beitr. Infusionstherapie Kline. Ernahr 18: 6-12.

100- Koehler G. and Milstein C. 1975. Continuous Culture of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. Nature 256: 495-497.

101- Koff R., Pannuti C., Pereira M., Hansson G., Deinstag J., Neto U. et al. 1982. Hepatitis A and Non-A, Non-B Viral Hepatitis in Sao Paulo, Brazil: Epidemiological, Clinical, and Laboratory Comparisons in Hospitalized Patients. Hepatology 2: 445-448.

- 102- Krawczynski K., Kuo G., DiBisceglie A., Ebert J., Houghton M., Alter M. Bradley D. 1990. Blood-Borne Non-A,Non-B Hepatitis:Detection and Identification of Hepatitis C Virus and Disease Associated Antigen (HCAg) in Hepatocytes. The 1990 Internatinal Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 174p.
- 103- Kubo Y., Takeuchi K., Boonmar S., Katayama T., Choo Q-L., Kuo G. et al. 1989. A cDNA Fragment of Hepatitis C Virus Isolated from an Implicated Donor of Post-Transfusion Non-A, Non-B Hepatitis in Japan. Nuc. Acid. Res. 17: 10367-10372.
- 104- Kuo G., Choo Q-L., Alter H., Gitnick G., Redeker A., Purcell R. et al. 1990. An Assay for Circulating Antibodies. A Major Etiologic Virus of Human Non-A, Non-B Hepatis. Science 244: 362-365.
- 105- Laemmli U. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of The Bacteriophage T4. Nature 277: 680-684.
- 106- Lee M., Courter S., Tai D. and Kingdon H.S. 1988. Long-term Evaluation of Intravenous Immune Globulin Preparation with Regard to Non-A, Non-B, Hepatitis Safety. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A.J. Zuckerman A. Liss Inc. USA. Pp: 596-599.
- 107- Liaw Y-F., Chu Ch-M., Chang Ch-S. and Wu Ch-Sh. 1982. Simultaneous Acute Infection with Hepatitis Non-A, Non-B Viruses. Dig. Dis. Sci. 27: 762-764.

- 108- Linke H., Amannt Ch. and Shlauder G. 1988. Non-A, Non-B Hepatitis Infection Does Not Result in the Production of Abundant Poly-A-Containing Messenger RNAs. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 564-567.
- 109- Linke H.K. and Carrick R.J. 1988. Production of Monoclonal Antibodies Specific for Non-A, Non-B, Hepatitis Infected Liver. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 596-599.
- 110- Lizano S. 1989. Presencia de Anticuerpos Contra el Antígeno del Virus de la Hepatitis Delta (VDH) en Varios Grupos de Individuos Infectados con Hepatitis B en Centroamérica. Tesis de Licenciatura. UCR. Pp: 37-48
- 111- Ludlam C., Chopman D., Cohen B. and Litton P. 1989 Antibodies to Hepatitis C Virus in Haemophilia. *The Lancet* ii: 560-561.
- 112- Luo K-X., Karayiannis P., MacDonald D., Bamber M., Kernoff P. and Thomas H. 1983. Prevalence of a Non-A, Non-B Associated Antigen/Antibody System Detected by Radioimmunoassay in Acute and Chronic Liver Disease. *J. Med. Virol.* 12: 253-265.
- 113- Magrin S., Almasio P., Marino L., Fiorentino G., Pinzello G., Fabiano C. et al. 1990. Anti-HCV Status and Steroid Responsiveness in Autoimmune Chronic Active Hepatitis. *The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress.* April 4-8. 184p.

- 114- Makris M., Preston F., Triger D., Hunderwood J., Choo Q-L., kuo G. and Houghton M. 1990. Hepatitis C Antibody and Chronic Liver Disease in Haemophilia. *The Lancet* 335: 1117-1119.
- 115- Margulier A., Bernuau J., Balayan M., Andjaparidze A., Dubois F., Goudeau A. et al. 1987. Non-A, Non-B Fulminant Viral Hepatitis in France in Returnees from Asia and Africa. *Dig. Dis. Sci.* 32: 1151-1154.
- 116- Mattsson L. 1990. Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. With Special Reference to the Transfusion-Associated Form. *Scan. J. Infect. Dis. Supplementum* 59.
- 117- Mattsson L., Lindqvist U., Weiland O. and Aberg B. 1990. Serum Levels of the Aminoterminal Propeptide of Type III Procollagen and Hyaluronan During Resolving and Non-Resolving Posttransfusion Non-A, Non-B Hepatitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 22: 11-17.
- 118- Mcfarlane I., Smith H., Johnson P., Bray G., Vergani D. and Williams R. 1990. Hepatitis C Virus Antibodies in Chronic Active Hepatitis: Pathogenetic Factor of False-Positive Result ?. *The Lancet* 335: 754-757.
- 119- Meier P. and Schmid M. 1988. Serum Alanine Aminotransferase and Seronegative Hepatitis. *Ann. Inter. Med.* 108:768.
- 120- Miller E., Lee C., Karayiannis P., Hamilton-Dutoit S., Dick R., Thomas H. and Bakernoff P. 1988. Non-Invasive Investigation of Liver Disease in Haemophilic patients. *J. Clin. Pathol.* 41: 1039-1043.

- 121- Mishiro S., Hoshi Y., Takeda K., Yoshikawa A., Gotanda T., Takahashi K. et al. 1990. Non-A, Non-B Hepatitis Specific Antibodies Directed at Host-Derived Epitope: Implication for an Autoimmune Process. *The Lancet* 336: 1400-1403.
- 122- Morbidity and Mortality Weekly Report. 1987. Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis in Mexico. *OMS.* 36: 597-602.
- 123- Morbidity and Mortality Weekly Report. 1987. Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis. *East African.* *OMS.* 36: 241-245.
- 124- Molinié C., Saliou P., Roué R., Deneé J., Farret O., Vergeau B. and Vindrios J. 1988. Acute Epidemic Non-A, Non-B Hepatitis: A Clinical Study of 38 Cases in Chad. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A.J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 154-157.
- 125- Mondelli M. U., Alberti A., Realdi G. and Rondanelli E. G. 1986. In Vitro Effect of Lymphoblastoid- $\alpha$ -Interferon on Subpopulations of Effector Cells Mediating Cytotoxicity for Autologous Hepatocytes in Hepatitis B and Non-A, Non-B. *Int. J. Immunopharmac.* 8: 887-891.
- 126- Morgan C., Hyland C. and Young I. 1990. Hepatitis C Antibody and Transaminase Activities in Blood Donors. *The Lancet* 335: 921.
- 127- Mortimer P., Cohen B., Litton P., Vandervelde E., Bassendine M., Brind A. and Hambling M. 1989. Hepatitis C Virus Antibody. *The Lancet* ii: 798.
- 128- Murphey M., Waters A., Grint P., Hardiman A. and Lister

- T. 1990. Hepatitis C infection in Multitransfused Patients with Acute Leukaemia. *The Lancet* i: 58-59.
- 129- Muto Y., Sugihara L., Ohnishi H., Moriwaki H. and Nishioka K. 1990. Anti-Hepatitis C Virus Antibody Prevalence in Fulminant Hepatitis Failure. *The J. Soc. Gas.* 25: 32-35.
- 130- Nagatsuka Y., Ohori H., Kanno A., Yasuyuki A., Togoh T. and Ishida N. 1983. A Risk Index for the Prediction of the Incidence of Non-A, Non-B Posttransfusion Hepatitis in Open-Heart Surgery Patients. *J. Med. Virol.* 12: 81-92.
- 131- Noel J., Guerois G., Maisonneuve P., Verroust F. and Laurian Y. 1989. Antibodies to Hepatitis C Virus in Haemophilia. *The Lancet* ii: 560.
- 132- Norkrans G., Frösner G., Hermodsson S. and Iwarson S. 1980. Multiple Hepatitis Attacks in Drug Addicts. *JAMA* 243: 1056-1058.
- 133- Norkrans G., Widell A., Teger-Nilsson A. C., Kjellman H., Frösner G. and Iwarson S. 1981. Acute Hepatitis Non-A, Non-B Following Administration of Factor VIII Concentrates. *Vox Sanguinis* 41: 129-133.
- 134- Ohnishi K., Nomura F. and Iida Sh. 1989. Treatment of Posttransfusion Non-A, Non-B Acute and Chronic Hepatitis with Human Fibroblast Beta-Interferon: A Preliminary Report. *The Am. J. Gas.* 84: 596-600.
- 135- Ohori H., Kanno A., Nagatsuka Y., Yamada E., Onodera Sh., Tateda A. et al. 1983. An Antigen/Antibody System Specific for an Epidemic Non-A, Non-B Hepatitis in Patients of Cardiovascular Surgical Unit. *J. Med. Virol.* 12: 171-178.

- 136- Ooka T., Hogen K. and Kishida Y. 1988. Effect of Combination Therapy of Recombinant Interferon  $\alpha$ A and Immunopotential on Non-A, Non-B Chronic Hepatitis. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. Pp: 891-894.
- 137- Pappas S., Hoofnagle J., Young N., Straus S. and Jones E. 1985. Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Acyclovir: Pilot Study. *J. Med. Virol.* 15: 1-9.
- 138- Pharmacia Fine Chemicals. 1978. Gel Filtration Theory and Practice. Pg: 3-62.
- 139- Pharmacia Fine Chemicals. 1978. Chromatofocusing. USA Pp: 1-37.
- 140- Pillot J., Sharma M., Lazizi Y., Budkowska A. Dauguet C., Galimand M. and Sarthou J. 1987. Immunological Characterization of a Viral Agent Involved in Epidemic and Sporadic Non-A, Non-B Hepatitis. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 138: 145-158.
- 141- Prince A. 1968. An Antigen Detected in the Blood During the Incubation Period of Serum Hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 60: 814-821.
- 142- Prince A. and Tsiquaye K. 1981. Summary of Workshop 4: Non-A, Non-B Hepatitis. Viral Hepatitis 1981 International Symposium. Eds. W. Szmunes, H. Alter and J. Maynard. USA. Pp: 651-655.
- 143- Prince A. 1982. Nature of Non-A, Non-B Hepatitis Viruses. *The Lancet* i: 1181.
- 144- Provost P., Ittensohn O., Villarejos V., Arguedas J and

- Hilleman M. 1973. Etiologic Relationship of Marmoset-propagated CR326 Hepatitis A virus to Hepatitis in Man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 1257- 1267.
- 145- Purcell R. and Ticehurst J. 1988. Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis: Epidemiology and Clinical Characteristics. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A.J. Zuckerman. A. Liss Inc. Pp: 131-137.
- 146- Rakela J. and Redeker A. 1979. Chronic Liver Disease After Acute Non-A, Non-B Viral Hepatitis. Gastroenterology 77: 1200-1202.
- 147- Ramírez P., Bonilla J., Moreno E. and León P. 1983. Electrophoretic Transfer of Viral Proteins to Nitrocellulose Sheets and Detection with Peroxidase-bound Lectins and Protein A. J. Immunol. Meth. 62: 15-22.
- 148- Reesink H., LeentVaar-Kuypers A., VanderPoel C., Lelie P., Pietersz R., Mulder-Folkerte D. et al. 1988. Non-A, Non-B Posttransfusion Hepatitis in Open Heart Surgery Patient in the Netherlands: Preliminary results of a Prospective Study. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. Pp: 558-560.
- 149- Reesink H., Wuong V., Ip H., VanDer Poel C., Exel-Oehlers P. and Lelie P. 1990. Mother to Infant Transmission and Hepatitis C Virus. The Lancet 335: 1216-1217.
- 150- Reibnegger G., Judmaier G. and Wachter H. 1988. Differential Diagnosis Between Non-A, Non-B Hepatitis and Fatty Liver by Measurement of Urinary Heopterina. The Lancet

i: 529.

151- Resnick R., Stone K. and Antonioli D. 1983. Primary Hepatocellular Carcinoma Following Non-A, Non-B Posttransfusion Hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 28: 908-911.

152- Reyes G., Purdy M., Kim J., Luk K., Young L-V., Fryk. and Bradley D. 1990. Isolation of cDNA from the Virus Responsible for Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis. *Science* 247: 1335-1139.

153- Richard D. 1987. The Usefulness of Surrogate Markers Anti-HBc and ALT for Post-Transfusion Non-A, Non-B Hepatitis Prevention. *J. Virol. Meth.* 17: 105-117.

154- Riezu-Boj J., Castilla A., Camps J., Civeira M. and Prieto J. 1990. T Cells Expressing Gamma-Delta Antigen Receptor in Chronic Hepatitis C (CHC): Modulation of this Subpopulation by Interferon (INF). *The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress.* April 4-8. 181p.

155- Rizzetto M., Canese M., Arico S., Crivelli O., Bonino F., Trepo C. and Verme G. 1977. Immunofluorescence Detection of a New Antigen-Antibody System (Delta/Anti-Delta) Associated with the Hepatitis B Virus in the Liver and the Serum of HBsAg Carriers. *Got* 18: 997-1003.

156- Robinson W. 1982. The Enigma of Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Infect. Dis.* 145: 387-395.

157- Roggendorf M., Deinhardt F., Rasshofer R., Eberle J., Hopf U., Moller B. et al 1989. Antibodies to Hepatitis C Virus. *The Lancet* ii: 324-325.

- 158- Rousell R., Good R., Pirofsky B. and Schiff R. 1988. Non-A, Non-B Hepatitis and The Safety of Intravenous Immune Globulin, pH 4.2. A Retrospective Survey. *Vox Sanguinis* 54: 6-13.
- 159- Sampliner R., Woronow D., Alter M., Smallwood L., Tabor E., Deinhardt F. et al. 1984. Community-Acquired Non-A, Non-B Hepatitis: Clinical Characteristics and Chronicity. *J. Med. Virol.* 13: 125-130.
- 160- Sánchez-Tapias J., Barrera J., Costa J., Ercilla M., Parés A., Comalrrena L. et al. 1990. Hepatitis C Virus Infection in Patients with Nonalcoholic Chronic Liver Disease. *Ann. Inter. Med.* 112: 921-924.
- 161- Sansonno D. and Dammacco F. 1989. Antibodies to Hepatitis C Virus in Non-A, Non-B Post-Transfusion and Cryptogenetic Chronic Liver Disease. *The Lancet* ii: 798-799.
- 162- Schaff Z., Seto B., Coleman W. and Lepiz K. 1988. Morphology, Immunohistochemistry, and In Situ Hybridization of Experimental and Human Non-A, Non-B Hepatitis. In: Viral Hepatitis and liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 580-587.
- 163- Schvarcz R., Weiland O. and Glaumann H. 1988. Alpha Interferon Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis Caused by Intravenous Gammaglobulin. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 231-232.
- 164- Serrano M., Morte S., Castilla A., Civeira M. and Prieto J. 1988. -Interferon Production by Peripheral Mononuclear Cells in Patients with Chronic Non-A, Non-B Hepatitis. In:

Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 572-575.

165- Seto B. and Gerety R. 1985. A Glycoprotein Associated with Non-A, Non-B Hepatitis Agent(s). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 4934-4938.

166- Sherlock Sh. 1989. Virus Hepatitis B, A, Non-A, Non-B. J. Hepat. 8: 254-258.

167- Shimizu Y., Oomura M., Kenji-Abe., Uno N., Yamada E., Ono Y. and Shikata T. 1985. Production of Antibody Associated with Non-A, Non-B Hepatitis in a Chimpanzee Lymphoblastoid Cell Line Established by " In Vitro " Transformation with Epstein-Barr Virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 2138-2142.

168- Shiraishi H., Alter H., Feinstone S. and Purcell R. 1985. Rheumatoid Factor-Like Reactants in Sera Proven to False-Positive Reactions in Non-A, Non-B Assays. Hepatology 5: 181-187.

169- Simon N., Pichoud C., Vitvitski L., Trepo C. and Kuntziger H. 1990. Passive Anti-HCV Antibodies Passively Transferred by HBIg Prevent or Delay Hepatitis C and Modulate the Seroconversion Pattern Among Hemodialysed Patients. The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 183p.

170- Skidmore S., Hebet H. and Elias E. 1990. The Incidence of Anti-Hepatitis C (HCV) in Non-A, Non-B Hepatitis (NANBH) Before and After Transplantation. In the 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: the 7<sup>th</sup>

Triennial Congress. April 4-8. 17p.

171- Skidmore S., Pasi K., Mawson S., Williams M. and Hill F. 1990. Serological Evidence That Dry Heating of Clotting Factor Concentrates Prevents Transmission of Non-A, Non-B Hepatitis. *J. Med. Virol.* 30: 50-52

172- Skidmore S. 1990. Recombinant Immunoblot Assay for Hepatitis C Antibody. *The Lancet* 335: 1346.

173- Spengler V., Kaczmarska A., Grunerbl A., Hoffmann R., Rieker E., Johnson J. et al. 1988. Involvement of Immunological Mechanisms in the Pathogenesis of Non-A, Non-B Hepatitis. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 576-579.

174- Spertini O. and Frie P. 1982. Demonstration of a Single Antigen-Antibody System in 26 Patients with Non-A, Non-B Viral Hepatitis. *The Lancet* ii: 899-903.

175- Sugg U., Schenzle D. and Hess G. 1988. Antibodies to Hepatitis B Core Antigen in Blood Donors Screened for Alanine Aminotransferase Level and Hepatitis Non-A, Non-B in Recipients. *Transfusion* 28: 386-388.

176- Suh D., Eddleston A., Tsiquaye K., White Y., Amini S., Zuckerman A. and Williams R. 1981. Specificity of and Immunoprecipitating Test for Non-A, Non-B Hepatitis. *The Lancet* i: 1178-1180.

177- Suh D., White Y., Eddleston A., Amini S., Tsiquaye K., Zuckerman A. and Williams R. 1981. Specificity of an Immunoprecipitating Test for Non-A, Non-B Hepatitis. *The Lancet* i: 178-180.

- 178- Tabor E. and Gerety R. 1980. Inactivation of an Agent of Human Non-A, Non-B Hepatitis by Formalin. *The J. Infet. Dis.* 142: 767-770.
- 179- Tabor E. 1981. Development and Application of the Chimpanzee Animal Model for Human Non-A, Non-B Hepatitis. *Acad. Press Inc. USA. Cap. 2: 189-206.*
- 180- Tabor E. 1985. The Three Viruses of Non-A, Non-B Hepatitis. *The Lancet* i: 743-745.
- 181- Takahashi M., Yamada G., Endo H., Nishimoto H., Takabuchi K., Matsueda K. et al. 1990. Comparison Between Short-Term and Long-Term Therapy for Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Interferon Alpha or Interferon Beta. *The 1990 International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 181p.*
- 182- Tassapoulos N., Alikiotis M., Limotirakis F., Nicolakakis P., Mela H. and Paralogou-loannides M. 1988. Acute Sporadic Non-A, Non-B Hepatitis in Greece. *J. Med. Virol.* 26: 71-77.
- 183- Teraoka S., Mishiro S., Ebihara K., Sanaka T., Yamaguchi Y., Nakajima I. et al. 1988. Effect of Cyclosporine on Proliferation of Non-A, Non-B Hepatitis Virus. *Trans. Proc.* 20: 868-876.
- 184- Theilmann L., Blazek M., Goeser T., Gmelin K., Kommerell B. and Fiehn W. 1990. False-Positive Anti-HCV Tests in Rheumatoid Arthritis. *The Lancet* 335: 1346.
- 185- Trepo C., Vitvitski L. and Hantz O. 1981. Non-A, Non-B Hepatitis Virus: Identification of a Core Antigen-Antibody

System that Cross Reacts with Hepatitis B Core Antigen and Antibody. *J. Med. Virol.* 8: 31-47.

186- Trepo C., Vitvitski L., Hantz O. and Pichoud C. 1982. Could Hepatitis B-like Non-A, Non-B Hepatitis Simple be Seronegative Hepatitis B ?. *The Lancet* i: 1182.

187- Troisi C. and Hollinger F. 1987. Current Test for Antibody to Hepatitis B Core Antigen Used to Screen Donors for Non-A, Non-B, Hepatitis are Comparable to the original radioimmunoassay for Hepatitis B Core Antigen. *Transfusion* 27: 438-440.

188- Tsuda F., Takahashi T., Takahashi K., Miyakawa Y. and Mayumi M. 1975. Determination of Antibody to Hepatitis B Core Antigen by Means of Immune adherence Hemagglutination. *The J. Immunol.* 115: 834-838.

189- Vander Poel C., Reesink H., Lelie P., Leentvaar-Kuypers A., Choo Q-L. and Kuo G. 1989. Anti-Hepatitis C Antibodies and Non-A, Non-B Post-Transfusion Hepatitis in the Netherlands. *The Lancet* ii: 297-298.

190- Vander Poel C., Reesink H., Schaaskerg W., Leentvaar-Kuypers A., Bakker E., Exel-Oehlers P. and Lelie P. 1990. Infectivity of Blood Seropositive for Hepatitis C Virus Antibodies. *The Lancet* 335: 558-560.

191- Vargas V., Castells L. and Esteban J. 1990. High Frequency of Antibodies to the Hepatitis C Virus Among Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Inter. Med.* 112: 232-233.

192- Varma R., Goswami A. and Johanson J. 1990. Oral

Acyclovir Therapy for Chronic Hepatitis C: A Prospective, Controlled Study. The International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease: The 7<sup>th</sup> Triennial Congress. April 4-8. 183p.

193- Vickers C., Hubscher S., Skidmore S., McMaster P. and Elias E. 1988. Sporadic Non-A, Non-B Hepatitis as a Cause of Acute Liver Failure. In: Viral Hepatitis and Liver Disease. Ed. A. J. Zuckerman. A. Liss Inc. USA. Pp: 561-563.

194- Villarejos V., Visoná K., Eduarte C., Provost P. and Hilleman M. 1975. Evidence for Viral Hepatitis Other than Type B Among Persons in Costa Rica. N. Eng. J. Med. 293: 1350-1352.

195- Villarejos V., Provost P., Ittelsohn O., Mclean A. and Hilleman M. 1976. Seroepidemiologic Investigations of Human Hepatitis Caused by A, B and Possible Third Virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152: 524-528.

196- Villarejos V. 1981. Studies on Non-A, Non-B Hepatitis in Costa Rica. In: Non-A, Non-B Hepatitis. Ed. R. J. Gerety. USA. Pp: 175-187.

197- Villarejos V., Serra J. and Visoná K. 1981. Epidemiological Observations on the Relationship Between the Non-A, Non-B Hepatitis B Viruses. In: Viral Hepatitis 1981 International Symposium. Eds. W. Szmuness. H. Alter and Maynard J. USA. Pg: 768-769.

198- Villarejos V., Visoná K. and Serra J. 1983. Evaluation of the Specificity of an Immunoprecipitin Test for Non-A, Non-B Hepatitis. J. Infec. Dis. 147 (4): 702-709.

- 199- Villarejos V., Visoná K., Moreno E. and Zamora E. 1984. Observations on an Antigen Antibody System Related to Non-A, Non-B Hepatitis. Cap. 28. Eds. Uyas Deinstag & Hoofnagle. USA. Pp: 367-369.
- 200- Visoná K., Eduarte C., Zamora E. and Salazar L. 1989. Estudio Epidemiológico de Hepatitis Virales en San Ramón y Palmares de 1972-1985. Acta Médica Costarricense 33: 69-77. 1989.
- 201- Vitvitski L., Trepo C. and Hantz O. 1980. Use of the Cross-Reactivity Between Hepatitis B and Non-A, Non-B Viruses for the Identification and Detection of Non-A, Non-B "e" Antigen. J. Virol. Meth. 1: 149-156.
- 202- Walsh J., Yallow R. and Berson S. 1970. Detection of Australia Antigen and Antibody by Means of Radioimmunoassay Techniques. J. Infect. Dis. 121: 550-553.
- 203- Watanake T., Reddy K., Jeffers L., Dickinson G., Oconnell M. and Scheff E. 1984. Electron Microscopic Evidence of Non-A, Non-B Hepatitis Markers and Virus-like Particles in Immunocompromised Humans. Hepatology 4: 628-632.
- 204- Watanake T., Katagiri J., Kojima H., Kamimura T., Ichida F., Ashida M., et al. 1987. Studies on Transmission of Human Non-A, Non-B Hepatitis to Marmosets. J. Med. Virol. 22: 143-156.
- 205- Weiland O., Berg J., Bjorvatn B., Flehmig B. and Lundbergh P. 1981. Acute Viral Hepatitis A, B, Non-A, Non-B in Stockholm in the 1950s and 1970s: A Comparison. Eur. Jour. Clin. St. Treat. Infec. 9: 268-274.

- 206- Weiland O., Schvarcz R., Wejstal R., Norkrans G., Foberg U. and Fryden A. 1989. Interferon Alpha-2b Treatment of Chronic Posttransfusion Non-A, Non-B Hepatitis: Interim Results of a Randomized Controlled Open Study. *Scand. J. Infect. Dis.* 21: 127-132.
- 207- Weiner A., Kuo G., Bradley D., Ferruccio B., Saracco G., Lee C. et al 1990. Detection of Hepatitis C Viral Sequences in Non-A, Non-B Hepatitis. *The Lancet* 335: 1-3.
- 208- Wejstal R., Lindberg J., Lundin P., Hansson B. and Norkrans G. 1988. Chronic Non-A, Non-B Hepatitis in Drug Addicts. A Follow up Study. *Infection* 16: 163-166.
- 209- Wejstal R., Hermodsson., Iwarson S. and Norkrans G. 1990. Mother to Infant Transmission of Hepatitis C Virus Infection. *J. Med. Virol.* 30: 178-180.
- 210- Williams B., Prince A., Huima T. and Brotman B. 1988. Spumaviruses Isolated From Sources Containing Agents of Non-A, Non-B (NANB) Hepatitis Do Not Cause NANB Hepatitis. *J. Med. Virol* 24: 263-274.
- 211- Williams P., Yap P., Gillan J., Crawford R., Urbaniak S. and Galea G. 1989. Transmission of Non-A, Non-B Hepatitis by pH4-Treated Intravenous Immunoglobulin. *Vox. Sang.* 57: 15-18.
- 212- Wreghitt T., Gray J., Aloyisus S., Contreras M. and Barbara J. 1990. Antibodies Avidity Test for Recent Infection with Hepatitis C Virus. *The Lancet* 335: 789.
- 213- Yoshizawa H., Itoh Y., Iwakiri Sh., Kitajima K., Tanaka A., Nojiri T. et al. 1981. Demonstration of two Different types of Non-A, Non-B Hepatitis by Reinjection and

Cross-Challenge Studies in Chimpanzees. *Gastroenterology* 81: 107-113.

214- Zeldis J., Depner T., Kuramoto I., Gish R. and Holland P. 1990. The Prevalence of Hepatitis C Virus Antibodies Among Hemodialysis Patients. *Ann. Inter. Med.* 112: 958-960.

215- Zhuang H., Goulepis A., Locarnini S., Kaldor J., Marshall J. and Gust I. 1983. Characterization of a Precipitating Antigen Detected in the serum of Patients with Viral Hepatitis. *J. Med. Virol.* 11: 267-276.

216- Zuckerman A. 1989. The Elusive Hepatitis C Virus. A Cause of Parenteral Non-A, Non-B Hepatitis. *B.M.J.* 299: 871-873.