

MARCADORES SEROLOGICOS EN LAS HEPATITIS VIRALES

Dra. Patricia Chacón y Dr. Carlos Aponte*

Laboratorio de Programas Especiales VIH & Hepatitis.

Gerencia de Diagnóstico y Epidemiología.

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Apdo. 1040. Caracas-Venezuela

RESUMEN

Las hepatitis virales constituyen en su conjunto un serio problema de salud pública. Desde las primeras transfusiones sanguíneas, la transmisión de hepatitis de naturaleza viral fue un evento frecuente con un inmenso impacto en salud. Después del descubrimiento del virus de la hepatitis B (VHB), todos los donantes de sangre son tamizados para el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg). Por otro lado, este antígeno (HBsAg) en conjunto con un abanico de otros marcadores [Antígeno core (HB core), anticuerpos anti-HBV, antígeno e (HBeAg) y anticuerpos contra el antígeno e (anti-HBeAg)] asociados a la infección permite un seguimiento detallado de la evolución clínica del paciente. A partir de 1991, con el descubrimiento del genoma del virus de la Hepatitis C (VHC) y el desarrollo de test sensibles anti-VHC se permitió el diagnóstico y seguimiento de los pacientes infectados. Para el virus de la Hepatitis Delta, virus defectivo que requiere de la ayuda del VHB para replicarse, el diagnóstico se realiza mediante la detección del HDAg, así como de IgM e IgG o el ARN VHD por técnica de biología molecular. Otros dos virus implicados en hepatitis pero cuya transmisión es fecal-oral son el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis E. Diversos ensayos inmunoenzimáticos y Western-blot usando proteínas recombinantes han sido desarrollados para detectar IgM e IgG contra el virus de la hepatitis E (HEV). Respecto al virus de la Hepatitis A, el diagnóstico se realiza mediante la detección de IgM anti VHA por métodos de inmunoensayo.

PALABRAS CLAVE: HEPATITIS, MARCADORES SEROLÓGICOS, DETECCIÓN, TEST SEROLÓGICOS.

ABSTRACT

Viral hepatitis infections represent a serious public health problem. Since the beginning of blood transfusions concomitant transmission of viral hepatitis has been frequent with an important impact in health. After the discovery of hepatitis B virus (HBV), donors in all countries have been screened for its surface antigen (HBsAg). This antigen is used in clinical evolution, in association with several markers, such as Core Antigen (HB core), antibody anti-HBV, e antigen (HBeAg) and antibodies against e-antigen (anti-HBeAg), implicated in infection. Since 1991, the discovery of the hepatitis C virus (HCV) genome and the development of sensitive anti-HCV assays has meant that reliable detection of persistently infected HCV patients. The Hepatitis Delta virus (HDV), a defective virus, requiring a helper function from HBV for replication, is detected using the hepatitis Delta antigen (HDAg), and/or IgM e IgG, and ARN VHD by molecular biology tools. Two viruses are transmitted via oral-fecal: Hepatitis A virus (VHA) and Hepatitis E virus (HEV). Several enzymatic immune assays (EIA) and Western blot using recombinat proteins have been developed. These assays are able to detect IgM e IgG against HEV. VHA infection is established by detecting IgM anti VHA by EIA.

KEY WORDS: HEPATITIS, DETECTION,

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 53-65

Aceptado para su publicación agosto de 2000

HEPATITIS A

El virus de la Hepatitis A (VHA) fue identificado en 1973¹. Esto permitió el desarrollo de pruebas serológicas y métodos de cultivo "in vitro", lo cual facilitó investigar la seroepidemiología, patogénesis e inmunobiología del virus. El virus de la Hepatitis A es una partícula de cadena simple de ARN con sentido positivo. Ha sido clasificado como la única especie del nuevo género, Heparnavirus, dentro de la familia Picornaviridae². El genoma del VHA es una molécula lineal de ARN de aproximadamente 7.5 kb. Como otros picornavirus el extremo 5' terminal del genoma comienza con una región no codificante (5'UTR), la cual contiene una pequeña proteína (VPg) covalentemente unida al extremo 5' terminal³ y actúa como un sitio de entrada interno al ribosoma (IRES)⁴. La región codificante del genoma consiste en un solo marco de lectura abierta de 6681 nucleótidos. Este ha sido arbitrariamente dividido en tres regiones denominadas P1, la cual codifica para 4 proteínas de la cápside (VP1 a VP4), P2 y P3, las cuales codifican las proteínas no estructurales requeridas para el procesamiento y maduración de la poliproteína, y la replicación viral⁵.

El genoma del VHA es altamente conservado, es lo que ha reportado el estudio comparativo de la secuencia nucleotídica de aislados procedentes de diferentes regiones geográficas⁶. Sin embargo, la comparación de la secuencia de ácidos nucleicos en la región alrededor de la unión VP1/2A de simios y humanos aislados de diferentes regiones ha permitido la clasificación de cepas de VHA en siete genotipos distintos (I-VII) y varios subtipos⁷. Pero a pesar de la existencia de diferentes genotipos, en los humanos existe un solo serotipo de VHA lo cual explica la protección cruzada que proporciona la inmunoglobulina humana y la vacuna inactivada de VHA contra la infección con cepas no relacionadas de VHA⁸.

Entre los virus, VHA es uno de los más resistentes a la degradación por las condiciones ambientales. Esta propiedad

es probablemente el factor que determina el mantenimiento y los brotes de VHA dentro de las poblaciones. La infección por VHA es predominantemente transmitida por la vía fecal-oral. Tiene un período de incubación de 20-45 días, con un promedio de 28 días. La duración del período de incubación podría estar inversamente relacionado con el título de VHA en el inóculo. El virus atraviesa el intestino y una vez que alcanza el hígado se replica en el hepatocito y es liberado al torrente sanguíneo (viremia). Al mismo tiempo el virus esta presente en la bilis y en las heces. El contenido del virus en las heces y la viremia en sangre es máxima justo antes y poco después que se inician los trastornos de la función hepática y termina al momento en que la inmunidad humoral contra VHA es detectada^{5,6}. Casi al mismo tiempo en que se desarrollan los síntomas clínicos de la hepatitis, se pueden detectar anticuerpos del tipo IgM, IgG e IgA contra VHA, esto ocurre aproximadamente 2 días después del inicio de la enfermedad⁹. La IgM anti VHA persiste sólo de 2 a 6 meses, su detección es fácil con métodos de inmunoensayo, siendo referencia "standard" para el diagnóstico específico de VHA. La IgG anti VHA es la clase de anticuerpos que encontramos en mayor proporción durante la convalecencia y existe evidencia de que es la primera defensa contra la reinfección. Este tipo de inmunoglobulina persiste durante años⁹. La hepatitis A es subclínica o suave en niños, y en adultos, la enfermedad suele ser más severa y prolongada, con un curso bifásico o colestasis. La hepatitis fulminante es rara. Se han descrito casos de cronicidad pero no es la forma clínica usual¹⁰.

El diagnóstico se realiza mediante la detección de IgM anti VHA por métodos de inmunoensayo, esta inmunoglobulina aparece tempranamente durante la infección. La detección de IgG anti VHA se hace para determinar inmunidad por infección previa o vacunación. El aislamiento del VHA y detección de antígenos o ARN es complicado y costosa por lo que no se usa para el diagnóstico⁹.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

HEPATITIS B

El virus de la Hepatitis B (VHB) pertenece a la familia Hepadnaviridae¹¹. El virión completo del VHB (partícula de Dane) tiene un diámetro de aproximadamente 42 nm, con una capa externa o envoltura lipoprotéica que rodea la nucleocápside interna (30 – 34 nm de diámetro), la cual está formada por 180 copias de la proteína de cápside (denominada antígeno de la cápside HBcAg). La nucleocápside o core contiene el ADN genómico, la polimerasa viral, unida covalentemente al extremo 5' de la hebra negativa del ADN viral y el antígeno e de la hepatitis B (HBeAg)^{12,13,14,15,16,17,18}. El genoma del virus está formado por una molécula de ADN circular, pequeña y parcialmente de doble cadena. La cadena larga, de polaridad negativa tiene un tamaño de aproximadamente 3.2 kb, con los extremos 5' y 3' fijos, formando un círculo casi continuo, la circularidad está mantenida por puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos de aproximadamente 220 nucleótidos. La cadena corta de polaridad positiva tiene una longitud variable (20-80% la longitud de la cadena negativa), con un extremo 5' fijo, unido covalentemente al extremo 5' de la cadena negativa. La cadena negativa además está unida covalentemente al dominio terminal de la polimerasa viral. Los extremos terminales de ambas cadenas (extremos cohesivos) situados en los extremos 5' de cada cadena presentan una secuencia de 11 nucleótidos que se repiten directamente, conocidas como DR1 en la cadena negativa y DR2 en la cadena positiva. Dichas secuencias se encuentran implicadas en la replicación e integración del genoma del virus¹⁹.

El genoma de este virus codifica 7 proteínas estructurales, a partir de 4 marcos de lectura abierta (ORF) identificados en la cadena negativa. La síntesis de este número de proteínas se logra gracias a un extensivo solapamiento de sus genes. Los 4 marcos de lectura abiertas (ORF) han sido designados como: P, S, pre-C/C y X. El gen P abarca la mayor parte del geno-

ma. El gen S está dentro del gen P. Los genes C y X se solapan parcialmente "upstream" y "downstream" respectivamente con el gen P^{20,21}. El gen S (envoltura): contiene 3 codones de iniciación en el mismo marco de lectura, lo cual permite dividirlo desde el extremo 5' al 3' en tres regiones: Pre S1, Pre S2 y S que codifican para la síntesis de las proteínas Grande (L), Mediana (M) y Pequeña (S o principal) que conforman la envoltura del VHB (HBsAg). La proteína pequeña del HBsAg, es el componente mayoritario de las envolturas vacías del virus. Ciertas mutaciones en el gen S modifican el sub-tipo del VHB. El gen C (Cápside): tiene 2 codones de iniciación que le permite la síntesis de 2 polipéptidos: la región C codifica la proteína de la nucleocápside vírica o core, la cual no es secretada a la sangre por encontrarse unida al retículo endoplasmático del hepatocito. La región Pre C/C codifica para el antígeno e (HBeAg), el cual es secretado a la sangre. El gen P (polimerasa): codifica la polimerasa de ADN del virus, tiene actividad de polimerasa dependiente de ARN y ADN. El gen X: codifica una proteína X, que contiene el promotor del gen C. Esta proteína participa como regulador de los mecanismos de transcripción y replicación del virus, siendo muy inmunógena detectándose anticuerpos frente a ella¹⁹⁻²².

Se han descrito 6 genotipos (A-F), los cuales tienden a estar distribuidos geográficamente²³. El genotipo F es autóctono de América del Sur²⁴. Por otra parte se han determinado 4 subtipos antigénicos y otros sub-subtipos basados en las sustituciones en la proteína S²⁵. Todos los subtipos de HBsAg del virus VHB poseen un determinante antigénico a, que es común para todos, pero además, existen otros dos grupos de determinantes asociados al a y mutuamente excluyentes, el grupo d/y y el grupo w/r²⁶; esto origina los 4 subtipos clásicos del HBsAg: adw, adr, ayw, ayr. Se ha determinado la heterogeneidad del determinante antigénico w y el determinante q²⁷. Más recientemente se ha descrito un par alélico adicional, los

subtipos i y t que corresponden a un cambio de isoleucina en la posición 126 por treonina²⁸. La importancia clínica de una variante de HBsAg puede ser diferente dependiendo de la naturaleza de la sustitución. Los genotipos aparentemente no tienen ninguna ventaja de replicación o potencial patógeno unos con respecto a otros, sin embargo, se sugiere que el subtipo adr podría estar frecuentemente asociado con portadores²⁹ y el genotipo D podría estar asociado con hepatitis fulminante en una proporción mayor de lo esperado de acuerdo a su prevalencia en portadores crónicos³⁰.

La hepatitis B es una infección universal. Es transmitida por vía parenteral. La transmisión al neonato se produce durante el período prenatal, especialmente durante el 3^{er} trimestre y durante el período postnatal. Se transmite a través del contacto sexual, el compartir los utensilios de aseo personal, transfusiones sanguíneas, etc. Se consideran grupos de alto riesgo sujetos que utilizan drogas de uso endovenoso (drogadictos IV), homosexuales, trabajadores de la salud, especialmente los que laboran en unidades de hemodiálisis y en el área oncológica, cirujanos, odontólogos y pacientes con retardo mental institucionalizados. La Hepatitis B tiene un período de incubación de 2 – 6 meses. Se han definido varios patrones de infección con este virus. Muchas infecciones primarias en adultos son autolimitadas y revierten totalmente en 6 meses. Un elevado número de ellas son subclínicas y se detectan sólo por pruebas serológicas y otros métodos. Una fracción de las infecciones no se resuelve, haciéndose persistente y posiblemente continua por años, produciendo complicaciones tales como cirrosis y carcinomas hepatocelulares³¹.

Las formas virales en la sangre, así como la respuesta inmune a los diferentes antígenos virales constituyen marcadores que pueden usarse para seguir el curso de la infección. Estos marcadores se modifican a lo largo del tiempo en estrecha relación con la evolución biológica de la enfermedad, por ello su

determinación cualitativa y cuantitativa puede servirnos para evaluar la situación actual y el pronóstico futuro de la infección viral, así como conocer la susceptibilidad en el individuo sano.

Antígeno de superficie (HBsAg)

Se sintetiza en el citoplasma del hepatocito. Podemos encontrarlo en el citoplasma del hepatocito y en sangre durante el período de incubación, fase aguda de la infección y en el estadio crónico. El HBsAg puede circular como parte del virón o como partículas de envoltura viral incompleta en las cuales no se ha detectado ácido nucleico (32). Si la evolución es favorable desaparecerá a los 3-6 meses de la enfermedad, si se mantienen títulos elevados durante más de 6-8 semanas, o si no hay una disminución significativa de su título en el primer mes de la enfermedad es indicio de mal pronóstico y de probable evolución a la cronicidad. La positividad de este marcador más allá del sexto mes de infección, define la situación clínica de la hepatitis crónica.

Existen diferentes métodos para la detección del HBsAg como son: hemaglutinación pasiva reversa (RPHA), radioinmunoensayo y el ensayo inmunoenzimático (Elisa), actualmente, el más utilizado para el diagnóstico en laboratorios clínicos. El método confirmatorio para el HBsAg consiste en la realización de una neutralización específica que utiliza anticuerpos contra el antígeno de superficie (anti-HBs) concentrados capaces de producir una inhibición de al menos el 50 % de la muestra cuando se compara con el control. Sin embargo, es necesario considerar que la reactividad aislada para HBsAg puede ser debido a: a. Inmunotolerancia extrema, b. Estadio precoz de la infección aguda por VHB, c. Infección por cepas de VHB defectivas en la expresión del HBxAg, con niveles de ADN vírico detectables sólo por PCR y d. Infección por VHB tipo 2¹⁹⁻³³.

Antígeno de la cápside (HBcAg)

Se sintetiza en el núcleo de la célula hepática y no es posible hallarlo aisladamente en el suero del paciente, sino



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

formando parte de la partícula de Dane. Su poder inmunógeno induce la producción de los anticuerpos anti-HBc de clase IgM e IgG.

Anticuerpos Anti-HBc

Es el primer anticuerpo que aparece en la enfermedad, es detectable con los primeros síntomas de la enfermedad en la fase aguda y en la crónica. Este persiste por años después de la recuperación. La presencia de anticuerpos de la clase IgM frente a estos marcadores se interprete habitualmente como indicador de infección reciente, aunque también es detectable en los casos de enfermedad crónica con replicación viral y lesión hepática, pero en concentraciones menores que las encontradas en la fase aguda. La IgM contra el core puede ser detectada por un tiempo variable entre 12 y 18 meses. Los anticuerpos de la clase IgG suelen indicar una infección pasada. Su positividad confirmada y en solitario no asegura protección frente enfermedad y no constituye un criterio de exclusión para la vacunación. La reactividad aislada para anti-HBc, con ausencia de otros marcadores de infección VHB puede deberse a 1. Reacción inespecífica ligada a componentes séricos (La especificidad debe confirmarse mediante otra técnica serológica de distinto formato, la detección de anti-HBe o la presencia de ADN vírico), 2. Período de ventana de la infección por VHB y 3. Respuesta inmunitaria incompleta al VHB, es decir, la incapacidad para la producción de anti-HBs.

Antígeno e (HBeAg)

Este antígeno es detectable en la mayoría de los enfermos que se encuentran en la fase aguda y en alguna forma de enfermedad crónica en las que histológicamente se corresponde con hepatitis crónica activa. Su mayor valor clínico se debe a su excelente correlación con la presencia de replicación viral y viremia. Su desaparición en el curso de una hepatitis aguda o crónica suele indicar buena evolución y posiblemente su seroconversión a anti-HBe con

curación o paso a un estadio menos agresivo de la enfermedad. Existen casos en los que esta seroconversión, si persiste la replicación viral, supone un mal pronóstico de la enfermedad (variante Pre-C negativo). En algunas ocasiones, este marcador debe ser manejado junto con anti-HBe y DNA-HBV para poder valorar la respuesta inmune frente a las proteínas del virus y la viremia ya que por sí solo no permite predecir con certeza la presencia o no de replicación viral.

Anticuerpos anti-HBe

Generalmente se detecta antes de que desaparezca el HBsAg y persiste varios años después de la infección. En los casos de infección aguda su aparición es de buen pronóstico. En los casos de infección crónica, en los que coexiste con el HBsAg, suele indicar escasa replicación e infectividad. Sin embargo, como se comenta anteriormente la seroconversión anti-HBe no siempre indica mejoría, sino que puede deberse a la selección de mutantes Pre-C del VHB que se asociase a la replicación vírica con cuadros de hepatitis crónica y cirrosis.

Anticuerpos anti-HBs

Indica recuperación de la enfermedad, es el último marcador en aparecer y persiste durante años. Estos anticuerpos son neutralizantes y confieren protección a la infección por VHB. En individuos vacunados es el único marcador que detectamos. La reactividad aislada para anti-HBs en personas no vacunadas puede ser debido a reacciones serológicas inespecíficas, infección antigua con pérdida de anti-HBc o respuesta inmune incompleta frente a la infección por VHB. La coexistencia de anti-HBs y HBsAg puede ser debido a 1. Infección por variantes del VHB defectivas de a (mutantes de escape)³⁴ en sujetos previamente vacunados o en pacientes en tratamiento con interferón, 2. Infecciones por el VHB tipo 2 en individuos inmunes al VHB, 3. Fenómenos de tolerancia inmunológica, 4. Administración de gammaglobulina específica en pacientes portadores del HBsAg.

DNA del VHB

Su detección representa el marcador más sensible y específico de replicación viral. El DNA vírico libre en el suero puede detectarse mediante técnicas de hibridación y por amplificación mediante PCR¹⁹.

Variantes del VHB

El VHB presenta una tasa de mutación relativamente alta³⁵, a pesar de tener un genoma ADN, este fenómeno ha sido atribuido al requerimiento de un paso de transcripción reversa en la replicación de su genoma utilizando una transcriptasa reversa que carece de actividad correctora. Se han descrito mutaciones en todas sus regiones génicas, que afectan no sólo la evolución clínica y la respuesta terapéutica, sino que tiene consecuencias importantes desde el punto de vista diagnóstico (patrones serológicos atípicos) preventivo (evolución de la protección que confiere la vacuna) y epidemiológico.

Variantes defectivas PRE-C

Mutación puntual (codón 1896) en la región Pre-C del genoma que impide la transcripción de las secuencias Pre-C y C y por ende la síntesis de HBeAg³⁶. Estudios posteriores demostraron que la mutación Pre-C no es selectiva en cuanto al lugar. Pueden presentarse mutaciones en distintos codones de la secuencia Pre-C con las mismas consecuencias. Estas variantes se generan por selección inmunológica en el individuo infectado con el fin de evadir la inmunidad celular³⁷. Este tipo de variantes puede ser encontrada en pacientes con hepatitis B crónica activa resistente al tratamiento con interferón. También se asocia con carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante³⁸.

Variantes defectivas a

Cepas del VHB con una mutación en el gen S, lo cual las hace incapaces de expresar el determinante antígeno común a, del HBsAg. Esta mutación genera alteración de los epítopes

inmunodominantes del determinante a, que impide su reconocimiento con anticuerpos monoclonales específicos. Esto produce fracaso de la inmunoprofilaxis en recién nacidos de madres portadoras de HBsAg³⁴. Las variantes de escape del VHB pueden no ser detectadas cuando se utilizan métodos serológicos basados exclusivamente en anticuerpos monoclonales frente al determinante a¹⁹.

Mutaciones en el gen X

La infección por cepas VHB con mutaciones en el gen X cursa con ausencia de marcadores serológicos de infección por VHB, se asocia con frecuencia a carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante. El diagnóstico requiere siempre técnicas de amplificación genómica (PCR)¹⁹.

VHB Tipo 2

El origen del tipo 2 del VHB parece deberse a la aparición de mutaciones en el gen X que ocasiona que el virus se replique y exprese de forma insuficiente, siendo incapaz de estimular una respuesta inmune adecuada³⁹. Desde el punto de vista serológico se caracteriza por presentar reactividad aislada al HBsAg sin seroconversión anti-HBc y ausencia de HBeAg. Transitoriamente puede detectarse anti-HBs con niveles bajos de HBsAg y DNA vírico. El diagnóstico de esta variante implica la introducción de ensayos que empleen anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de la región Pre S2 de subtipo d, o mediante técnicas de PCR del gen S¹⁹.

HEPATITIS C

El virus de la hepatitis C (VHC) fue identificado en 1989⁴⁰. El VHC es único en virología ya que fue el primer virus identificado puramente por técnicas de biología molecular y no por las clásicas técnicas de aislamiento viral o microscopía electrónica. El VHC ha sido clasificado en un género separado (Hepacivirus) de la familia Flaviviridae⁴¹. El virus tiene aproximadamente 60 nm de



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

diámetro y consta de una envoltura lipoproteica derivada de la membrana del huésped, dentro de la cual están todas las glicoproteínas virales (E1 -E2) rodeando una nucleocápside y una hebra sencilla de ARN de polaridad positiva de alrededor de 9.600 nucleótidos. El genoma consiste en regiones no codificantes 5' y 3' que flanquean un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica proteínas estructuradas y no estructurales. Las proteínas estructurales codificadas por los genes (C, E1 y E2) son: la proteína de la nucleocápside (core) y las glicoproteínas de envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales son enzimas relacionadas con la replicación viral y son codificadas por los genes NS2, NS3, NS4 y NS5 ⁴².

Los VHC aislados alrededor del mundo han sido separados en 6 genotipos principales denominados con números del 1 al 6, cada tipo a su vez puede tener algún subtipo que se denomina con letras minúsculas ⁴³. La existencia del genotipo puede tener relevancia en términos de inmunogenicidad así como también en términos de distribución geográfica, con posibles implicaciones en el diagnóstico, historia natural y manejo de la infección ^{42, 43, 44}. Otro punto importante con respecto a este virus es que durante la infección se generan las denominadas "quasispecies" que no son más que variantes virales, o sea viriones con genomas que muestran diferencias con el virus original en la secuencia de nucleótidos de su ARN, son producto de mutaciones que aparecen en períodos cortos de tiempo, durante el lapso que dura la infección en un mismo sujeto infectado y que sólo se diferencia entre sí por variaciones menores del 5 %. Esta alta tasa de mutaciones, lo cual es característico de los virus ARN, puede ser atribuido a la ARN polimerasa, que tiene la particularidad de ser poco precisa, cometiendo frecuentemente errores en la transcripción y por otra parte careciendo de mecanismos de auto corrección. Esta tendencia del virus a mutar y formar una gran variedad de subtipos virales se incrementa por la acción del sistema inmunológico o por los medicamentos antivirales que ejercen

presión selectiva favoreciendo la aparición de mutantes de escape ⁴⁵.

La transmisión es principalmente por vía parenteral. Los grupos de mayor riesgo lo conforman los receptores de productos sanguíneos, los drogaditos IV y los pacientes en diálisis, así como el trabajador de la salud que esta en contacto frecuente con sangre. La transmisión vertical es baja, aproximadamente 6%. La transmisión sexual es infrecuente pero ocurre. Sin embargo, existe un número variable de personas infectadas sin factores de riesgos obvios ^{46, 47}. El período de incubación varía desde 2 semanas hasta 6 meses con una media entre 7-8 semanas. Aunque la infección aguda por lo general es oligosintomática y anictérica sólo un 15-25% de las personas infectadas con VHC logran eliminar por completo el virus, el restante 75-85% de las personas desarrollan una infección crónica. Los pacientes infectados crónicamente en un 10-20% desarrollan una cirrosis y el 1-5% carcinoma hepatocelular ⁴⁷. Las manifestaciones extrahepáticas de la infección por VHC, pueden en determinados casos constituir la alteración clínica con que se presente el paciente. Se debe principalmente a la presencia de complejos inmunocirculantes formados por antígenos virales y anticuerpos que junto con el complemento tienden a depositarse en los pequeños vasos sanguíneos provocando vasculitis a nivel de la piel, los glomérulos renales, etc. Las diferentes manifestaciones extrahepáticas son las siguientes: crioglobulinemia, porfira cutánea tardía, glomerulonefritis membranosa-proliferativa, trombocitopenia, tiroiditis, sialoadenitis, liquen plano, linfomas, etc ⁴⁸.

Existen dos estrategias para el diagnóstico de la infección por VHC:

a. Detección de anticuerpos (Diagnóstico Serológico):

La infección por VHC genera una respuesta de anticuerpos de diferentes especificidades. No ha podido encontrarse una relación precisa entre los diferentes patrones de respuesta inmune y el estadio biológico o clínico de la infección ⁴⁹.

La detección de anticuerpos se hace en primera línea con el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Constituye la prueba ideal para el tamizaje en Bancos de Sangre así como para la población general. Es una prueba sencilla de realizar, reproducible y de bajo costo. Estas pruebas han evolucionado progresivamente en la medida en que se han incorporado o modificado los péptidos sintéticos y/o proteínas recombinantes que se utilizan para la detección de los anticuerpos. Esto se ve reflejado en un aumento de la sensibilidad y especificidad de dichas pruebas. Actualmente los estuches comerciales que se utilizan en el país son los de tercera generación y mas recientemente los de cuarta generación (incluyen en su formato antígenos de diferentes genotipos), que nos permiten la detección de anticuerpos de tipo IgG. Es importante hacer notar que la detección de anticuerpos del tipo IgM no ha demostrado aportar datos claros y concluyentes sobre la biología o estadio de la infección viral. La duración de la respuesta IgM es habitualmente breve pero es frecuente seguir detectándola en la fase crónica de la enfermedad ^{49,50}. Uno de los inconvenientes de estas pruebas para detección de anticuerpos es la existencia de falsos positivos sobre todo en la población de bajo riesgo. Este problema ha sido parcialmente solucionado con las pruebas confirmatorias, diseñadas para conocer individualmente que antígenos virales son los responsables de la reactividad obtenida mediante una prueba de ELISA. Al igual que las ELISA, estas pruebas confirmatorias han sido mejoradas tanto en sensibilidad como en especificidad. Las pruebas confirmatorias utilizadas con mejores resultados en la actualidad son: el inmunoblot recombinante (RIBA III) y el ensayo inmunoenzimático en línea INNOLIA ³³. Aun con las pruebas confirmatorias de tercera generación se siguen obteniendo algunos resultados indeterminados cuando intentamos confirmar la especificidad de la respuesta antigénica. Incluso puede darse el caso de que una muestra que con un kit de una casa comercial presente reactividad única para un péptido tenga con otro

kit reactividad para otro péptido diferente o puede incluso ser clasificada como positiva. Esto indica que la sensibilidad de las pruebas confirmatorias para diferentes anticuerpos es muy variable y por lo tanto el poder de clasificación de estas es limitado o confuso en sueros con índices de ELISA bajo. Por lo tanto, los resultados clasificados como indeterminados son al menos cuestionables, en cuyo caso son las técnicas de biología molecular que permiten la detección del ARN viral las que nos darán la palabra final. Recientemente se publicaron los resultados de un prototipo de ensayo que permite la detección serológica del antígeno core del VHC. Esta prueba permitirá la detección de donantes infectados con VHC que se encuentran en periodo de ventana ⁵¹.

b. Detección del ARN viral:

La identificación del ARN viral por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es por el momento el mejor marcador de viremia y posiblemente de enfermedad activa. La detección del ARN VHC puede hacerse en plasma y tejido hepático de pacientes seronegativos durante la primera fase de la infección, y para determinar si en un paciente con anticuerpos para VHC hay o no replicación del virus. En pacientes con una infección crónica, la viremia en plasma puede ser intermitente, por lo que se recomienda en aquellos casos en los cuales se observa una alteración, aunque sea mínima, de los niveles de transaminasas, y se sospecha infección por VHC, realizar la detección del ARN viral en una muestra de tejido hepático. La cuantificación de la carga viral permite el monitoreo de la terapia antiviral, y puede ser realizada por diferentes métodos disponibles en el mercado.

La determinación del genotipo puede ser realizada de dos maneras diferentes, una es el empleo de las diferentes técnicas que requieren de una PCR previa, como lo son la secuenciación, la digestión de productos amplificados con enzimas de restricción (RFLPs), la hibridación sobre membranas de nylon (LIPAS), PCR usando cebadores específicos para cada



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

genotipo, etc. Constituyen procedimientos complejos y laboriosos pero que garantizan resultados precisos. La otra forma de establecer el genotipo es estudiar los anticuerpos que se generan en una determinada persona como respuesta a antígenos virales que son exclusivos para cada genotipo. Estos métodos son menos costosos, pero también menos exactos ⁴⁹. El conocimiento del genotipo nos aporta datos sobre la posible respuesta al tratamiento, evolución clínica y datos epidemiológicos de este proceso infeccioso ⁴⁴.

HEPATITIS D

El virus de la hepatitis D (VHD) es un virus defectivo que requiere de la ayuda del VHB para replicarse. Las partículas virales tienen aproximadamente 36 nm de diámetro. El VHD requiere del VHB para la síntesis de proteínas de envoltura (HBsAg), las cuales son usadas para encapsular el genoma del VHD y el antígeno Delta (VHDAg). El genoma del VHD está constituido por una cadena sencilla de ARN de aproximadamente 1.68 Kb. En base al análisis genético de aislados procedentes de diferentes áreas del mundo, se han descrito 3 genotipos. El genotipo I es el más ampliamente distribuido en el mundo; han sido encontrado en Europa, Norteamérica, Norte de África, Medio Oriente, Pacífico Sur y en el Oriente de Asia. La patogénesis de la infección en estas áreas varía desde hepatitis fulminante hasta infección hepática subclínica. El genotipo II ha sido encontrado solo al oriente de Asia y el cuadro clínico que produce es más suave y con una menor tendencia a producir hepatitis fulminante. El genotipo III es el más divergente y ha sido encontrado solo al norte de América del Sur, donde se han descrito brotes de hepatitis severa con alta morbi-mortalidad ⁵².

El mecanismo de transmisión es similar al de la hepatitis B, siendo la exposición percutánea la más eficiente. La transmisión sexual es menos eficiente que en la hepatitis B. La transmisión perinatal es rara. La infección por VHD puede ser adquirida en forma de coinfección con hepatitis B o como superinfección en personas con infección crónica por

VHB. Las personas que cursan con una coinfección VHB-VHD presentan con más frecuencia una infección aguda severa y alto riesgo de hepatitis fulminante si se compara con pacientes que cursan solo con infección por VHB. Sin embargo, se observa una menor tendencia a la cronicidad en los pacientes con una coinfección VHB-VHD. Los portadores crónicos del VHB que adquieren una superinfección por VHD usualmente desarrollan una infección crónica por VHD con mayor tendencia a la aparición de cirrosis hepática. El curso serológico de la infección por el VHD varía dependiendo de la forma como se adquirió la infección, es decir, como coinfección o como superinfección. En las personas con coinfección VHB-VHD es posible detectar tanto anticuerpos del tipo IgM como IgG durante el curso de la infección en la mayoría de los casos. Sin embargo, cerca de un 15% de las personas presentan solo IgM durante la fase aguda de la enfermedad o IgG sólo durante la convalecencia. Los anticuerpos anti-VHD decaen, haciéndose indetectables, una vez que la infección es resuelta (1-2 años). El VHDAg puede ser detectado sólo en 25% de estos pacientes y desaparece simultáneamente con el HBsAg. En los pacientes que desarrollan una superinfección con VHD podemos encontrar los siguientes eventos serológicos: el título de HBsAg declina al mismo tiempo que el VHDAg aparece en sangre, el VHDAg y ARN VHD permanecen detectables en suero por la tendencia a producirse cronicidad en estos pacientes. Altos títulos de IgM e IgG son detectables indefinidamente ⁵³. El diagnóstico se realiza mediante la detección del VHDAg, así como de IgM e IgG o el ARN VHD por técnicas de biología molecular.

HEPATITIS E

El virus de la hepatitis E (VHE), tiene un genoma conformado por una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva y 7.6 Kb de longitud. Este virus carece de envoltura y tiene un diámetro de aproximadamente 27-34 nm ⁵⁴. No se ha logrado cultivar, por lo que los diferentes aislados de HEV han sido mantenidos in

vivo en primates no humanos, posteriormente el genoma viral ha sido clonado y secuenciado⁵⁵. El VHE de acuerdo a las recomendaciones del Comité Internacional de Taxonomía de Virus pertenece ahora a una familia separada denominada "HEV-like viruses". El análisis de las regiones de la ARN helicasa y la polimerasa dependiente de ARN del VHE y otros virus ARN de cadena sencilla con polaridad positiva, muestra que el VHE, forma un grupo filogenéticamente distinto, más próximo al virus de la rubéola (familia Togaviridae) que a los miembros de la familia Calciviridae. Sin embargo, una clasificación definitiva se realizará en la medida en que se conozcan sus estrategias de expresión y replicación así como la naturaleza, procesamiento y propiedades de sus proteínas⁵⁶. El análisis de la secuencia genética del VHE aislado en diferentes regiones geográficas ha permitido su clasificación en tres genotipos: genotipo I, que incluye los subtipos asiático y africano. Genotipo II, que abarca las cepas de cerdo y humanos de Norte América; Genotipo III limitado al prototipo mexicano. A pesar de la existencia de diferentes genotipos, un solo serotipo ha sido identificado alrededor del mundo⁵⁵. Se han encontrado pequeñas variaciones entre los aislados obtenidos a intervalo de 3-4 años de una misma región. Esta baja tasa de variación ha permitido sugerir que los VHEs de diferentes áreas geográficas representan una expansión independiente de aislados ancestrales de VHE que se han mantenido con una circulación restringida en diferentes áreas del mundo^{57,58}. Este virus ha sido implicado en grandes brotes de hepatitis en países en desarrollo, la infección ha sido asociada con aguas contaminadas, su transmisión es por la vía oral fecal⁵⁹.

La infección causa una hepatitis viral aguda. El período de incubación es de 15 a 50 días, con un promedio de 5 a 6 semanas. En los casos típicos ocurre una fase pre-ictérica que podría durar 10 días y consiste en náuseas, vómitos y dolor abdominal. La fase ictérica tiene una duración de aproximadamente 10 días y la recuperación total ocurre dentro del primer mes, no tiende a la cronicidad.

El curso clínico de la hepatitis E es similar al de la hepatitis A. En los brotes de infección por VHE el mayor porcentaje de enfermedad clínica evidente se reporta entre jóvenes y adultos de mediana edad, se piensa que el bajo porcentaje de enfermedad en niños podría ser el resultado de una infección sub-clínica o anictérica⁵⁸. La hepatitis E es más severa que la hepatitis A con un porcentaje de mortalidad de 1-2% comparada con 0.2% para la hepatitis A^{58, 60}. En mujeres embarazadas la mortalidad aumenta a 22%, principalmente cuando la infección ocurre en el tercer trimestre, produciéndose una hepatitis fulminante⁶¹.

Las partículas virales están presentes en la bilis y en las heces al final del período de incubación y persisten por 1 ó 2 semanas después de iniciarse los síntomas. El virus también está presente en sangre al final del período de incubación, alcanzando un pico máximo de replicación alrededor del 8-11 día del inicio de los síntomas para luego comenzar a disminuir progresivamente⁶². Los anticuerpos anti-VHE de tipo IgA, IgG e IgM aparecen durante el curso de la enfermedad. Los anticuerpos IgM son detectables en la fase aguda y desaparecen entre 3-6 meses, los anticuerpos IgG persisten entre 2 y 13 años⁵⁸. En un 10% de pacientes en quienes se ha detectado viremia o excreción de virus por heces no se detectó respuesta de anticuerpos^{62,63}. Una explicación para este hallazgo es que una respuesta de anticuerpos no es necesaria para que ocurra una hepatitis E o para resolverla y que algunas personas no producen una respuesta de anticuerpos a la infección por VHE. Otra explicación es que estos pacientes fueron infectados con una variante que genera anticuerpos no reconocidos con el ensayo utilizado⁶².

Inicialmente la electroinmunomicroscopía y el FAB (Fluorescent antibody blocking assay) fueron utilizados, pero estos métodos resultaron muy laboriosos para ser utilizados como rutina y además resultaron incapaces de distinguir entre una infección presente o pasada⁶². Posteriormente, diversos ensayos inmunoenzimáticos y Western-blot usando



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

proteína recombinantes han sido desarrollados para detectar IgM e IgG contra el HEV. Paralelamente técnicas de biología molecular como el RT-PCR se ha utilizado para detectar la excreción viral por heces así como la viremia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H.: "Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness". *Science* 1973; 182: 1026-8.
2. Gus I.D., Coulepis A.G., Feistone S.M., Locarnini S.A., Moritsugu Y., y cols.: "Taxonomic classification of hepatitis A virus". *Intervirology* 1983; 20: (1) 1-7.
3. Weitz M., Baroudy B.M., Maloy W.L., Ticehurst J.R., Purcell R.H.: "Detection of a genome-linked protein (VPg) of hepatitis A virus and its comparison with other picornaviral VPgs". *J. Virol* 1986; 60: 124-130.
4. Cohen J.I., Ticehursts J.R., Purcell R.H., Buckler-White A., Baroudy B.M.: "Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses". *J. Virol* 1987; 61: 50-59.
5. Coulepis A.G., Tannock G.A., Locarnini S.A., Gus I.D.: "Evidence that the genome of hepatitis A virus consists of a single stranded ARN". *J. Virol* 1981; 37: 473-477.
6. Ticehursts J.R., Cohen J.I., Feinstone S.M., Purcell R.H., Jansen R.W., Lemon S.M.: "In Molecular aspects of Picornaviral Infection and Detection. (eds Semler, BL and Ehrenfeld E) pp. 27-50. American Society for Microbiology, Washington, DC 1989.
7. Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., y cols.: "Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions". *J. Gen. Virol* 1992; 73:1365-1377.
8. Lemon S.M., Binn L.N.: "Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization" *Infet. Immun* 1983; 42: 418-420.
9. Stapleton J. T.: "Host Immune. Response to Hepatitis A Virus". *J. Infect Dis* 1995; 171: (Supl 1) S9-14.
10. Mc Donald G.S.A.: et al "Prolonged IgM antibodies and histopathological evidence of chronicity in hepatitis A". *Liver* 1989; 9: 223-228.
11. Ganem D., Varmus H.E.: "The molecular biology of hepatitis viruses". *Ann. Rev. Biochem* 1987; 56: 651-693.
12. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M.: "Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis". *Lancet* 1970; 2: 695-8.
13. Almeida J.D., Rubenstein D., Stott E.J.: "New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis". *Lancet* 1971; 2: 1225-7.
14. Robinson W.S., Clayton D.A., Greeman R.L.: "DNA of a human hepatitis B virus candidate" *J virol* 1975; 14: 384-91.
15. Gerlich W., Robinson W.S.: "Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its compete DNA strand". *Cell* 1980; 21: 801.
16. Kaplan P. M. Greenman R.L., Gerin J.L., Purcell R.H., Robinson W.S.: "DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen". *J. Virol* 1973; 12: 995-1005.
17. Robinson W.S., Greeman R.L.: "DNA polymerase in the core of human hepatitis B virus candidate". *J. Virol* 1974; 13: 1231-6.
18. Takahashi K., Akahane Y., Gotanda T., Mishirot., Imai M., Miyakawa Y. y cols.: "Demonstration of hepatitis e antigen in the core of Dane particles". *J. Immunol* 1979; 122: 275-279.
19. Información suplementaria tomada de <http://www.seimc.es/control/revi-Sero/Rvirhbs.htm>
20. Ganem D., Varmus H.E.: "The molecular biology of hepatitis viruses". *Ann. Rev. Biochem* 1987; 56: 651-693.
21. Will H., Kuhn C., Cattaneo R., et al: "Structure and funtion of the hepatitis B virus genome. In "Primary and Tertiary Structure of Nucleic Acids and Cancer Research", (ed Miwa M.) Japan Science Society Press, Tokyo. Pp. 237-247.
22. Raney A.K., Mc Lachlan A.: "The biology of hepatitis B virus". In. Mc Lacahlan, A., ed. *Molecular biology of hepatitis B viruses*. Boca Raton. CRC Press: 1992; 1-38.
23. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H. Sastrose Wignjo R. Imai M., Miyakawa M.: "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes". *J. Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583.
24. Magnius L.O., Norder H.: "Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S gene". *Intervirology* 1995; 38: 24-34.
25. Norder H., Courouc   A-M., Magnius L.O.: "Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes". *J. Gen. Virol* 1992; 73: 3141-3145.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Marcadores Serológicos
en las Hepatitis
Virales

26. Le Bouvier G.L.: "The heterogenicity of Australia antigen". *J. Infect Dis* 1971; 123: 671-5.
27. Couroucé-Panty A.M., Lemaire J.M., Roux J.F.: "New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category". *Vox sang* 1978; 35: 304-308.
28. Ohnuma H., Machida A., Okamoto H., Tsuda F., Sakamoto M., Tanaka T., y cols.: "Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y o w/r". *J. Virol* 1993; 67: 927-932.
29. Shiira S., Fujino H., Uta Y., Tagawa K., Unuma T., Yoneyama M., y cols.: "Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease". Part I: Analysis of 1.744 HBsAg carriers". *Am. J Gastroenterol* 1991; 186: 866-871.
30. Yasmin M.: "Molecular biology of fulminant hepatitis B viruses". PhD Thesis, University of Glasgow, Glasgow, UK.
31. Robinson W.S.: "Virus de hepatitis B y virus de hepatitis Delta". En *Enfermedades infecciosas*. Eds. Mandell et al. 3era Edición. 1990; 125: 1269-1297.
32. Bayer M.E., Blumerg B.S., Werner B.: "Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia. Down's syndrome and Hepatitis". *Nature (Lond.)* 1968; 218: 1057-59.
33. Dow B.C.: "Microbiology confirmatory test for blood donors". *Blood Reviews* 1999; 13: 91-104.
34. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., y cols.: "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *Lancet* 1990; 336: 325-9.
35. Girones R., Miller R.H.: "Mutation rate of hepadnaviruses". *Virology* 1990; 64: 613-620.
36. Carman W.F., Yacyna M.R., Hadziyannis S., Karayannis P., McGarvo M.J., Makris A. y cols.: "Mutation preventing formation of e antigen in patients with chronic HBV infection". *Lancet* 1989; 2: 588-591.
37. Carman WF: "Molecular variants of hepatitis B virus". *Clin. Lab. Med. (Hepatitis and chronic Liver Disease)* 1996; 16: 407-428.
38. Omata M., Ehata T., Yokosuka O., Hosoda K., Ohto M.: "Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis". *N Engl. J. Med* 1991; 324: 1699-1704.
39. Echevarria J.M., Leon P., Domingo CJ, Lopez J.A., Ecvhaarria J.E., Contreras G. y cols.: "Characterization of HBV2 -Like Infection in Spain". *J. Med. Virol* 1991; 33: 240-247.
40. Choo Q., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.: "Isolation of a cDNA clone derived from a blood -borne non-A, non-B viral genome". *Science* 1989; 244: 359-361.
41. Rice C.M. in *Fields Virology*. (Fields B.N., Knippe D.N., Howley P.M., eds), Lippincot-Raven 1996; 931-960.
42. Van Der Poel C.L., Cuypers H.T., Reesink H.W.: "Hepatitis C virus six years on". *Lancet* 1994; 344: 1475-1479.
43. Simmonds P.: "Variability of hepatitis C virus". *Hepatology*, 21: 570-583.
44. Dusheiko G., Schmilovitz-Weiss H., Brown D., McOmish F., Yap P.L., Sherlock S., y cols.: "Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease". *Hepatology* 1994; 19: 13-18.
45. Forns X., Purcell R.H., Bukh J.: "Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus". *Trends in Microbiology* 1999; 7: 402-410.
46. Jenny-Avital E.R.: "Hepatitis C". *Curr Opin Infect Dis* 1998; 11: 293-299.
47. Cohen J.: "Scientific challenge of hepatitis C". *Science* 1999; 285: 26-30.
48. Información suplementaria tomada de: <http://caibco.ucv.ve>.
49. Información suplementaria tomada de: <http://www.innogenetics.com>
50. Quintin I., Hassan W.F., El Salman D., Shalaby H., El Zimatty D., Monier M.K. y cols.: "Hepatitis C virus-specific B cell activation: IgG and IgM detection in acute and chronic hepatitis C". *J Hepatol* 1995; 23(6): 640-647.
51. Peterson J., Green G., Lida K., Caldwell B., Kerrison P., Bernich S., y cols.: "Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative "window" phase of hepatitis C infection". *Vox Sang* 2000; 78(2): 80-85.
52. Esteban J.I., Martell M., Curman W.F., Gomez J.: "The Impact of Rapid Evolution of the Hepatitis Viruses". In *Origen and evolution of viruses*. E. Domingo (Edit) by Academic Press 1999; Cap. 13: 345-376.
53. Fields H.A., Hadler S.C.: "Delta Hepatitis". A review. *J. Clin Immunoassay* 1986; 128-142.
54. Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K.C., Young L.M., Fry K.E. y cols.: "Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis". *Science* 1990; 247: 1335-1339.

55. Información suplementaria tomada de: <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/9900127-1h.htm>.
56. The International Committee on Taxonomy of Viruses 8th. Report (in press). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>.
57. Yin S., Purcell R.H., Emerson S.U.: "A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions". *Virus Genes* 1994; 9: 23-32.
58. Panda S.K., Jameel S.: "Hepatitis E virus: from epidemiology to molecular biology". *Viral Hepat* 1997; 3: 227-251.
59. Skidmore S.J.: "Factors in spread of hepatitis E". *Lancet* 1999; 354: 1049-1050.
60. Chauhan A., Jameel S., Dilawari J.B., Chawla Y.K., Kaur U., Ganguly N.K.: Hepatitis E transmission to a volunteer. *Lancet* 1993; 341: 149-150.
61. Houssaini S.H., Skidmore S.J., Richardson P., Sherratt L.M., Cooper B.T., O'Grady J.G.: Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J. Virol. Hepat* 1997; 4: (1), 51-54.
62. Clyson E.T., Myint K.S., Snitbham R., Voughn D.W., Innis B.L., Chan L., y cols.: Viremia, fecal shedding, and IgM and IgG response in patients with hepatitis E. *J. Inf. Dis* 1995; 172: 927-933.
63. Panda S.K. et al: Protracted viremia during acute sporadic Hepatitis E virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108: 225-230.