

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

**TRANSMISIÓN HORIZONTAL
SEXUAL Y NO SEXUAL DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS C**

TESIS DOCTORAL

Margarita Pérez Romero

R. 1 S. 347

T 1109

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

**TRANSMISIÓN HORIZONTAL
SEXUAL Y NO SEXUAL DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS C**

119421990

Trabajo presentado por Dña. Margarita Pérez Romero
para optar al grado de Doctor

Sevilla, junio de 1993



Servicio Andaluz de Salud

GERENCIA PROVINCIAL

HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"

Avenida Manuel Siurot, s/n.

41013 - SEVILLA

JUNTA DE ANDALUCIA

Consejería de Salud

**EDUARDO LISSEN OTERO, Profesor Asociado del Departamento de Medicina,
Y MANUEL LEAL NOVAL, Profesor Asociado del Departamento de MEDICI-
NA.**

COMUNICAN:

Que la Licenciada D^a **MARGARITA PEREZ ROMERO**, ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título: "**TRANSMISION HORIZONTAL, SEXUAL Y NO SEXUAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C**", bajo nuestra Dirección, reuniendo las condiciones para ser leída y defendida como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste y a los efectos oportunos, expedimos la presente Comuni-
cación en Sevilla a 9 de Junio de 1.993.

Fdo.: Dr. M. Leal Noval

CODIRECTOR

Fdo.: Dr. E. Lissen Otero

DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo.: M. Pérez Romero

DOCTORANDO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Lissen Otero, inspirador de nuestro grupo de trabajo, por la dirección de esta tesis doctoral, su sabia orientación y continuas enseñanzas.

Al Dr. Manuel Leal Noval, codirector de este trabajo por sus sugerencias, y colaboración.

Al Dr. Armando Sánchez Quijano, por su solícita disposición e inestimable ayuda.

A todos y cada uno de los miembros del grupo de trabajo, sin los cuales no habría sido posible la realización de esta tesis, por su cooperación, continuo apoyo y su amistad.

A los compañeros participantes de este estudio de las ciudades de Oviedo y San Sebastián por su ofrecimiento y colaboración.

Al Prof. Don Joaquín Muñoz y Don Joaquín García de las Heras, miembros de la Facultad de Matemáticas de la Universidad de Sevilla, por su asesoramiento en la realización del estudio estadístico.

A Dña María Antonia Abad Carrillo, por su incondicional ayuda y saber siempre hacer pequeñas las dificultades.

Mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de modo directo o indirecto han colaborado con su esfuerzo desinteresado en hacer posible esta Tesis Doctoral.

**A José Antonio
y a toda mi gran familia**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Hepatitis NANB	10
1.1.1. Consideraciones históricas y epidemiológicas	10
1.1.2. Estrategias para la clonación molecular del agente etiológico mayoritario de la hepatitis NANB postransfusional	17
1.1.2.1. Desarrollo de un modelo experimental	19
1.1.2.2. Número de agentes etiológicos	20
1.1.2.3. Propiedades fisico-químicas de los agentes etiológicos	22
1.2. El virus C de la hepatitis (VCH)	24
1.2.1. Clonación del VCH y desarrollo de un ensayo serológico	24
1.2.2. Caracterización molecular y clasificación taxonómica del VHC	26
1.2.3. Métodos diagnósticos para la detección del VCH	28
1.2.3.1. Detección de anticuerpos anti-c100-3	29
1.2.3.2. Detección de otros anticuerpos frente al VCH	35
1.2.3.3. ARN del VCH y técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR)	37
1.2.4. Implicaciones clínicas de la detección del VHC	41
1.2.5. Hepatitis C de transmisión parenteral	44
1.2.6. Hepatitis C esporádica	49
2. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	54
3. OBJETIVOS	59
4. MATERIAL Y MÉTODO	61
4.1. Estudio de la transmisión intrafamiliar no sexual del VHC	62
4.1.1. Diseño	62
4.1.2. Probandos	62
4.1.2.1. Casos índices	62
4.1.2.2. Conviventes no relacionados sexualmente	63
4.1.2.3. Grupo control	64
4.1.3. Métodos de evaluación	64
4.1.4. Métodos de laboratorio	64
4.1.4.1. Anticuerpos frente al VHC	64
4.1.5. Análisis estadístico	66

4.2. Estudio de la transmisión sexual del VHC	66
4.2.1. Diseño	66
4.2.2. Probandos	66
4.2.2.1. Sujetos sexualmente promiscuos	66
4.2.2.1.1. Prostitutas	67
4.2.2.1.2. Clientes de prostitutas	67
4.2.2.1.3. Varones homosexuales	68
4.2.2.2. Grupo control	68
4.2.2.3. Sujetos no sexualmente promiscuos	69
4.2.2.3.1. Parejas heterosexuales estables	69
4.2.2.4. Grupo control	71
4.2.3. Métodos de evaluación	72
4.2.4. Métodos de laboratorio	72
4.2.4.1. Anticuerpos frente al VHC	72
4.2.4.2. Anticuerpos frente al VIH	74
4.2.5. Análisis estadístico	76
5. RESULTADOS	77
5.1. Transmisión intrafamiliar no sexual del VHC	78
5.2. Transmisión sexual del VHC	83
5.2.1. Prevalencia de anti-VHC en los grupos sexualmente promiscuos y grupo control	83
5.2.2. Prevalencia de anti-VHC en las parejas heterosexuales estables de casos índices reactivos para anti-VHC y grupo control	88
5.3. Prevalencia de anti-VHC en parejas heterosexuales estables de casos índices coinfectados o no por VIH	89
5.4. Concordancia de la reactividad para anti-VHC por EIA-2 y 4-RIBA en colectivos sexualmente promiscuos y donantes de sangre	92
6. DISCUSIÓN	93
7. CONCLUSIONES	106
8. RESUMEN	108
9. BIBLIOGRAFÍA	115

INTRODUCCIÓN

1

1.1. Hepatitis NANB

1.1.1. Consideraciones históricas y epidemiológicas

En la década comprendida entre 1965 y 1975, se consiguieron importantes logros en la reducción de la patología hepática transfusional. El descubrimiento por Blumberg del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg)¹, hizo factible la realización de un primer screening pretransfusional efectivo, lográndose un avance enormemente importante en el conocimiento etiológico y en la prevención de las hepatitis postransfusionales. Trabajos realizados en Estados Unidos (EEUU) durante esta época, demostraron que la exclusión conjunta de los donantes retribuidos y/o HBsAg positivos, se traducía en una disminución de hasta un 80% en la incidencia de hepatitis postransfusional², por lo se generalizó la aplicación de estas medidas en los servicios de hemoterapia. Pero pese a lo esperado en un principio, la proporción de hepatitis postransfusional continuó siendo relativamente elevada y en muchas series incluso muy parecida a la registrada anteriormente, lo que llevó a especular sobre la posible implicación de otros virus de conocido hepatotropismo, fundamentalmente el virus A (VHA), citomegalovirus y el virus de Epstein-Barr.

La posterior puesta en marcha de técnicas de identificación del VHA, junto a las evidencias de que este nunca se transmitía por vía parenteral, así como el desarrollo de unas más específicas y sensibles reacciones serológicas para la demostración de infección por citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, permitieron a Feinstone y cols³ en 1975, sentar las bases de una nueva entidad clínica a la que en principio, se denominó de forma forzosamente

provisional y excluyente "hepatitis no-A, no-B" (NANB), termino que englobaría a toda esta patología hepática transfusional residual.

Pronto se llegó al convencimiento de que este tipo de hepatitis obedecería a un agente transmisible y en efecto, ello pudo ser demostrado cuando Alter y cols.⁴ y Tabor y cols.⁵ consiguieron transmitir la enfermedad a chimpancés mediante la inoculación de plasma de pacientes con hepatitis aguda o crónica NANB. Se demostró con claridad que existía un estado de portador asintomático crónico capaz de transmitir la enfermedad, cuya prevalencia, deducida a partir del número de casos producidos era del 6% en donantes retribuidos y de alrededor del 2% en donantes voluntarios.

Progresivamente fueron acumulándose suficientes evidencias epidemiológicas como para presumir la existencia de al menos dos agentes NANB. El primero de ellos reconocería una transmisión parenteral dominante y sería responsable de la mayor parte de los casos de hepatitis postransfusional, así como de un porcentaje variable de hepatitis esporádicas, y el segundo utilizaría fundamentalmente la vía de transmisión oral-fecal y sería responsable de brotes epidémicos, similares a los registrados para la hepatitis A, en ciertas áreas del mundo como China, India, Etiopía y México.⁶⁻⁸ Este virus de transmisión entérica que en 1983 fue identificado como una partícula de 27 a 32 nm en heces de pacientes inoculados voluntariamente y denominado "virus de la hepatitis E"⁹, se caracteriza por presentar negatividad para los marcadores serológicos y dar lugar a una proporción notable de casos de hepatitis fulminantes sobre todo en mujeres gestantes.

En cuanto al/los virus NANB de transmisión parenteral, en EEUU ha sido cifrado como responsable de entre un 20% a un 40% de los casos de hepatitis viral aguda¹⁰, siendo la transmisión transfusional la forma de difusión mejor conocida. Estudios en series de hepatitis postransfusional utilizando sangre procedente de donantes voluntarios y técnicas de screening de alta sensibilidad para HBsAg, demostraron que mas de las dos terceras partes de casos, en algunas series mas del 90% correspondían a hepatitis NANB^{3,11-14}, por lo que en ausencia de marcadores serológicos específicos, se analizaron una serie de factores que permitieran identificar a los donantes con riesgo para la transmisión de la hepatitis NANB.

A principios y mediados de los 80, diversos trabajos entre ellos los realizados por el TTVS (The Transfusión Transmitted Virus Study) y el NIH (National Institute of Health EEUU)¹⁵⁻¹⁸, demostraron que los donantes con elevación de transaminasas o anti-Hbc positivos transmitían hepatitis con una frecuencia tres o cuatro veces superior a la de sus homólogos sin estos marcadores, sugiriendo, en definitiva, que la exclusión de aquellos podía evitar un 30-40% de casos de hepatitis postransfusional. No obstante, la relativa inespecificidad de estos marcadores indirectos no hacia muy atractiva la idea de adoptarlos en el cribaje rutinario de donantes para prevenir una infección que muchos consideraban como benigna (75% de casos asintomáticos) y probablemente sin trascendencia a largo plazo para el paciente.

El costo beneficio de la adopción de estos marcadores fue aumentando en pocos años, cuando numerosos estudios demostraron la extraordinaria tendencia de esta infección a cronificarse y

la severidad de sus complicaciones a largo plazo. En efecto la mayor diferencia de la hepatitis NANB con respecto a las hepatitis por virus A y B es su elevada tendencia a la cronicidad. Aproximadamente el 60% de pacientes infectados presentan elevación persistente o fluctuante de las transaminasas al cabo de un año de la exposición¹⁹, fenómeno inexistente en la hepatitis A e inferior al 5% en la hepatitis B. Inicialmente se pensaba, dado que los pacientes estaban asintomáticos y las alteraciones bioquímicas eran escasas, que la lesión hepática en estos casos sería leve. Sin embargo, los estudios histológicos y el seguimiento durante el mayor espacio de tiempo de los enfermos han demostrado lo contrario. Entre el 60% y 70% de los pacientes con hepatitis crónica NANB presentan histológicamente lesiones graves de tipo hepatitis crónica activa y cirrosis^{19,20}.

Fue precisamente el reconocimiento de la gravedad a largo plazo de esta infección e indudablemente la sensibilización del público americano frente a la transmisión transfusional de enfermedades víricas durante la epidemia de SIDA, la que obligó a adoptar estos marcadores indirectos, en EEUU, en Junio de 1987. La conveniencia de aplicar la misma estrategia en Europa, sin embargo, resultaba controvertida ya que su aparente asociación con el estado de portador NANB podía variar de unas zonas geográficas a otras, (en función de la prevalencia de otras causas de hipertransaminasemia y de la epidemiología local de la infección por virus de la hepatitis B). En España país deficitario en unidades de sangre, la aplicación conjunta de ambos marcadores inespecíficos podría suponer la exclusión de cerca de un 30% de las donaciones dada la alta prevalencia de anti-HBc e hipertransaminasemia asintomática en nuestro medio²¹.

Pese a la implantación de los marcadores inespecíficos en los Bancos de Sangre en EEUU, un 3-4% de los enfermos transfundidos continuaban desarrollando una hepatitis postransfusional²². En Europa Occidental, que carecía de una política común en el cribaje de donantes, la prevalencia de hepatitis postransfusional se estimaba en torno a un 10% como media²².

Aunque tradicionalmente la hepatitis NANB de transmisión parenteral ha sido considerada como una enfermedad asociada a transfusión^{13,23}, los datos epidemiológicos globales, al menos en países desarrollados, revelaban que sólo una pequeña proporción de los sujetos con esta enfermedad poseían antecedentes transfusionales y que la hepatitis NANB tenía lugar con mayor frecuencia fuera de transfusión^{20,24}. Datos aportados por los Centers for Disease Control's (CDC)²⁴, mostraban que en 1987, sólo el 5% de los pacientes referían antecedentes de transfusión sanguínea, mientras que el 42% tenía una historia de adicción a drogas intravenosas, y existía un antecedente de exposición profesional con frecuente contacto sanguíneo o de hemodiálisis para menos del 5% de los casos estudiados. De este modo para aproximadamente el 40% de los casos de hepatitis NANB, no podía registrarse una vía de exposición parenteral manifiesta tras una cuidadosa investigación^{20,24-26}. Surgía de este modo, el término de hepatitis NANB esporádica definida como aquella que tenía lugar como episodio aislado y en ausencia de factor de riesgo conocido.

En base a esto, se consideraron diversas posibilidades de contagio, entre ellas, la transmisión vertical, maternofilial, a partir de la observación de algunos casos de elevación de transaminasas

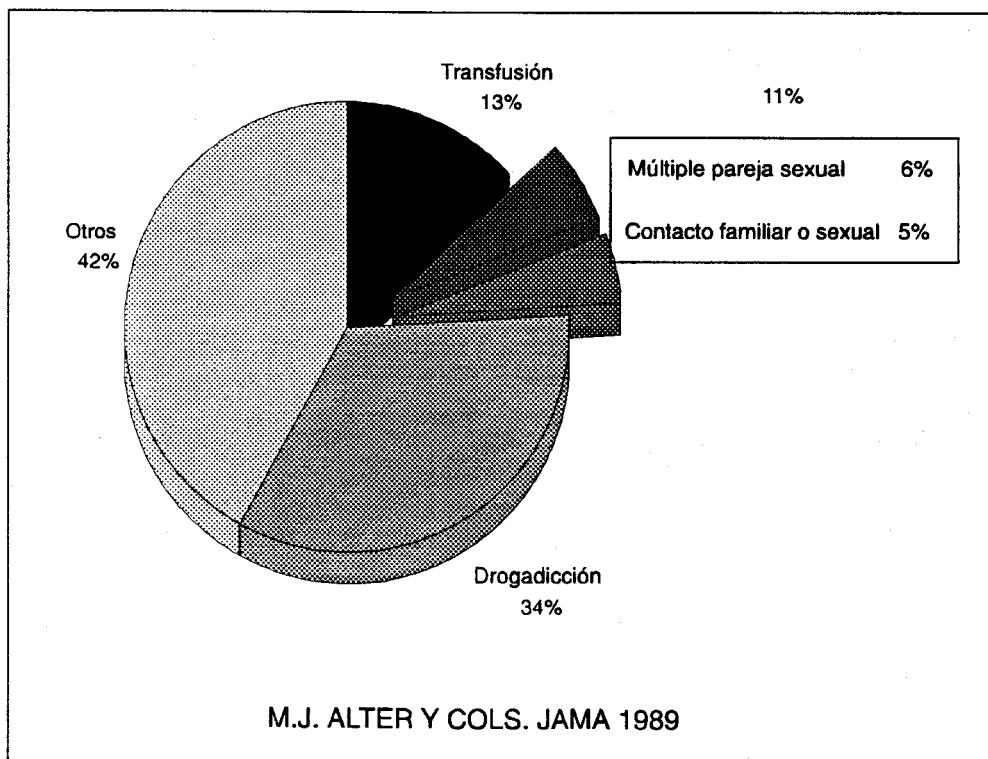
en lactantes, hijos de madres que habían sufrido una hepatitis aguda seronegativa durante el tercer trimestre de embarazo²⁷. No obstante, numerosos esfuerzos se dirigieron al estudio del papel que la transmisión horizontal, sexual o no sexual, podía jugar, como vía alternativa de difusión de la hepatitis NANB.

La transmisión desde pacientes infectados a sus contactos y el agrupamiento de casos en sujetos conviventes fue reportada a principios de la década de los ochenta^{20,28}, sugiriéndose la posibilidad de transmisión parenteral inaparente o sexual. Estudios realizados en colectivos homosexuales arrojaban porcentajes de infección NANB superiores a los registrados en los grupos control empleados, aunque mas bajas en comparación con otros virus de conocida difusión por vía sexual^{20,29}.

No obstante las mayores evidencias epidemiológicas a favor de la transmisión horizontal de la hepatitis NANB derivan del estudio de casos y controles realizado por MJ. Alter y cols. en los CDC²⁶, destinado a identificar vías no reconocidas para la hepatitis aguda NANB. En un análisis multivariante de los datos epidemiológicos aportados por 52 pacientes que presentaban hepatitis aguda NANB y por 104 sujetos controles, la única diferencia significativa entre ambos grupos fue haber tenido mas de dos parejas sexuales en los seis meses precedentes y el contacto con un miembro de la familia o pareja sexual con historia de hepatitis. En este estudio no se halló asociación con procedimientos médicos tradicionales como inyecciones o con otros tipos de exposición percutánea no habitual como tatuajes, acupuntura, y otros factores de riesgo potenciales. Cuando el contacto sexual o familiar y la actividad sexual con múltiples parejas fueron aplicados conjun-

tamente a la población original de pacientes con hepatitis NANB un porcentaje adicional del 11% poseía este factor de riesgo, lo que sugería que la transmisión parenteral inaparente y/o sexual podría jugar un importante papel en la difusión de la hepatitis NANB (Fig. 1).

Figura 1. Factores de riesgo asociados a la hepatitis NANB (estudio casos-contrroles)



A pesar de todos estos hallazgos, definir el rol del contacto persona-persona en la transmisión de la hepatitis NANB se veía dificultado por la ausencia de ensayos serológicos específicos para el agente o agentes etiológicos de esta enfermedad. Durante más de 10 años, todos los intentos realizados por numerosos laboratorios para identificar el/los virus de la hepatitis NANB o desarrollar un test antígeno-anticuerpo específico resultaron inútiles. No obstante, muy pronto se modificaría el panorama de la gran incógnita planteada por el diagnóstico por exclusión de la hepatitis NANB.

1.1.2. Estrategias para la clonación molecular del agente etiológico mayoritario de la hepatitis NANB postransfusional

Aunque la naturaleza vírica del agente responsable mayoritario de la hepatitis NANB postransfusional era fuertemente sospechada en base a los datos epidemiológicos, clínicos e histológicos de la enfermedad, los estudios de laboratorio resultaron en gran parte infructuosos hasta que se desarrolló un adecuado modelo experimental de enfermedad humana en chimpancés entre finales de la década de los 70 y principios y mediados de los 80.

Estudios realizados en los CDC a partir de concentrados del factor VIII implicados en la transmisión de hepatitis NANB a dos individuos en 1977 proporcionó material potencialmente infeccioso para su manipulación y aunque sus esfuerzos inicialmente se centraron en la visualización de las partículas virus-like por microscopía inmunoelectrónica (MIE), parecía evidente que una aproximación más extensa era necesaria para el aislamiento y la

caracterización del agente etiológico. Como resultado identificaron una serie de objetivos con la esperanza de que los hallazgos en una o más áreas claves ayudarían a conseguir un final con éxito³⁰ (Tabla I).

Tabla I. Objetivos de investigación de la hepatitis NANB postransfusional

- a) Desarrollo de un modelo fidedigno de enfermedad humana en primates, definiendo la historia natural de la enfermedad.
 - b) Determinación del número de agentes etiológicos y caracterización físico-química de cada agente (virus).
 - c) Creación de grandes pool de plasma altamente infeccioso adecuados para la clonación molecular del genoma viral.
 - d) Clonación del genoma del agente mayoritariamente implicado en la hepatitis NANB postransfusional y desarrollo de ensayos serológicos para marcadores de infección aguda y/o crónica (anticuerpos virus específicos).
 - e) Definir la patogénesis de la enfermedad a nivel molecular así como mecanismos de persistencia del virus y lugares extrahepáticos de replicación viral.
 - f) Posible desarrollo de vacunas recombinantes o derivadas de cultivos tisulares.
-

1.1.2.1. Desarrollo de un modelo experimental

la inoculación intravenosa a cuatro chimpancés en febrero de 1978 con lotes de concentrados de factor VIII implicados en la transmisión de hepatitis NANB, dieron como resultado la elevación de actividad ALT e histología hepática concordante con infección viral³¹. Estos hallazgos y los de otros investigadores^{4,5,32}, sugirieron que el chimpancé era un modelo aceptable para el estudio de la hepatitis NANB postranfusal. A partir de entonces se llevaron a cabo estudios de transmisión seriada de hepatitis NANB postranfusal a través de la inoculación de homogeneizados de hígado o plasma de fase aguda. Algunos animales mostraron un particular modelo bifásico de elevación de ALT mientras que otros presentaron un solo pico bien definido de actividad enzimática. En casi todos los casos (95%) el pico de actividad ocurrió entre los 50-70 días después de la inoculación, sugiriendo que el curso de la enfermedad una vez establecida era prácticamente independiente de la dosis de virus inoculada. En este sentido estudios posteriores también demostraron que la primera elevación de actividad ALT en un animal infectado se correlacionaba pobremente con el inóculo y que tan sólo una dosis infectante de chimpancé (CID) podía indicar una enfermedad tan severa como la causada por 100 millones CID³⁰.

El seguimiento durante más de 12 meses de chimpancés infectados permitió una aproximación a la historia natural de la enfermedad. Se observó que frecuentemente los animales resultaban infectados crónicamente por el virus de la hepatitis postranfusal NANB³³. Varios modelos de actividad enzimática fueron observados incluyendo la elevación persistente o intermitente de los

enzimas hepáticas, así como la resolución aparente de la enfermedad seguida por pequeños incrementos de ALT en períodos de 1-3 años. Posteriormente, la naturaleza insidiosa de la hepatitis NANB postransfusional fue confirmada en estudios de largo seguimiento en chimpancés infectados³⁴. Adicionalmente, se observó que los períodos de recrudescimiento y aumento de actividad hepática se acompañaban paralelamente de evidencias histológicas y por microscopía electrónica (ME) de un incremento de la degeneración hepatocelular o de la citopatología y que la severidad de los cambios ultraestructurales e histológicos que acontecían en chimpancés crónicamente infectados se relacionaba con el tiempo transcurrido desde la infección inicial³⁰.

1.1.2.2. Número de agentes etiológicos

Diferentes métodos fueron empleados para intentar definir el número de agentes etiológicos responsables de la mayoría de las hepatitis NANB postransfusionales. Se realizaron extensas series de estudios cruzados en chimpancés usando factor VIII³¹, factor IX³⁵, plasma H³⁶, y otros inóculos humanos. La inoculación secuencial de chimpancés con diferentes pares de material infeccioso dio a veces como resultado ataques separados de enfermedad. No obstante se pensó que la mayoría de estos "segundos ataques" no eran sino recrudescimientos de la enfermedad. La biopsia hepática de animales infectados por distintas fuentes de virus mostraron similares cambios de ME, sugiriendo que el mismo o un virus relacionado era el responsable de la mayoría de los casos de hepatitis NANB postransfusional. La observación en los estudios cruzados de interferencia virales heterólogas llevó a la necesidad de emplear métodos alternativos, utilizando inóculos

con propiedades físico-químicas definidas o inóculos que indujeran hepatitis NANB asociadas a cambios de ME claramente diferenciales en los hepatocitos infectados.

Diversos investigadores identificaron diferencias de sensibilidad al cloroformo (un disolvente lipídico) en los inóculos de hepatitis NANB y se apoyaron en estas diferentes propiedades para indicar la existencia de dos posibles agentes NANB. La infectividad en chimpancés con un material potencialmente infeccioso podía ser inactivada por exposición al cloroformo, lo que sugería la existencia de un agente con envuelta lipídica. Tal fue la propiedad de uno de los inóculos derivados de concentrados de FVIII caracterizado por Bradley y cols.³⁷ en los CDC y de un inóculo asociado a transfusión caracterizado por Feinstone y cols.³⁸ en el NIH. Estos agentes inducían cambios tubulares citoplásmicos constantes en los hepatocitos de chimpancés infectados experimentalmente siendo denominados por Bradley y cols.³⁹ TFA (Tubule-Forming Agent). En contraste un segundo inóculo derivado del factor VIII³⁵ y otro inóculo obtenido por Yoshizawa y cols.⁴⁰ no inducían cambios ultraestructurales característicos en los hepatocitos de chimpancés. Estos hechos apoyaban la hipótesis de la existencia de dos agentes probables de hepatitis NANB de transmisión parenteral.

Seis tipos diferentes de alteraciones ultraestructurales se observaron en chimpancés infectados por el agente cloroformo-sensible TFA^{36,41}. Todos estos cambios estaban confinados en el citoplasma de las células hepáticas afectadas y guardaban gran similitud con las alteraciones estructurales halladas en otro género de células infectadas por distintos tipos de virus con la propiedad común de poseer un genoma de RNA. Es interesante hacer notar

que estos cambios pueden observarse en hepatocitos de chimpancés infectados por el virus Delta, un virus defectivo de RNA que requiere del VHB para su replicación, y que son muy similares a los cambios ultraestructurales que acontecen en células infectadas por virus pertenecientes a las familias de los Picornavirus y Flavivirus así como en el citoplasma de células infectadas por una gran variedad de virus, entre los que se encuentran los reovirus, influenzavirus, coronavirus y poliovirus, todos ellos virus de RNA³⁰.

1.1.2.3. Propiedades físico-químicas de los agentes etiológicos

A pesar de los numeros intentos para visualizar al agente mayoritario de la hepatitis NANB postransfusional parecía evidente que el título de virus en suero y preparados hepáticos, era muy bajo para permitir la detección por ME. En efecto, la mayoría de los investigadores encontraban que los especímenes infecciosos tenían igual o menos de 1000 CID/ml⁴², lo que impedía visualizar el agente viral por algunas de las técnicas habituales. Partiendo de que la detección por ME requiere una concentración de partículas en rango de 10^7 - 10^9 /ml, se emplearon otros métodos para visualizar el virus por microscopía inmunoeléctronica (MIE), una técnica más sensible que emplea anticuerpos contra agregados virales específicos. Sin embargo aunque la MIE puede detectar virus a concentraciones menores de 10^5 ó 10^7 /ml, no se logró observar ninguna partícula viral en muestras de plasma o hígado de pacientes infectados o chimpancés infectados experimentalmente.

La ausencia de información en 1981-82 sobre la morfología del agente mayoritario de hepatitis NANB postransfusional llevó a intentar métodos alternativos para la caracterización del virus. La distinta sensibilidad al cloroformo permitió definir la posible existencia de dos agentes virales. Uno de ellos, el TFA que se caracterizaba por tener una envoltura lipoproteica, daba la apariencia de ser el responsable mayoritario de la hepatitis NANB postransfusional, lo que se deducía a partir de la frecuente presentación en chimpancés de cambios ultraestructurales característicos relacionados con este agente. Por tanto los esfuerzos se centraron en intentar definir las propiedades físicas de los cloroformo sensibles TFA. Considerando que sólo ciertas familias de virus, tanto de DNA como de RNA, tienen lípidos esenciales en su estructura, se iniciaron estudios de tamaño-partículas con la idea de eliminar aquellas familias que conteniendo lípidos excedían del tamaño probable. Bradley y cols.³⁹ empleó 6 ml de plasma de chimpancé de fase crónica, con aproximadamente 10^5 CID que fue pasando de forma secuencial a través de filtros de distintos tamaños (450, 200 y 80 nm). El filtrado final fue empleado para inocular un chimpancé y demostrar de este modo que el TFA era menor de 80 nm de diámetro.

Todos estos hallazgos combinados, indicaban que el TFA era un virus relativamente pequeño con cubierta y contenido lipídico. Por procesos de eliminación y clasificación taxonómica se pensó que sólo podría ser un miembro de tres familias, las denominadas Togaviridae, Flaviviridae y Hepadnavirus o Delta virus. Otra alternativa pero menos probable consistía en la posibilidad de que se tratara de un miembro de una nueva y no descubierta familia de virus. Estudios posteriores basados en métodos de hibridación de

ácidos nucleicos mostraron que el TFA no era ni un hepadnavirus ni un delta virus-like⁴³⁻⁴⁵.

1.2. El virus C de la hepatitis (VHC)

1.2.1. Clonación del VHC y desarrollo de un ensayo serológico

Entre finales de 1970 y principios de 1980 se realizaron numerosos intentos para desarrollar un enzimoimmunoanálisis (EIA) y radioimmunoanálisis (RIA) convencionales para antígenos específicos del TFA utilizando fracciones IgA, IgG e IgM de suero o plasma de fase aguda, convalescente o crónica procedentes de humanos o chimpancés. Sin embargo no se obtuvieron resultados positivos. Los hallazgos reforzaban la noción de que la escasez de antígeno del virus en sangre era el principal problema, y sugerían fuertemente que el diagnóstico de hepatitis NANB postransfusional aguda o crónica podría ser realizado con mayor probabilidad en base a la seropositividad para anticuerpos virus específicos⁴⁶. Un método similar había sido empleado para el diagnóstico serológico de pacientes con infección por VHA, donde la presencia de IgM anti-VHA resultaba ser un constante marcador de infección aguda.

En 1989 todo el oscuro período anterior comienza a esclarecerse gracias a los trabajos realizados en colaboración entre científicos de la Chiron Corporation y el equipo de Dr. Bradley en los CDC⁴⁷ quienes desarrollaron una estrategia de clonación original, conjugando técnicas inmunológicas y de genética molecular. Es-

tos investigadores utilizando plasma de chimpancé infectado experimentalmente, que contenía títulos altos de virus, extrajeron los ácidos nucleicos mediante ultracentrifugación intensiva, para asegurar la recuperación de cualquier virus pequeño. Todo el material genético recuperado fue transcrito a DNA complementario (cDNA), mediante "random primers", construyendo una genoteca de cDNA en un vector de expresión (fago lambda gt₁₁), que se utilizó para infectar *Escherichia coli* y, de esta forma, lograr expresar las proteínas codificadas por cada clona. Las diversas proteínas así obtenidas se pusieron en contacto con plasma de pacientes con hepatitis crónica NANB, en los que se supuso debían existir anticuerpos contra el virus. Se obtuvo, pues, una clona, la 5-1-1, que expresaba un antígeno que reaccionaba con el suero obtenido en fase de convalecencia, pero no con el suero obtenido del mismo sujeto antes de la adquisición de la enfermedad. Esta clona codificaba al menos un epitopo específico reconocido por anticuerpos de pacientes con hepatitis NANB y estaba incluida en otra de mayor longitud, la clona 81, que no se relacionaba con material genético derivado del chimpancé, sino que procedía de un RNA de cadena sencilla, específicamente asociado con la hepatitis NANB y cuyo tamaño original debía ser de alrededor de 10.000 nucleótidos y que constituiría el genoma del virus responsable. Posteriormente y tras la clonación en levaduras, de parte de este genoma fundido con el gen superóxido dismutasa humana, se sintetizó un polipéptido formado por 363 aminoácidos, que constaba de tres epitopos contiguos de la región no estructural del genoma, denominado c100-3 y que fue utilizado para el desarrollo de una sonda de captura en fase sólida para detectar anticuerpos específicos, mediante inmunoanálisis.

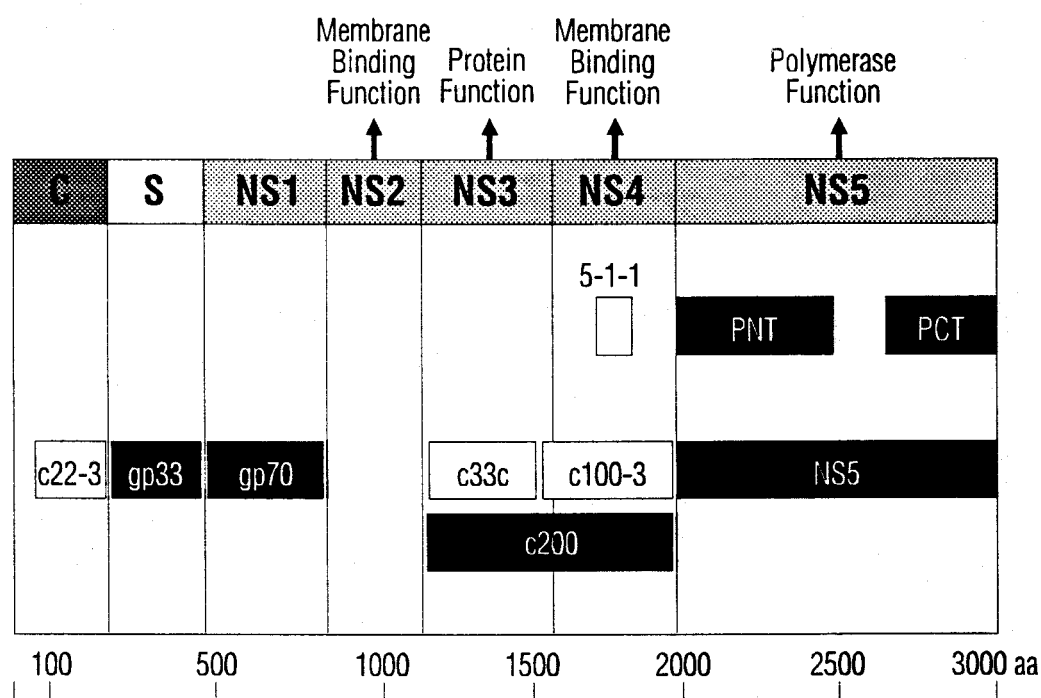
La aparición bien documentada de seroconversión en los pacientes y los chimpancés con hepatitis NANB, pero no en los individuos control, y los resultados obtenidos al analizar un panel de sueros codificados preparado por el NIH, frente al que anteriormente habían fracasado otros inmunoanálisis, proporcionaron pruebas convincentes de la especificidad y la sensibilidad del nuevo test para detectar anticuerpos en la hepatitis NANB de transmisión parenteral. La posterior demostración de anticuerpos en pacientes con hepatitis crónica postransfusional NANB, procedentes de áreas geográficas muy alejadas entre sí, así como en una proporción elevada (mayor al 50%) de individuos con hepatitis NANB clínicamente bien definida pero sin una vía identificable de contagio, permitió sugerir la existencia de un agente infeccioso al que Kuo y cols.⁴⁸ denominarían "virus de la hepatitis C" (VHC), y que sería responsable de la mayor parte de la hepatitis NANB postransfusional a nivel mundial y de un gran porcentaje de hepatitis NANB adquirida en la comunidad.

1.2.2. Caracterización molecular y clasificación taxonómica del VHC

El VHC posee un genoma de RNA de cadena simple con polaridad positiva, de unos 9.400 nucleótidos que codifica una poliproteína precursora de unos 3.010 o 3.011 aminoácidos. El genoma contiene regiones estructurales en el extremo 5' y componentes no estructurales en el extremo 3'. Se han podido identificar varias zonas abiertas de lectura: C, S, NS1, NS2, NS3, NS4 y NS5 (Fig 2). La región "C" y "S" codifican proteínas estructurales para la nucleocápside (core) y para la envoltura celular (surfa-

ce) respectivamente. Las regiones "NS" codificarían proteínas no estructurales de función aún no definida^{49,50}.

Figura 2. Propuesta de estructura genómica del VHC



Alter, H.J. Ann Int Med 1991; 115:644-49.

La región 5' terminal del genoma muestra cerca del 50% de homología con la región correspondiente de pestivirus animales⁵¹. A nivel de la secuencia de aminoácidos, hay homología limitada con la helicasa no estructural codificada por estos pestivirus, algunos virus de plantas y en menor grado con la helicasa codificada por los flavivirus⁵². Además de la similitud entre dominios proteicos codificados por el VCH, y los flavivirus y pestivirus, el perfil

hidrofóbico de la poliproteína codificada por estos tres tipos virales son extraordinariamente similares⁵³. Estas características genómicas junto a otras físicas previamente conocidas como la presencia de envoltura lipídica deducida por su sensibilidad al cloroformo y el tamaño estimado por procedimientos de ultracentrifugación y microfiltración entre 40 y 80 nm, situarían al VCH dentro de la familia "Flaviviridae".

Las diferencias aisladas del VHC, caracterizadas hasta la fecha, muestran una significativa heterogeneidad en la secuenciación genómica, sugiriendo la existencia de distintos genotipos estrechamente relacionados^{54,55}, tales variaciones genéticas podrían suponer un problema para el desarrollo de una técnica diagnóstica sensible y específica, así como para el diseño de una vacuna eficaz. En definitiva, los hallazgos realizados hasta la fecha, indican que el VCH es un agente único, estrechamente relacionado con los pestivirus seguidos de los flavivirus por lo que podría merecer ser clasificado como género separado dentro de la familia Flaviviridae junto con los flavivirus y pestivirus⁵⁶.

1.2.3. Métodos diagnósticos para la detección del VHC

Actualmente, en la práctica clínica, el diagnóstico de la hepatitis por virus C, se basa en procedimientos inmunoserológicos que pretenden detectar la presencia en el suero de anticuerpos contra los componentes antigénicos del VHC. Aunque esto ha supuesto un paso de gigante en el diagnóstico serológico de la hepatitis NANB que hasta el momento era sólo posible en base a un enojoso procedimiento de diagnóstico por exclusión, también ha su-

puesto el comienzo de una era de nuevos problemas que básicamente continúan sin resolverse debido a la carencia de un procedimiento serológico sencillo para la detección de antígenos de este agente viral. La razón de esto radica en la cantidad de partículas víricas presentes en el suero que probablemente es muy reducida en la mayoría de los casos. No obstante empleando métodos sofisticados de biología molecular se ha conseguido detectar la presencia de secuencias de nucleótidos pertenecientes al ácido nucleico específico del virus de la hepatitis C en el suero de algunos pacientes, lo que probablemente sea debido a la presencia de viriones circulantes y refleje la existencia de replicación activa del virus C. Pero este procedimiento resulta complejo y lleno de escollos técnicos para su aplicación rutinaria en la clínica práctica.

Por todo esto, el diagnóstico serológico de la hepatitis C se halla todavía en sus inicios y ninguna de las pruebas disponibles es lo suficientemente sensible ni específica para considerar resuelto satisfactoriamente el problema del diagnóstico de la hepatitis C, por lo que al menos durante algún tiempo, continuará siendo un reto para científicos y clínicos.

1.2.3.1. Detección de anticuerpos anti-c100-3

La primera prueba serológica utilizada para el diagnóstico de la hepatitis C ha sido la determinación de anticuerpos contra el antígeno no estructural c100-3 del VCH. Inicialmente se realizó en forma de radioinmunoanálisis (RIA) y posteriormente se adaptó para su aplicación en forma de enzimoimmunoanálisis (EIA), poniéndose comercialmente disponible a nivel mundial como pri-

mera herramienta diagnóstica. La importancia y el interés diagnóstico de la determinación de anticuerpos contra el antígeno c100-3, se pusieron tempranamente de manifiesto en el trabajo inicial de Kuo y cols.⁴⁸, en el que demostraron la estrecha asociación entre la presencia de estos anticuerpos y la hepatitis NANB, tanto postransfusional como esporádica. Otros trabajos posteriores no han hecho sino confirmar la asociación entre la hepatitis NANB y la presencia de anticuerpos anti-c100-3 en el suero, tanto en el terreno de la hepatitis postransfusional como en el de la hepatología clínica.

El seguimiento serológico de los pacientes con hepatitis postransfusional y de chimpancés infectados experimentalmente ha proporcionado información acerca de la dinámica de la respuesta de los anticuerpos anti-c100-3 en la infección aguda y en la infección crónica por el VHC transmitida por vía parenteral. El comportamiento de la respuesta de anticuerpos en el hombre con hepatitis postransfusional y en el chimpancés infectado experimentalmente parece bastante similar^{57,58}. La aparición de estos anticuerpos no ocurre precozmente en el curso de la infección sino que tiene lugar algún tiempo después del momento en que se detecta la elevación de las transaminasas. Este intervalo es de un promedio de 15 semanas, aunque ocasionalmente no se detectan hasta pasado un año. En los casos en que la infección se hace crónica la detección de anticuerpos parece ser constante y mantenerse durante mucho tiempo. Sin embargo en los pacientes con hepatitis aguda, la aparición de anticuerpos no es constante, sólo se detectan en algo más de la mitad de los casos y están presentes de forma transitoria, aunque puedan transcurrir muchos meses desde la resolución bioquímica de la enfermedad hasta la negati-

vización de los anticuerpos, de hecho, estos pueden permanecer detectables muchas semanas después de la normalización de las transaminasas y cuando ya no se detecta replicación del virus C, a juzgar por la ausencia de RNA-VHC en el suero de los pacientes⁵⁹. Estos hallazgos indican que la determinación de anticuerpos contra el antígeno c100-3 no constituye un procedimiento ideal para el diagnóstico temprano de la hepatitis C reciente, y aunque el EIA comercial detecta anticuerpos quizás ligeramente antes que el RIA, es aún varias semanas después del ataque agudo.

Por otro lado la detección de estos anticuerpos por el método de EIA plantea algunos inconvenientes importantes de sensibilidad y especificidad, por lo que se debe guardar cautela a la hora de interpretar sus resultados. Gran parte de los estudios han demostrado la aparición de anticuerpos anti-c100-3 en la mayoría de los pacientes con hepatitis postransfusional y también han puesto de manifiesto que casi todos los casos ocurren tras la administración de sangre de donantes reactivos para anti-c100-3, lo que constituye una evidencia de que la positividad de estos anticuerpos señala la presencia de infección por el VHC⁶⁰.

Sin embargo, la asociación entre hepatitis postransfusional y reactividad para anti-c100-3, aunque estrecha, no es absoluta. Existen donantes de sangre seronegativos que pueden transmitir la hepatitis C, lo que indica que algunas personas infectadas e infectantes no desarrollan este anticuerpo. Alter y cols.⁵⁷ han sugerido que la aparición relativamente tardía de anti-c100-3 en el curso de la infección podría explicar este fenómeno. Sin embargo, el seguimiento a largo plazo de estos donantes, ha puesto de manifiesto que suelen ser seronegativos de forma persistente, lo

que sugiere que en algunos casos la infección por el VHC puede existir en ausencia de anticuerpos anti-c100-3 detectables por EIA, por lo que el screening de donantes de sangre con esta técnica no evitaría un porcentaje importante de casos de hepatitis C posttransfusional⁶¹. Además, aunque en la mayoría de los estudios realizados, el anti-c100-3 se positiviza en aproximadamente un 90% de los casos de hepatitis NANB postransfusional, no siempre ocurre así. En un estudio realizado por Feinman y cols.⁶² de casos de hepatitis postransfusional prospectivamente recopilados, la proporción de seroconversión fue más baja de lo habitual, sin que esté claro si esto pudo ser debido a casos de hepatitis que no produjeron anti-c100-3, o que dieron niveles poco importantes o para un período limitado de tiempo. También es posible que en estos casos la enfermedad pueda ser debida a variantes del VCH que son diferentes de aquellas que dan un resultado crónico de la enfermedad con una respuesta vigorosa de anticuerpo anti-c100-3, e incluso que se trate de algún otro virus NANB aún no identificado⁶³.

Pero si los problemas de baja sensibilidad y “falsos negativos” son particularmente cruciales para el screening en bancos de sangre y la prevención de la hepatitis postransfusional, existen otras limitaciones para este ensayo serológico que obstaculizan su aplicación diagnóstica en el escenario clínico. Nos referimos a las evidencias acerca de su falta de especificidad y presencia de “falsos positivos”. Algunos donantes seropositivos no presentan signos clínicos de enfermedad hepática, y los receptores de su sangre no desarrollan hepatitis postransfusional. Parece, por tanto, que algunas personas con reactividad para anti-c100-3 no son infectantes, y en el momento actual resulta difícil

discernir si la presencia del anticuerpo refleja en ellas una infección pasada o si se trata de reacciones positivas falsas frente al anti-c100-3.

Esta situación de falsa reactividad, se ha observado con particular frecuencia en algunas enfermedades clásicamente reconocidas como de naturaleza autoinmune. En un estudio realizado en pacientes con hepatitis crónica autoinmune de tipo 1, McFarlane y cols.⁶⁴ comprobaron positividad para anticuerpos anti-c100-3 por EIA en más de la mitad de los casos estudiados durante una fase de actividad de la enfermedad. La intensidad de la reacción se correlacionaba con la concentración de globulina en el suero, pero la positividad de la prueba desaparecía cuando la enfermedad entraba en remisión bajo tratamiento inmunosupresor. Observaciones similares han sido descritas en niños con hepatitis crónica con marcadores serológicos de enfermedad autoinmune⁶⁵. La conclusión de estos trabajos fue que en algunos pacientes con hepatitis crónica autoinmune, el EIA para anti-c100-3 puede dar resultados falsamente positivos.

El mecanismo responsable de éstos no ha sido elucidado, es posible que esté en relación con la existencia en el suero de anticuerpos contra algún componente antigénico que reaccione de forma cruzada con el antígeno c100-3, o bien que en los sueros hiperglobulinémicos exista algún componente que ocasione una reacción totalmente inespecífica. Esta última posibilidad estaría apoyada por las reacciones aparentemente falsas positivas observadas en los pacientes con artritis reumatoide o con paraproteinemia, en los que no existían evidencias ni antecedentes de hepatitis^{66,67}.

Los falsos positivos están caracterizados por lecturas de densidad óptica relativamente bajas y son escasos en grupos de "alto riesgo". En consecuencia, mientras que el anti-c100-3 detectado en un paciente con hepatitis postransfusional, en un drogadicto o en un paciente con hemofilia es probablemente un anticuerpo antiviral "verdadero", la probabilidad de que la reacción sea específica disminuye en un donante de sangre o en un paciente con enfermedad hepática crónica de causa no viral (autoinmune, alcohólica o por desórdenes metabólicos).

La evidencia de que el EIA puede proporcionar resultados falsos positivos ha determinado la búsqueda de ensayos confirmatorios. En este sentido se ha desarrollado una prueba de radioinmunoblot recombinante (Recombinant immunoblot assay, "RIBA"), en la que el suero problema se incuba sobre una tira de papel de nitrocelulosa en la que previamente se han fijado, en bandas transversales separadas, el antígeno c100-3 obtenido en levaduras y el antígeno 5-1-1, obtenido por clonación en *E. coli*. En sentido estricto, la prueba de RIBA no es genuinamente confirmatoria, ya que emplea los mismos determinantes antigénicos presentes en el EIA. El resultado del RIBA se considera positivo cuando las dos bandas antigénicas reaccionan, negativo cuando no se observa ninguna reacción e indeterminado cuando se comprueba reacción contra sólo uno de los dos antígenos. La lectura de esta prueba se realiza por control visual directo, por lo que puede ser objeto de errores de interpretación dependientes de la apreciación subjetiva del lector.

El RIBA parece ser menos sensible que el EIA y aunque se ha observado una buena concordancia entre ambas técnicas, ésta

no es perfecta, pues algunos sueros intensamente reactivos por EIA resultan negativos por RIBA y, por el contrario, algunas muestras débilmente positivas por EIA pueden ser reactivas por RIBA⁶⁸. Por otro lado se plantea el problema del patrón indeterminado cuya significación clínica y biológica es desconocida. Es evidente por tanto, que el RIBA tiene sus propias limitaciones y no constituye un procedimiento ideal para el diagnóstico de la hepatitis C.

En definitiva, la detección de anti-c100-3 parece plantear numerosos problemas, por lo que, sin menospreciar la importancia que ha supuesto para el conocimiento de la responsabilidad del VHC en el computo global de las hepatitis NANB, parecía clara la necesidad de desarrollar mejores procedimientos de diagnóstico.

1.2.3.2. Detección de otros anticuerpos frente al VHC

En un intento de resolver las dificultades planteadas tanto por la técnica de EIA como por el RIBA frente al anti-c100-3 se han desarrollado y se están evaluando nuevas pruebas serológicas que utilizan otros polipéptidos recombinantes obtenidos por clonación de distintas regiones del genoma del virus. Estudios preliminares han indicado que los anticuerpos anti-c22 y anti-c33c frecuentemente aparecen antes que el anti-c100-3 en la infección aguda, por lo que su detección podría reducir "la fase ventana" de serología negativa, permitiendo un diagnóstico más precoz de la infección por el VCH.

En la prueba denominada **4-RIBA** (four-antigen recombinant immunoblot assay), las tiras de nitrocelulosa incluyen cuatro antígenos recombinantes del VCH, los dos antígenos c100-3 y 5-1-1

del RIBA clásico, un antígeno del core, el c22, y otro antígeno no estructural, el c33c. La especificidad de esta prueba parece ser mayor que la del EIA convencional de primera generación (EIA-1), además presenta la ventaja adicional de permitir la detección de anticuerpos de un modo relativamente precoz tras una infección aguda por VCH, por lo que parece una de las pruebas más idóneas y prácticas de las disponibles actualmente para el diagnóstico de la hepatitis C. No obstante, aunque los resultados del 4-RIBA se correlacionan estrechamente con la viremia por el VCH⁶⁹, su sensibilidad es menor que la de un enzoinmunoanálisis y además es una técnica que resulta costosa y compleja para su aplicación como prueba de cribaje de primera línea en los bancos de sangre.

Para vencer estas dificultades se ha desarrollado un EIA de segunda generación (c200/c22 EIA) (EIA-2) que incorpora el antígeno c33c (expresado como un polipéptido con el C100, denominado c200), y el antígeno c22 para la detección de anticuerpos frente a las proteínas expresadas por regiones no estructurales y estructurales respectivamente del genoma del VHC. Su sensibilidad es mas alta que la del EIA-1 probablemente debido a la respuesta de anticuerpos mas precoz frente a estos epitopos que frente al antígeno c100-3 no estructural⁷⁰⁻⁷², es por tanto más útil para el diagnóstico temprano de la infección por el VCH y vence parcialmente los problemas de falsa positividad. El EIA-2 en donantes, detecta virtualmente todas las muestras anti-C100 positivas, mas un porcentaje adicional que permite una reducción de la incidencia residual de hepatitis por VHC predecida después de testar por EIA-1 y que según algunos estudios no seria mas reducida después de testar los "surrogate markers" ⁷³. El EIA-2 resul-

ta por tanto, un test idóneo para screening de donantes al permitir una reducción de la hepatitis NANB postransfusional y al ser un método al menos tan sensible como el 4-RIBA⁷⁴, pero que sin embargo, tiene la gran ventaja de resultar mas útil en cuanto a aplicabilidad y coste de la técnica.

1.2.3.3. ARN del VCH y técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Aunque la mayoría de los estudios han demostrado una asociación clara entre la presencia de anti-VHC y hepatitis crónica NANB, la detección de anticuerpos no puede determinar si un paciente está recuperado de una infección por el VHC o si aun es portador del virus y por tanto potencialmente infeccioso. Por otro lado los anticuerpos anti-VHC aparecen tarde, después del ataque de hepatitis^{57,61}, y la duración de la infectividad precedente a la seroconversión permanecen inciertos.

La clonación del genoma del VHC ha permitido conocer la secuencia de los nucleótidos que lo constituyen, y tal información ha conducido al desarrollo de técnicas de biología molecular para estudiar el material genético del VHC que pueda estar presente en las muestras biológicas de los pacientes presuntamente infectados. El hallazgo de ARN del VHC (ARN-VHC) en el suero debe interpretarse como una demostración de la existencia de viremia y, por tanto, de replicación del VHC. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre para el VHB, las técnicas de hibridación molecular convencionales no son apropiadas para detectar el ARN-VHC debido a que la cantidad de viriones circulantes es habitualmente

minúscula, por lo que su identificación requiere del empleo de técnicas sofisticadas de biología molecular.

Una pieza fundamental en la investigación de la biología molecular VHC es la amplificación genética mediante la técnica de "polymerase chain reaction" (PCR), que permite efectuar miles de copias de una molécula específica de ADN y multiplicar su concentración para hacerla detectable por procedimientos más convencionales. La extracción del ARN de las muestras a estudiar y su transcripción a ADN complementario es un paso previo e imprescindible a la amplificación mediante PCR. La aplicación de estas técnicas, está proporcionando información sobre aspectos muy importantes, tanto de la biología del VHC como de las infecciones ocasionadas por el mismo.

Weiner y cols.⁷⁵, describieron por primera vez, la presencia de secuencias de ARN-VHC en plasma y tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica y de chimpancés con hepatitis NANB. Estos autores utilizaron como cebadores (primers) de la PCR una pareja de oligonucleótidos sintéticos derivados de dos clonas contiguas del genoma del VHC que flanqueaban una zona de 586 bp. El producto de la reacción lo pusieron de manifiesto utilizando una sonda radioactiva apropiada. Con esta técnica detectaron la presencia de ARN-VHC en el hígado de 7 de 9 pacientes con hepatitis crónica y anti-c100-3 positivo, y en 2 de 6 enfermos con anti-c100-3 negativo, así como en la fase inicial de una hepatitis postransfusional antes de que aparecieran los anticuerpos anti-c100-3. En chimpancés infectados experimentalmente observaron que el ARN-VHC aparecía antes que los anticuerpos anti-c100-3, y también comprobaron que en el curso de la infección por VHC

era posible detectar viremia sin que se produjera seroconversión. Asimismo, estos autores demostraron la presencia de ARN-VHC en un suero que tampoco contenía anticuerpos anti-c100-3, pero que se había mostrado capaz de transmitir la hepatitis C.

Posteriormente Farci y cols.⁷⁶, realizaron un estudio de seguimiento de cinco pacientes con hepatitis postransfusional y cuatro chimpancés experimentalmente infectados con suero de cuatro de estos pacientes. Estos autores utilizaron una modificación de la técnica de PCR diseñando primers mas apropiados dentro de regiones mas conservadas del genoma del VHC y pudieron comprobar que el intervalo medio entre la exposición y la aparición en el suero de ARN-VHC, que indica la existencia de viremia, fue muy corto en todos los pacientes y chimpancés estudiados en contraste con el intervalo prolongado hasta el ataque de hepatitis y elevación de las transaminasas y el intervalo aun mas prolongado antes de la primera aparición de anti-VHC. De este modo durante el período de silencio serológico, el ARN-VHC es el único marcador que permite el diagnóstico de infección y la identificación de pacientes potencialmente infecciosos los cuales no serían detectados por la determinación de anticuerpos. La multiplicación temprana observada en todos los pacientes fue consistente con el patrón observado en los chimpancés experimentalmente infectados. En caso de que la infección se resuelva, el ARN-VHC desaparece, aunque el anticuerpo anti-c100-3 permanezca detectable. Si la infección se cronifica el ARN-VHC se detecta de forma intermitente a lo largo del curso de la infección sin guardar una correlación estricta con los niveles de transaminasas.

Estos datos indican que el ARN-VHC es un marcador crucial

para establecer el diagnóstico temprano de infección primaria por VHC y es capaz de discriminar entre infección pasada y activa en pacientes con patrones persistentes o fluctuantes de anticuerpos. Además testar el ARN-VHC tiene valor pronóstico ya que el aclaramiento sostenido de este marcador se correlaciona con la resolución de la enfermedad, mientras que la detección persistente de ARN-VHC predice progresión a formas crónicas de hepatitis.

En el campo de la hepatitis postransfusional, algunos estudios, han puesto de manifiesto que existe una buena relación entre la presencia de ARN-VHC en la sangre transfundida y la aparición de hepatitis en el receptor, de tal modo que la sangre virémica transmite la hepatitis C independientemente de que contenga o no anticuerpos anti-VHC^{77,78}. La determinación de ARN-VHC, si fuera técnicamente factible, sería un buen método para el cribado de donaciones puntuales aunque no para la selección de donantes habituales, puesto que un portador crónico de VHC puede no presentar viremia en un momento determinado, sin ser imposible que pueda presentarla en algún momento ulterior de su evolución.

Actualmente la determinación de ARN-VHC como método diagnóstico de la hepatitis C presenta numerosas dificultades, algunas relacionadas con la propia complejidad de la técnica y otras derivadas de la aparente variabilidad genética del VHC^{54,55}, siendo posible que algunos de los falsos negativos obtenidos por PCR puedan evitarse con el empleo de cebadores derivados de zonas más conservadas del genoma del virus que las utilizadas hasta ahora. En cualquier caso esta técnica fidedigna y sensible para detectar secuencias del VHC en tejido y plasma resulta muy valiosa para obtener información, no solo para el diagnóstico de

infecciones debidas al VHC sino para intentar esclarecer la probable existencia de otros agentes asociados a la hepatitis NANB y para evaluar el grado de eficacia de los posibles tratamientos antivíricos.

1.2.4. Implicaciones clínicas de la detección del VCH

La hepatitis C es un problema sanitario importante en todo el mundo, no solo por su frecuencia, sino también por las graves consecuencias clínicas que conlleva. Se estima que anualmente en EEUU ocurren unas 170.000 infecciones por hepatitis NANB, la mayoría de las cuales están causadas por el virus de la hepatitis C. La tasa de incidencia observada es de aproximadamente 7.6 por 100.000 habitantes⁷⁹. El 50% de todos los infectados, evolucionan a la cronicidad y de entre estos, un elevado porcentaje lo hacen a formas graves de enfermedad hepática crónica (hepatitis crónica activa o cirrosis)^{80,81}. En la población general, la seroprevalencia del VHC no muestra marcadas diferencias geográficas. En EEUU, Alemania y Francia⁸²⁻⁸⁴ las cifras de anti-VHC en donantes voluntarios de sangre son del 0.3 al 0.7%; mientras que en el sur de Europa y Japón^{85,86} se mueven entre el 0.9 y 1.2%. En España^{81,87} la prevalencia global de donantes repetidamente reactivos para anti-VHC es de alrededor del 1%.

Se han detectado claramente anticuerpos frente al VHC, aunque con distinta intensidad, en numerosas enfermedades hepáticas. En la hepatopatía crónica criptogenética definida como aquella enfermedad de hígado sin factor etiológico identificable, la aplicación de técnicas para la detección de anti-VHC ha puesto de manifiesto la presencia de este agente en una proporción elevada

de casos. En nuestro país, se ha encontrado anti-VHC hasta en aproximadamente el 80% de pacientes con hepatitis crónica y cirrosis de origen desconocido⁸⁸, cifras que concuerdan con las halladas en otras áreas geográficas⁸⁹ y que ponen de manifiesto la importancia de la infección por VHC como causa de enfermedad hepática crónica en nuestro país. También en pacientes con enfermedad de hígado alcohólica se ha observado una tasa extraordinariamente elevada de anticuerpos frente al VHC^{90,91}. Se han informado prevalencias que oscilan entre el 25-35% y la presencia de anti-VHC se ha asociado con la severidad clínica de la enfermedad de hígado⁹¹, con una supervivencia más corta, y la presencia de caracteres distintivos de hepatitis crónica activa en la biopsia de hígado en estos pacientes.

Otro hecho destacable, es el importante papel que el VHC parece representar en la patogénesis del carcinoma hepatocelular (CHC). La presencia de anticuerpos anti-VHC ha sido elevada en las distintas series estudiadas. En Italia⁹² y España⁹³ entre el 75% y el 80% de los pacientes con CHC presentan reactividad para anti-VHC, cifras similares se han detectado en pacientes japoneses⁹⁴ y algo más bajas en Estados Unidos y en el sur de Africa⁹⁵. En la actualidad se ignora si el desarrollo del tumor es consecuencia directa de la capacidad oncogénica del VHC o depende de otros factores, como la propia existencia de cirrosis hepática.

También en pacientes afectados de hepatitis crónica con antígeno de superficie de la hepatitis B positivo (HBsAg+), se ha observado la presencia de anticuerpos frente al VHC en cifras que rondan entre un 11% y 18.4% de los casos^{88,96}. En estos enfermos la prevalencia de anti-VHC es más elevada en los pacientes con

anti-HBe positivo, sin evidencias de replicación del VHB (DNA-VHB negativo), en los que la persistencia de la hipertransaminasemia hace considerar por un lado la posibilidad de que el VHC pueda ser un importante cofactor en el desarrollo de enfermedad hepática activa en pacientes con hepatitis crónica B sin replicación viral y por otro lado la hipótesis de que el VHC pudiera actuar suprimiendo la replicación del VHB de forma parecida a como lo haría el virus de la hepatitis delta (VHD).

Diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos anti-VHC en enfermedades clásicamente reconocidas como de naturaleza autoinmune^{64,88,97}. Probablemente las dificultades para establecer unos criterios estrictos que definan la hepatitis crónica autoinmune, son causa de las diferentes tasas de prevalencia de anti-VHC informadas. Aunque la interpretación exacta de la positividad de anticuerpos anti-VHC en las enfermedades hepáticas autoinmunes (y viceversa) plantea dificultades, existen algunos datos que pueden disminuir las posibilidades de error en el diagnóstico diferencial entre esta entidad y la hepatitis crónica por virus C.

De un modo general, asociando los hallazgos derivados de diversos estudios^{64,65,88,97}, parece que los pacientes con hepatitis crónica C presentan una reactividad intensa para anti-VHC, suelen tener antecedente de una posible inoculación parenteral, los autoanticuerpos están presentes a títulos bajos y suelen mostrar una actividad de enfermedad hepática mas bien modesta. En contraste, los pacientes con hepatitis crónica autoinmune presentan menor reactividad anti-VHC, los títulos de autoanticuerpos son elevados, la enfermedad es mas activa, con transaminasas más

elevadas y suelen presentar una respuesta favorable al tratamiento con corticoides. En estos casos, la presencia de anti-VHC podría considerarse como un proceso de reactividad cruzada o como un fenómeno inespecífico de reactividad, y raramente indicaría infección por el VHC. En el momento actual, la posibilidad de la aplicación de técnicas de PCR para la detección del RNA del VHC ha supuesto una valiosa herramienta para la diferenciación de estas dos enfermedades, hecho que es de suma importancia no sólo desde el punto de vista del ejercicio diagnóstico sino fundamentalmente por las dificultades que comporta el tratamiento en la práctica de estos enfermos y que podría ser diametralmente opuesto para cada una de las dos entidades.

1.2.5. Hepatitis C de transmisión parenteral

La difusión del VHC por exposición percutánea directa a sangre, esta bien documentada^{80,98}, las personas comúnmente consideradas con alto riesgo para adquirir el VHC incluyen receptores de sangre y productos sanguíneos, drogadictos intravenosos, personal sanitario con exposición profesional a sangre y pacientes hemodializados.

En el terreno de la **hepatitis postransfusional** la introducción de técnicas para la detección del VHC ha supuesto un notable avance en lo que se refiere a la prevención de la enfermedad. Tras la implantación del cribaje sistemático de donantes voluntarios para anti-VHC en los bancos de sangre, se ha obtenido una drástica reducción de la incidencia de hepatitis NANB postransfusional, alrededor del 50% en EEUU⁹⁹ y del 70% en nuestro entorno⁶¹. Pero a pesar de los resultados alcanzados, aún quedan va-

rias cuestiones por aclarar así, el screening para anti-VHC en donantes detecta aproximadamente el 85% de portadores de anticuerpos lo que disminuiría de forma importante la incidencia, pero no eliminaría completamente el riesgo de hepatitis NANB postransfusional. Este hecho plantea por un lado la necesidad de desarrollar mejores técnicas para la detección de anticuerpos frente al VHC mediante la adición de nuevos epítomos inmunogénicos, y aún más, la necesidad de contar con ensayos que permitan la determinación de antígenos para el virus, lo que es más difícil de lograr teniendo en cuenta la baja carga vírica circulante del VHC.

Mientras tanto, resulta cuestionable la necesidad de mantener la vigencia de los marcadores indirectos, es decir la determinación de hipertransaminasemia y/o anti-HBc, para la detección de donantes potencialmente peligrosos. En países como EEUU se continúan utilizando los "surrogate markers" junto al cribaje para anti-VHC, presumiblemente más por razones éticas y legales que estrictamente científicas, sobre todo cuando la eficacia y rentabilidad de esta estrategia combinada no ha sido probada de forma contundente y prospectiva. Mayores dificultades existen en nuestro entorno, donde la prevalencia de anti-HBc alcanza e incluso puede llegar a superar, en ocasiones, el 15%, lo que supondría una pérdida insoportable de donantes. Posiblemente una estrategia mas coherente de actuación en nuestra área podría ser la exclusión de donantes hipertransaminasémicos y/o anti-VHC positivos.

Otras medidas de prevención que han suscitado un enorme interés han sido la donación autóloga y diferida de sangre para casos de cirugía programada y la inactivación viral por medios

físicos y químicos de derivados plasmáticos. Esta última medida se ha considerado con especial atención en los pacientes **hemofílicos** en los que la prevalencia global de anti-VHC es muy elevada, con cifras que oscilan entre el 64%¹⁰⁰ y el 82%¹⁰¹. Diversos trabajos han demostrado que la frecuencia de infección por el VHC es mucho menor en aquellos pacientes hemofílicos tratados exclusivamente con productos sometidos a procedimientos virucidas¹⁰²⁻¹⁰⁴, siendo actualmente controvertida la cuestión de si la inactivación viral de los productos a infundir es preferible al screening y la selección de los donantes mediante la determinación de anticuerpos anti-VHC. Posiblemente la solución a este problema esté ya al alcance de la mano, con la utilización universal de factor VIII recombinante cuya eficacia e inocuidad parecen ser excelentes¹⁰⁵.

También los pacientes sometidos a **hemodiálisis** periódicas muestran una prevalencia de anti-VHC elevada. Nuestro país arroja unas cifras próximas al 20%^{100,106}, similares a las halladas en unidades de diálisis de otras áreas geográficas¹⁰⁷. La prevalencia de dichos anticuerpos parece relacionarse con antecedentes previos de hepatitis NANB, historia de ADVP, evidencia serológica de infección pasada o en curso por VHB, antecedente de transfusiones múltiples y el tiempo de duración del tratamiento con hemodiálisis¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. En estos pacientes la reducción de la incidencia de hepatitis por VHC estará en función por un lado de una mejor selección de los donantes de sangre mediante el cribaje previo para anti-VHC, y por otro en el tratamiento de la anemia asociada a la insuficiencia renal crónica con eritropoyetina humana recombinante, minimizando así, el riesgo de transmisión transfusional.

En los adictos a drogas por vía intravenosa, las cifras de anti-VHC oscilan entre el 48% y más del 90% de los sujetos estudiados^{100,110-112}. Las prevalencias más altas se observan en aquellos que presentan simultáneamente serología positiva al VIH¹¹⁰⁻¹¹² o en drogadictos con enfermedad hepática crónica¹¹³. Es frecuente que la positividad de anticuerpos frente al VHC en estos pacientes se sume a las evidencias serológicas de infección por otros virus de la hepatitis, por lo que la presencia de anti-VHC debe ser valorada con prudencia, ya que la hiperglobulinemia que suelen presentar los drogadictos afectados de hepatitis crónica evolucionada y/o los infectados por VIH pueden causar reacciones positivas falsas. La prevención en este colectivo es particularmente difícil y se basa fundamentalmente en medidas de educación sanitaria y en la facilitación de material de inyección de un solo uso, pero aún así, los resultados no son muy alentadores y ello pese a las reiteradas campañas acometidas para concienciar en relación a un problema de mayor severidad e impacto social como es el SIDA en el momento actual.

Otro aspecto de particular importancia en la transmisión parenteral del VHC lo constituye la inoculación accidental en el **personal sanitario** con material potencialmente contaminado. El riesgo vinculado a este modo de exposición profesional ha sido evaluado en diferentes estudios y cuantificado entre un 0%-10%^{90,114-116}. Las recomendaciones de profilaxis postexposición en tales casos son considerablemente imprecisas¹¹⁷, pero la administración de inmunoglobulinas inespecíficas podría ser de alguna utilidad dada la eficacia demostrada en pacientes sometidos a cirugía cardíaca bajo circulación extracorpórea en una época anterior a la incorporación de la detección sistemática de anti-VHC en nuestros bancos de sangre¹¹⁸.

En los dentistas parece existir un mayor riesgo ocupacional para la infección por VHC¹¹⁹. Esto probablemente sea debido a la exposición a sangre, sin embargo, el hallazgo por Wang y cols.¹²⁰ de RNA del VHC en saliva de pacientes con hepatitis postransfusional y algunas evidencias de que la hepatitis por VHC puede ser experimentalmente transmitida a primates tras inoculación de saliva con RNA del VHC¹²¹, así como la observación de la probable transmisión del virus por mordedura humana¹²², sugiere que la exposición a saliva y posiblemente a otros fluidos corporales, podrían contribuir al riesgo ocupacional. Sin embargo, a pesar de que en algunos estudios las prevalencias para personal sanitario parecen ser mas elevadas respecto a los donantes de sangre empleados como grupo control, estas son mucho mas reducidas que las aportadas para otros grupos en riesgo, lo que indica que la infección por VHC no es común en los trabajadores sanitarios. En un estudio realizado por M. De Luca y cols.¹²³ en el que utilizaban como grupo control a empleados de otro sector no sanitario perteneciente a la misma área geográfica, los anticuerpos frente al VHC fueron tres veces más frecuentes en estos últimos que en el personal sanitario lo que indica, por un lado que los donantes de sangre son una muestra altamente seleccionada y por lo tanto puede no resultar adecuada para los estudios comparativos, y por otro lado que el riesgo ocupacional para la adquisición del VHC no parece ser significativo y probablemente las cifras de prevalencia estén mas relacionadas con variables de tipo socioeconómico.

1.2.6. Hepatitis C Esporádica

Bajo esta denominación se incluyen todos aquellos casos de infección por el VHC en los que no puede recogerse un antecedente de transmisión parenteral manifiesta. Aunque los límites de esta designación no están claramente definidos, en términos generales puede afirmarse que casi un 50% de los casos pueden ser catalogados de esta forma^{80,98}. Esta circunstancia ha estimulado la investigación de vías alternativas para la infección por este agente, que van desde la transmisión a través de inyecciones con material no desechable cuya práctica era frecuente años atrás, hasta otras formas destacadas de contagio como la diseminación materno-filial y la transmisión horizontal intrafamiliar y sexual.

La posibilidad de **transmisión perinatal** de la hepatitis NANB fue sugerida antes del descubrimiento del VHC en base a algunos casos comunicados de evidencia bioquímica de hepatitis en una pequeña proporción de niños nacidos de madres con hepatitis NANB aguda²⁷ y crónica¹²⁴. La evidencia de transmisión vertical para algunos virus de conocida difusión parenteral como el VHB, el VIH y el virus de la leucemia de células T humana (HTLV-1)¹²⁵⁻¹²⁷, hacían pensar que igualmente el VHC podría transmitirse de forma perinatal desde las madres infectadas a sus hijos recién nacidos. Pero a pesar de todos los esfuerzos realizados, los conocimientos de que disponemos actualmente continúan siendo objeto de un intenso debate.

La presencia de anticuerpos anti-c100-3 en recién nacidos de madres seroreactivas en el momento del parto, hizo sospechar

fuertemente la posibilidad de transmisión materno-filial del VHC, sin embargo, la mayor parte de los estudios de seguimiento vinieron a indicar que los anticuerpos eran adquiridos por transferencia pasiva desde la madre al niño por lo que en la mayoría de los casos estos se negativizaban y se hacían prácticamente indetectables a los seis meses del nacimiento^{128,129}. Se observó, además, que estos cambios serológicos ocurrían sin que existieran evidencias clínicas ni bioquímicas de enfermedad hepática en los recién nacidos, todo lo cual venía a sugerir que la transmisión materno-filial no parecía jugar un cometido importante en la difusión del VHC¹²⁸⁻¹³⁰.

Posteriormente, el desarrollo de técnicas específicas de PCR para la detección de RNA del VHC, ha permitido el empleo de las mismas en el estudio de la transmisión perinatal, pero si bien algunos autores como Thaler y cols¹³¹, encuentran RNA-VHC en una elevada proporción de recién nacidos de madres anti-c100-3 positivas, e incluso en niños con negatividad para anticuerpos en el momento del nacimiento y sugieren que la infección perinatal podría iniciar en los infantes un proceso de enfermedad silente o un estado de portador crónico del VHC, estudios más recientes empleando también técnicas de PCR no han mostrado evidencias de transmisión perinatal^{132,133} y parecen inclinar definitivamente la balanza hacia una significación muy pobre de esta alternativa, aunque los resultados aún no puedan considerarse concluyentes¹³⁴.

Existe, además, otro aspecto que requiere una correcta valoración, ya que la observación de casos de transmisión materno-filial, particularmente a partir de madres infectadas por el VIH¹³⁵, a llevado a considerar que el estado de inmunodeficiencia adqui-

rida podría permitir una mayor actividad replicativa del VHC en la madre infectada, y por tanto mayor riesgo de contagio para el recién nacido. Sin embargo también en este sentido los hallazgos han resultado contradictorios y algunos estudios no han evidenciado mayor transmisión del VHC desde las madres coinfectadas por ambos virus^{129,131}. Son por tanto necesarios nuevos trabajos sobre muestras amplias, con seguimientos durante mas largos períodos de tiempo y empleando ensayos que puedan medir cuantitativamente el RNA del virus para establecer correctamente la eficacia de la transmisión vertical del VHC y su importancia como entidad epidemiológica.

La transmisión intrafamiliar de la hepatitis NANB y el agrupamiento de casos en sujetos conviventes fue comunicada a mediados y finales de la decada de los setenta^{20,28,136}, sugiriendo la probable existencia de mecanismos de difusión no bien identificados en el ámbito familiar. Diversos estudios han hallado prevalencias de anticuerpos frente al VHC en los conviventes de pacientes con hepatopatía crónica y anti-VHC positivo más elevadas que las observadas en los donantes de sangre de la misma área geográfica. Kamitsuka y cols¹³⁷. hallaron una prevalencia de anti-VHC del 9% en los contactos familiares de pacientes con hepatitis crónica NANB, cifra muy similar a la publicada por Ideo y cols¹³⁸. (8%), y Bellobuono y cols¹³⁹. (7.3%), resultados que parecían indicar la posibilidad de formas de contagio no bien definidas entre los sujetos infectados y sus contactos domésticos. A pesar de estos hallazgos, el problema de la transmisión a conviventes del VHC continua siendo todavía motivo de discrepancia y algunos investigadores no han detectado enfermedad hepática ni datos serológicos indicativos de infección entre los conviventes de los

pacientes con hepatitis crónica C estudiados^{140,141}; por ejemplo, no hubo evidencias de infección por VHC en ninguno de los 62 contactos de pacientes con hepatitis crónica NANB bien documentada, estudiados por Everhart y cols¹⁴⁰.

Estos resultados discordantes plantean la necesidad de nuevos estudios epidemiológicos en un intento de definir con mayor precisión la importancia que la difusión del VHC puede tener en el entorno familiar, ya que su conocimiento más exacto, permitiría ofrecer un adecuado consejo epidemiológico.

La **transmisión sexual** de la hepatitis NANB, había sido sospechada a raíz de los resultados de diversos estudios epidemiológicos^{20,26} que ponían de manifiesto la presencia de hepatitis NANB en pacientes sin antecedentes de exposición parenteral, y que referían con mayor frecuencia que los grupos controles una historia previa de exposición sexual. El descubrimiento del VHC y la posibilidad de examinar su presencia mediante la determinación de anticuerpos específicos ha permitido la realización de estudios encaminados a demostrar la relevancia que esta vía de contagio puede suponer. Sin embargo, los hallazgos obtenidos hasta la fecha han resultado contradictorios, de modo que, mientras algunos autores han encontrado cifras de anticuerpos frente al VHC en grupos sexualmente promiscuos de 5 a 15 veces superiores (5%-16%) a las alcanzadas para las poblaciones control^{111,142-146}, o cifras entre el 6% y el 14% en parejas sexuales de pacientes anti-VHC positivos^{143,147-150} sugiriendo una relativa eficacia de la transmisión sexual del VHC; otros autores como Esteban y cols¹⁰⁰. y Everhardt y cols¹⁴⁰. no han hallado evidencias de trans-

misión sexual ni en los grupos con promiscuidad sexual ni en las parejas de pacientes anti-VHC positivo estudiados.

La discrepancia de los resultados obtenidos en los diversos estudios, ha llevado a considerar la probable existencia de factores capaces de inducir estas divergencias, motivando distintos patrones de transmisión del VHC. Una de las explicaciones posibles es que la mayoría de estos estudios se basan en la detección de anti-VHC por técnicas de EIA-1 que sólo detectan anticuerpos frente al antígeno no estructural c100-3 y que resulta menos sensible que otros ensayos serológicos desarrollados con posterioridad, y que detectan anticuerpos frente a regiones estructurales y no estructurales del genoma del VHC.

Otra posible explicación para las divergencias halladas podría radicar en la variación individual de la infectividad. En este sentido se ha especulado que la coinfección por el VIH podría incrementar la difusión del VHC como consecuencia de un aumento

**PLANTEAMIENTO Y
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

2

Aunque la hepatitis NANB fue inicialmente descrita en asociación con las transfusiones sanguíneas^{13,23}, este modo de transmisión ocurre solo para una pequeña proporción de los casos de enfermedad aguda y crónica observados en la comunidad^{20,24}. Datos epidemiológicos aportados por los CDC²⁴, mostraban que en 1987, solo el 5% de los pacientes referían antecedentes de transfusión sanguínea, mientras que el 42% tenía una historia de adicción a drogas intravenosas, y existía un antecedente de exposición profesional con frecuente contacto sanguíneo o de hemodiálisis para menos del 5% de los episodios estudiados. De este modo, para aproximadamente el 40% de los casos de hepatitis NANB, no podía registrarse una vía de exposición parenteral manifiesta tras una cuidadosa investigación^{20,24-26}, surgiendo de este modo el término de hepatitis NANB esporádica como expresión de aquellos casos sin un factor de riesgo conocido para la transmisión de la enfermedad. Esto unido al reconocimiento de la gravedad a largo plazo de la infección NANB, con una elevada tendencia a la cronicación y evolución a formas histológicas graves^{19,20}, estimularon la investigación de vías alternativas de contagio como herramienta fundamental para el establecimiento de las adecuadas medidas profilácticas. En base a esto, se consideraron diversas posibilidades de contagio, como la transmisión vertical, maternofamiliar^{27,124} y también se especuló sobre el empleo de inyecciones con material no desechable²⁶ cuya práctica era frecuente años atrás.

Sin embargo, buena parte de los esfuerzos de investigación epidemiológica se centraron en la consideración del papel que podía jugar la transmisión horizontal, intrafamiliar y sexual, en la diseminación de la hepatitis NANB. Las mayores evidencias en

torno a este modo de transmisión, fueron comunicadas a principios de esta década y derivan de estudios de casos y controles que mostraban, como diferencias significativas vinculadas a un mayor riesgo de infección, la existencia de un mayor número de parejas sexuales en los seis meses previos al comienzo de la enfermedad y/o tener un miembro de la familia o pareja sexual, con historia de hepatitis²⁶. Pero a pesar de estos hallazgos, definir el rol del contacto persona-persona en la transmisión de la hepatitis NANB se veía dificultado por la ausencia de ensayos serológicos específicos para detectar la presencia del agente o agentes etiológicos implicados en esta patología.

La reciente clonación del genoma del VHC⁴⁷, agente responsable de la mayoría de los casos de hepatitis NANB postransfusionales y esporádicos⁴⁹, y la disponibilidad de un ensayo serológico para investigar la presencia de anticuerpos frente a este virus⁴⁸, ha supuesto un paso crucial en el conocimiento de las hepatitis víricas y ha hecho posible la realización de numerosos estudios encaminados a valorar la importancia que la transmisión intrafamiliar y sexual puede representar como vía alternativa de difusión de este agente.

Diversos trabajos han establecido prevalencias de anti-VHC entre el 7.3% y el 9% en contactos domésticos de pacientes con hepatitis crónica NANB o anti-VHC positivos¹³⁷⁻¹³⁹, cifras más elevadas que las obtenidas para los grupos controles, y que han sugerido la posibilidad de difusión del VHC a través de formas de contagio no bien identificadas en el ámbito familiar. Igualmente otros trabajos realizados en poblaciones con riesgo para las enfermedades de transmisión sexual, han mostrado prevalencias en

los grupos con promiscuidad estudiados, entre 5 y 15^{111,142-146} veces más altas que las halladas en los donantes de sangre y cifras entre el 6% y el 14%¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ para las parejas sexuales de pacientes anti-VHC positivos, lo que parecía indicar una cierta eficacia de la vía sexual como forma de contagio del VHC. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, el problema de la transmisión horizontal continua siendo aún objeto de un intenso debate y algunos investigadores no han detectado enfermedad hepática ni datos serológicos indicativos de infección entre los convivientes de pacientes con hepatitis crónica C^{140,141} o en los grupos con promiscuidad sexual estudiados¹⁰⁰.

Las razones de estas discrepancias son, probablemente, múltiples y tanto relacionadas con la selección de probandos y grupos control como también dependientes de la tecnología utilizada. En efecto, la mayoría de estos estudios se basan en la detección de anti-VHC por técnicas de EIA de primera generación que sólo detecta anticuerpos frente al antígeno no estructural c100-3 y que resulta menos sensible que otros ensayos serológicos desarrollados con posterioridad⁷⁰⁻⁷², y que determinan anticuerpos frente a regiones estructurales y no estructurales del genoma del VHC. Igualmente, salvo excepciones, tampoco se han utilizado técnicas de confirmación de segunda generación, lo que puede contribuir a incrementar las divergencias por la introducción de positividades inespecíficas.

Adicionalmente, al ser el VHC un virus de RNA cuyo quantum circulante en los pacientes infectados es extraordinariamente bajo, una variable adicional a considerar es la posible diferente capacidad infectante de casos índices bajo especiales circunstancias

que pudiesen incrementar la carga viral C. En este sentido se ha especulado sobre el posible papel que podría jugar la coinfección por el VIH en aumentar la eficacia de la transmisión del VHC a través de la vía sexual. Apoyarían esta hipótesis diversos estudios como los realizados por Simmond y cols¹⁵². o por Eyster y cols¹⁵¹. Este último encuentra que las parejas sexuales de hemofílicos anti-VHC positivos infectados por el VIH, tenían cuatro veces más riesgo de adquirir la infección por el VHC. Es, por tanto, posible que aquellas circunstancias que comporten inmunosupresión como la coinfección por el VIH, puedan aumentar el nivel de viremia y por lo tanto facilitar la capacidad de difusión del VHC.

Parece, pues, evidente que el capítulo del papel que el contacto persona-persona representa en la difusión del VHC no puede considerarse definitivamente cerrado. La necesidad de nuevos estudios epidemiológicos y aportar información a las cuestiones planteadas, estimularon la realización de esta Tesis Doctoral en un esfuerzo por ampliar nuestros conocimientos tanto en relación a la penetración del VHC en el entorno familiar y en poblaciones con riesgo para las enfermedades sexualmente transmitidas, como en cuanto a la valoración de los posibles factores que pueden intervenir modificando la eficacia de la difusión de este agente a través de la vía sexual.

OBJETIVOS

3

- 1º Evaluar la eficacia de la transmisión horizontal intrafamiliar no sexual del VHC mediante una investigación de la prevalencia de anti-VHC en los contactos domésticos de casos índices reactivos para anti-VHC (drogadictos parenterales y hemofílicos), en comparación con la hallada en un grupo control de donantes de sangre.

- 2º Evaluar la eficacia de la transmisión sexual del VHC mediante una investigación de la seroprevalencia de anti-VHC en:
 - a) Individuos con elevada promiscuidad sexual (varones homosexuales, prostitutas y clientes de prostitutas) en comparación con un grupo control de donantes.

 - b) Parejas sexuales estables de casos índices reactivos para anti-VHC en comparación con un grupo control de donantes.

Investigando adicionalmente el papel de la coinfección VIH como posible modulador de la infectocontagiosidad del VHC en la transmisión sexual a parejas estables.

MATERIAL Y MÉTODOS

4

4.1. Estudio de la transmisión intrafamiliar no sexual del VHC

4.1.1. Diseño

Estudio prospectivo.

4.1.2. Probados

Se investigó la presencia de anti-VHC en 177 muestras séricas pertenecientes a otros tantos contactos familiares no relacionados sexualmente con 84 sujetos casos índices anti-VHC reactivos que referían factores de riesgo para virasis de transmisión parenteral. Adicionalmente se analizaron 210 sueros de donantes voluntarios de sangre que fueron empleados como grupo control. La participación en el estudio fue voluntaria, y se les garantizó a los participantes que el acceso a los resultados de los test aplicados, así como a la información acerca de su historia y datos de identificación personal, estaría limitado a los investigadores.

4.1.2.1. Casos índices

Entre 1986 y 1990 se seleccionaron sueros de 84 sujetos casos índices que referían antecedentes de exposición a sangre o productos sanguíneos y que habían resultado reactivos para anti-VHC, 81 (96.4%) fueron drogadictos intravenosos y 3 (3.6%) hemofílicos. De los pacientes casos índices 11 (13.1%) fueron mujeres. La edad media fue de 24.6 ± 5.9 años (rango 16-53) y el tiempo medio de adquisición del factor de riesgo fue de 3.3 ± 2.4 años (rango 0.25-10) (Tabla II).

4.1.2.2. Conviventes no relacionados sexualmente

Entre 1986 y 1990 se obtuvieron sueros de 177 contactos domésticos no relacionados sexualmente con el caso índice. Del total de conviventes, 94 (53.1) fueron mujeres. La edad media fue de 25.2 ± 21.1 años (rango 0.5-77) y el tiempo medio de convivencia con el caso índice desde que este adquirió el factor de riesgo fue de 2.76 ± 2.2 años (rango 0.25-8) (Tabla II). Todos los conviventes negaron antecedentes de transfusión y/o consumo de drogas intravenosas y solo se incluyeron aquellos hijos de madres casos índices que habían nacido después de que esta hubiese adquirido el factor de riesgo para las virasis de transmisión parenteral. Los contactos domésticos fueron incluidos en el presente estudio, a demanda del clínico que visitó al caso índice respectivo, los cuales habían sido asistidos en las áreas de Consultas externas y/o hospitalización del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Tabla II. Características demográficas de los casos índices y contactos domésticos no sexuales

CARACTERÍSTICAS DEMOGRAFICAS	CASOS ÍNDICES	CONTACTOS DOMÉSTICOS
Número	84	177
Edad media	24.6 ± 5.9	25.2 ± 21.1
Tiempo medio de convivencia	NP	2.76 ± 2.2
Tiempo medio adquisición riesgo	3.3 ± 2.4	NP
Nº mujeres (%)	11 (13.1)	94 (53.1)

* Expresado en años.
NP= No procede.

4.1.2.3. Grupo control

Como población control se eligieron 210 muestras séricas, seleccionadas al azar, extraídas a otros tantos donantes voluntarios de sangre, que habían acudido en primera donación al banco de sangre del Hospital Universitario Virgen del Rocío en 1989. Ninguno de ellos tenía historia previa de hepatitis ni pertenecía a ningún grupo de riesgo para virasis de transmisión parenteral.

4.1.3. Métodos de evaluación

A cada uno de los contactos domesticos incluidos en el estudio se le realizó un formulario destinado a descartar conductas de riesgo para virasis de transmisión parenteral y a conocer datos demográficos y datos relacionados con el uso compartido de enseres potencialmente contaminantes con el caso índice.

4.1.4. Métodos de laboratorio

Las muestras de sangre obtenidas fueron sometidas a centrifugación y el suero resultante de cada una de ellas se conservó bajo congelación a -20°C. Todas las determinaciones de laboratorio fueron llevadas a cabo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío.

4.1.4.1. Anticuerpos frente al VHC

Todos los sueros fueron testados para anti-VHC por una técnica de EIA de primera generación (HCV Antibody ELISA system,

Ortho Diagnostics, Raritan, EE.UU.). Esta es una prueba inmuno-sorbente cualitativa, relacionada con enzimas, para la detección de anti-VHC en el suero y plasma sanguíneo humano. Los anticuerpos detectados son los formados frente el antígeno de la región no estructural *c100-3* del VHC obtenido por una técnica recombinante.

El procedimiento del ensayo consiste en una prueba de tres fases realizada en un pocillo recubierto de antígeno recombinante del VHC. En la primera fase, se diluye en el pocillo la muestra a estudiar y se incuba durante un tiempo determinado. Si hay anti-VHC en la muestra, se formarán complejos antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. Las proteínas no fijadas del suero serán eliminadas en el procedimiento de lavado. En la segunda fase, se añade un conjugado de anticuerpo monoclonal murino, que se fija específicamente a la porción anti-VHC de la IgG de los complejos formados. Se procede de nuevo al lavado para eliminar los no unidos. En la tercera fase, se agrega un sistema de detección enzimático consistente en O-fenilalanina y peróxido de hidrógeno. En presencia de conjugado fijado, la O-fenilalanina se oxida dando un producto final coloreado. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. La intensidad del color está en función de la concentración de anti-VHC presente en la muestra, la cual se mide con un lector.

Se consideraron negativas las muestras con valores de absorbancia inferiores al Valor de Corte, y positivas aquellas que presentaron por duplicado valores de absorbancia superiores o iguales al Valor de Corte. No hubo posibilidad de aplicar otro tipo de ensayos para la detección de anti-VHC en las poblaciones descri-

tas, por agotar la mayoría de las muestras séricas pertenecientes tanto a los casos índices como a los contactos domésticos.

4.1.5. Análisis estadístico

Los test estadísticos empleados fueron: la prueba exacta de Fisher para establecer las comparaciones en tablas 2x2, y el test de Chi cuadrado para tablas de mayores dimensiones. Los valores de P menores de 0.05 se consideraron indicativos de significación estadística.

4.2. Estudio de la transmisión sexual del VHC

4.2.1. Diseño

Estudio prospectivo.

4.2.2. Probandos

4.2.2.1. Sujetos sexualmente promíscuos

Se estudiaron a un total de 566 pacientes con riesgo para las enfermedades de transmisión sexual, incluyendo 310 prostitutas, 88 clientes de prostitutas y 168 varones homosexuales. Adicionalmente, fueron analizados 400 donantes voluntarios de sangre como grupo control. La participación en el estudio fue voluntaria, y se les garantizó a los participantes que el acceso a los resulta-

dos de los test aplicados, así como a la información acerca de su historia y datos de identificación personal, estaría limitado a los investigadores.

4.2.2.1.1. Prostitutas

Se analizaron 310 sueros pertenecientes a prostitutas residentes en Andalucía. Las muestras fueron obtenidas entre 1985 y 1990 en el mismo lugar donde ejercían la prostitución, (burdel o club de alterne) a la vez que se recogían datos demográficos y datos relacionados con su actividad sexual. Solo se incluyeron en este trabajo aquellas prostitutas que negaron historia previa de transfusión o de adicción a drogas por vía parenteral. La edad media fue 29.2 ± 6.9 años (rango 18-62), el tiempo medio de prostitución fue 5.2 ± 5.1 años (rango 1-36) y el número medio de parejas sexuales al mes fue de 61.7 ± 68.7 (rango 1-515) (Tabla III).

4.2.2.1.2. Clientes de prostitutas

Entre 1986 y 1990 se obtuvieron sueros de 88 varones heterosexuales promiscuos que referían contacto sexual frecuente con prostitutas y que habían acudido a clínicas para enfermedades de transmisión sexual andaluzas. Se establecieron como criterios previos a su entrada en el estudio, haber mantenido contacto sexual con al menos cinco prostitutas distintas en el último año, y carecer de antecedentes de homosexualidad, transfusión sanguínea y drogadicción intravenosa. La edad media fue 30.4 ± 8.9 años (rango 18-59), el tiempo medio de prácticas sexuales promiscuas fue

de 11.1 ± 7.8 años (rango 2-30), y el número medio de experiencias sexuales con prostitutas por año fue de 22.3 ± 29.6 (rango 5-108) (Tabla III).

4.2.2.1.3. Varones homosexuales

Se analizaron 168 sueros de varones homosexuales que fueron obtenidos entre 1984 y 1990 en las áreas de consultas externas y/o hospitalización del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Todos los varones homosexuales negaron transfusiones previas o drogadicción intravenosa. La edad media fue 29.6 ± 8.1 años (rango 16-69) y el tiempo medio de prácticas homosexuales fue de 11.5 ± 5.6 años (rango 1-53). El número medio de parejas sexuales por año fue 49.7 ± 42.4 (rango 1-1000) (Tabla III).

4.2.2.2. Grupo control

Como grupo control, se seleccionaron aleatoriamente 400 sueros de donantes voluntarios de sangre, que habían acudido en primera donación al banco de sangre del Hospital Universitario Virgen del Rocío en 1986. Ninguno de ellos tenía historia previa de hepatitis ni reconocía adscripción a ningún grupo de riesgo para virasis de transmisión parenteral.

Tabla III. Características epidemiológicas de los grupos sexualmente promiscuos y parejas sexuales estables

Características Demográficas	Prostitutas	Clientes de prostitutas	Varones homosexuales
Número	310	88	168
Edad media	29.2 ± 6.9	30.4 ± 8.9	29.6 ± 8.1
Tiempo medio de promiscuidad	5.2 ± 5.1	11.1 ± 7.8	11.5 ± 5.6
Nº medio contactos/Tiempo	61.7 ± 68.7	22.3 ± 29.6	49.7 ± 42.4

Tiempo expresado en años.

Tiempo expresado en meses.

4.2.2.3. Sujetos no sexualmente promiscuos

4.2.2.3.1. Parejas heterosexuales estables

Entre 1986 y 1991 se recolectaron muestras séricas pertenecientes a un total 423 parejas sexuales estables de casos índices reactivos para anti-VHC los cuales habían sido atendidos en tres centros españoles (170 en Sevilla, 143 en Oviedo y 106 en San Sebastián). Del total de casos índices, 142 fueron adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) y 281 fueron pacientes con hepatitis crónica C postransfusional o esporádica (Fig. 3). Trescientas trece (74%) parejas heterosexuales estables fueron mujeres, la edad media fue 39 ±15 años (rango 17-74) con dos extremos de

mayor concentración entre los 25-35 años y en mayores de 55 años. El tiempo medio de convivencia con el caso índice fue de 15 ± 12 años (rango 1-50), concentrándose mayoritariamente en menos de 5 y más de 20 años (Fig. 4). Todas las parejas sexuales estables negaron antecedentes de transfusión sanguínea, drogadicción por vía intravenosa y/o contacto sexual con otras parejas distintas al caso índice.

Figura 3. Parejas sexuales estables: procedencia geográfica y caracterización del caso índice

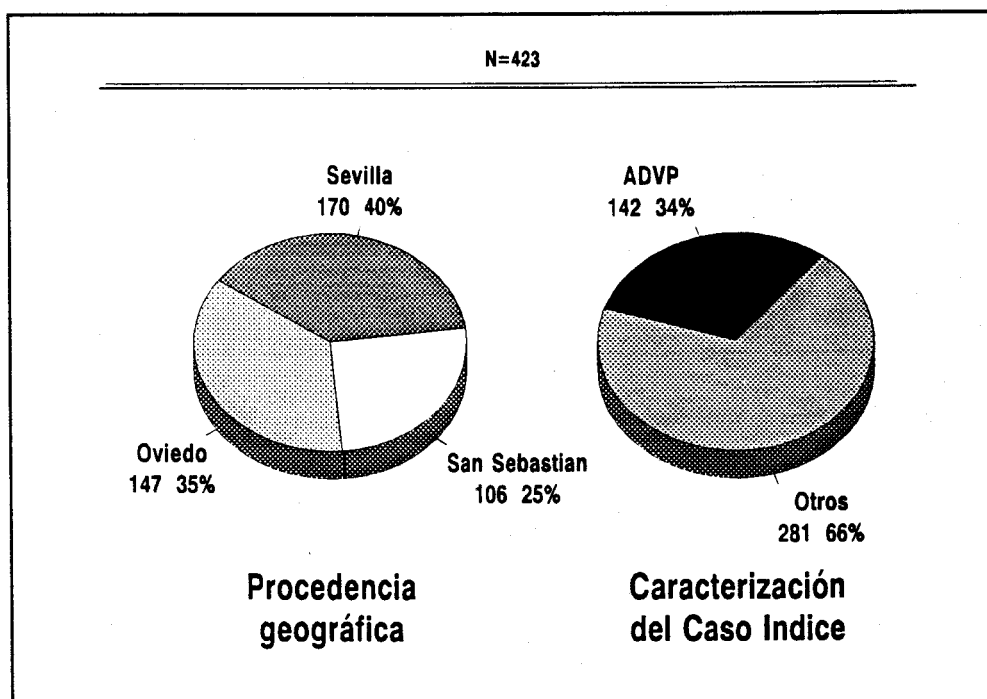
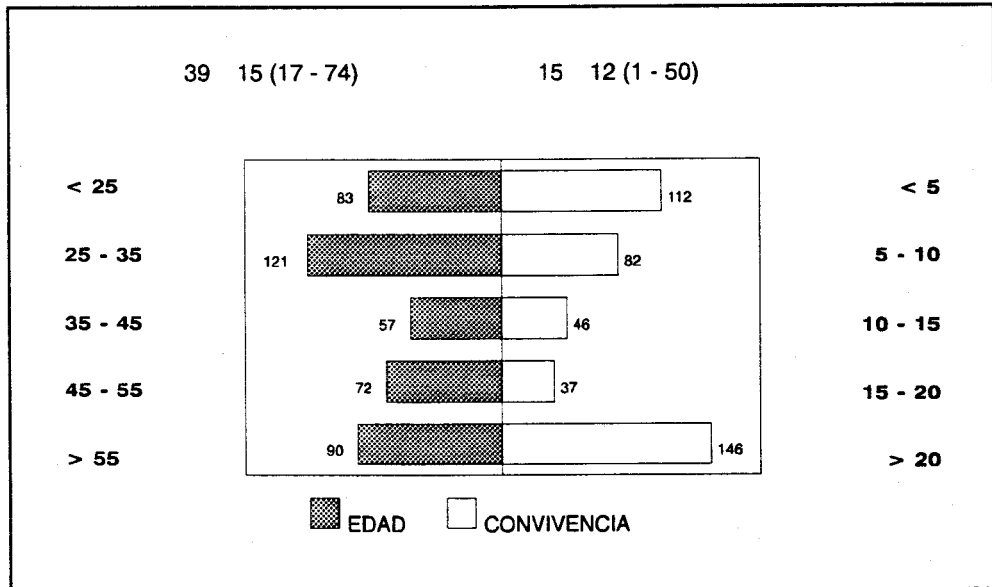


Figura 4. Parejas sexuales: edad y tiempo de convivencia



4.2.2.4. Grupo control

Se seleccionaron al azar 2886 sueros de donantes voluntarios de sangre, que habían acudido en primera donación al banco de sangre de cada uno de los centros entre 1986 y 1991 (926 de Sevilla, 1505 de Oviedo y 455 de San Sebastián). Ninguno de ellos tenía historia previa de hepatitis ni pertenecía a ningún grupo de riesgo para virasis de transmisión parenteral.

4.2.3. Métodos de evaluación

A cada uno de los sujetos sexualmente promiscuos y parejas sexuales estables incluidos en el estudio se les realizó un formulario destinado a descartar conductas de riesgo para virasis de transmisión parenteral y a conocer datos demográficos y datos relacionados con su actividad sexual.

4.2.4. Métodos de laboratorio

Las muestras de sangre obtenidas fueron sometidas a centrifugación y el suero resultante de cada una de ellas se conservó bajo congelación a -20°C. Las determinaciones de laboratorio fueron llevadas en cada uno de los Hospitales participantes en el estudio.

4.2.4.1. Anticuerpos frente al VHC

Todas las muestras fueron testadas para anti-VHC por un EIA-2 (Ortho HCV ELISA Test System 2ª Generación, USA) que incorpora el antígeno *c33c* (expresado como un polipéptido con el C100, denominado *c200*), y el antígeno *c22-3* para la detección de anticuerpos en suero o plasma frente a las proteínas expresadas por regiones no estructurales y estructurales respectivamente del genoma del VHC.

El procedimiento del ensayo se desarrolla en tres etapas, y se lleva a cabo en un micropocillo recubierto de una mezcla de antígenos recombinantes del VHC. En la primera etapa, se diluye en

el pocillo la muestra a estudiar y se incuba durante un tiempo determinado. Si existen anticuerpos anti-VHC, se formarán complejos antígeno-anticuerpo en la superficie del micropozo y las proteínas no fijadas del suero serán eliminadas en el procedimiento de lavado. En la segunda fase, se añade un conjugado de anticuerpo monoclonal murino, que se fija específicamente a la porción IgG anti-VHC de los complejos antígeno-anticuerpo formados. Se procede de nuevo al lavado para eliminar los no unidos. En la tercera fase, se agrega un sistema de detección enzimático consistente en O-fenilalanina y peróxido de hidrógeno. En presencia del conjugado fijado, la O-fenilalanina se oxida dando un producto final coloreado. Se añade entonces ácido sulfúrico para frenar la reacción. La intensidad del color está en función de la concentración de anti-VHC presente en la muestra, la cual se mide con un lector.

Se consideraron negativas las muestras con valores de absorbancia inferiores al Valor de Corte, y positivas aquellas que presentaron por duplicado valores de absorbancia superiores o iguales al Valor de Corte.

Los sueros repetidamente reactivos para anti-VHC por EIA-2, fueron testados por 4-RIBA (Chiron RIBA HCV Test System 2^a Generación, USA), una prueba que detecta cualitativamente, anticuerpos contra antígenos codificados del VHC en suero o plasma humanos. El test reúne cuatro antígenos recombinantes que son los 5-1-1, c100-3, c33c, c22-3 y la superóxido dismutasa (SOD), los cuales se inmovilizan como bandas individuales en tiras de nitrocelulosa. Durante la incubación con especímenes de suero y plasma o los controles adecuados, los anticuerpos frente al VHC,

si están presentes, reaccionaran con las bandas de antígeno correspondientes. Después de retirar los anticuerpos no específicos por lavado y aspiración, las tiras reaccionan con conjugado de IgG de cabra anti-humana con peroxidasa de rábano. Tras incubación, decantación y lavado, para eliminar el exceso de conjugado, se utiliza una solución que contiene peróxido de oxígeno y 4-cloro-1-naftol. Se forman modelos de bandas en cada tira; las intensidades del coloreado de las bandas, de azul a negro, son proporcionales a la cantidad de anticuerpo conjugado ligado a cada uno de los antígenos recombinantes en las tiras. La reactividad de los especímenes hacia cada antígeno se determina comparando visualmente la intensidad de la banda del antígeno individual con las bandas de control interno de IgG, incluidas en cada tira. Para nuestro análisis, las muestras 4-RIBA indeterminadas fueron consideradas negativas.

4.2.4.2. Anticuerpos frente al VIH-1

Los anticuerpos frente al VIH-1 fueron testados en las parejas heterosexuales estables y casos índices por una técnica de EIA comercial (Recombinant HIV-1 EIA, Abbott Labs, Chicago, EE.UU.). Esta técnica detecta los anticuerpos globales de la clase IgG dirigidos directamente contra los dos grupos principales de proteínas del VIH-1: las de la envoltura y las del núcleo viral. El gen *env* o gen de la envoltura, aporta el código de síntesis de una glicoproteína precursora de 160 Kilodaltons (Kd) que es procesada para producir dos nuevas glicoproteínas de 120 y 41 Kd. El gen *gag* o gen del núcleo codifica una proteína precursora de aproximadamente 55Kd, que es procesada ulteriormente para dar origen a tres proteínas de 24, 17 y 15 Kd respectivamente.

Este sistema utiliza esferas recubiertas con antígenos del núcleo y de la envoltura del VIH-1 obtenidos mediante técnicas de DNA recombinante, lo que aumenta la especificidad de esta técnica en relación con otros procedimientos de EIA¹⁵⁴. Las esferas son incubadas con el suero o plasma humano a estudiar, y con los controles apropiados. Si existen en el suero anticuerpos frente al núcleo o la envoltura del VIH-1, se unen a los antígenos de la fase sólida. Luego se incuba el complejo antígeno-anticuerpo de la esfera con Ac de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. Los materiales no unidos se eliminan mediante lavado de las esferas y se agrega una solución de O-fenilalanina que contiene peróxido de hidrógeno. La reacción de la O-fenilalanina y peróxido de hidrógeno con la peroxidasa de rábano picante produce un color amarillo-anaranjado, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anti-VIH-1 presente en la muestra. La reacción enzimática se suspende añadiendo ácido sulfúrico 1 N y se mide la intensidad del color formado con un espectrofotómetro ajustado a 492 nm. La presencia o ausencia del anti-VIH-1 se determina comparando la absorción de la muestra con un valor límite calculado; absorciones iguales o mayores a éste se consideran positivas. Fueron considerados positivos aquellos sueros en los que se observó reactividad en dos determinaciones distintas.

Todos los sueros que resultaron positivos por EIA fueron confirmados mediante una técnica de western-blot (New Lav Blot I, Institute Pasteur, París, Francia). Esta técnica es un inmunoblot consistente en un lisado de células infectadas por el VIH-1 en un cultivo celular continuo y parcialmente purificado por diferentes centrifugaciones después del lisado celular y separado en proteí-

nas virales según sus diferentes pesos moleculares. Estas proteínas virales son posteriormente transferidas electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa. Si existen anti-VIH-1 éstos podrán reconocer las proteínas virales de forma análoga a un EIA indirecto. Después de lavar y retirar los Ac no unidos a las tiras, se añade fosfatasa alcalina unida a un Ac frente a inmunoglobulina humana tipo IgG y se somete a incubación. Posteriormente se añade una solución que contenga una enzima capaz de generar color al reaccionar con los componentes del inmunocomplejo formado. El western-blot convencional generalmente detecta la presencia de Ac frente a las proteínas expresadas en los genes mayores *env*, *gag* y *pol* que codifican las proteínas de la envoltura, núcleo y enzima retrotranscriptasa, respectivamente.

Un suero fue considerado positivo por esta técnica cuando se encontró reactividad de cualquier intensidad al menos frente a una proteína codificada por cada uno de los genes mayores, y negativo en caso de ausencia de bandas. Para la finalidad de este estudio los resultados indeterminados fueron considerados negativos.

4.2.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó la prueba exacta de Fisher en tablas 2x2. En tablas de mayores dimensiones se aplicó el test de Chi cuadrado y Residuos Ajustados de Haberman. Los valores de P menores de 0.05 se consideraron indicativos de significación estadística.

RESULTADOS

5

5.1. Transmisión intrafamiliar no sexual del VHC

De los 177 contactos familiares no relacionados sexualmente con los casos índices, 10 (5.6%) fueron anti-VHC reactivos, mientras que sólo un donante voluntario de sangre presentó positividad para este anticuerpo, lo que representa una prevalencia del 0.5% en nuestra población control (Tabla IV). Estas diferencias alcanzaron significación estadística ($p=0.002$ por la prueba exacta de Fisher).

Tabla IV. Prevalencia de anti-c100-3 en los casos índices, contactos familiares no sexuales y donantes de sangre

GRUPOS	Nº TESTADOS	Nº "ANTI-VHC+	% "ANTI-VHC +
Contactos domésticos	177	10	5.6*
Donantes voluntarios	210	1	0.5*

* $P=0.002$ por la prueba exacta de Fisher.

** Técnica utilizada: EIA-1

La frecuencia con la que los contactos familiares compartían enseres de uso personal potencialmente contaminantes con el caso índice fue elevada: peine (71.2%), manicura (56.5%), cuchillas (36.7%), y cepillo de dientes (9.6%) (Tabla V). Sin embargo, ninguno de los parámetros epidemiológicos analizados como la edad y sexo de los contactos familiares, tiempo de convivencia y tipo de relación con el caso índice, se comportaron de forma distinta en familiares reactivos o no para anti-VHC, cuando ellos fueron individualmente analizados. (Figs. 5, 6, 7).

Tabla V. Enseres potencialmente contaminantes que los contactos domésticos no sexuales compartían con los casos índices

ENSERES POTENCIALMENTE CONTAMINANTES	CONTACTOS DOMÉSTICOS Nº (%)
Peine	126 (71.2)
Manicura	100 (56.5)
Cuchillas	65 (36.7)
Cepillo de dientes	17 (9.6)

Figura 5. Contactos domésticos no sexuales: parámetros epidemiológicos y reactividad para anti-VHC

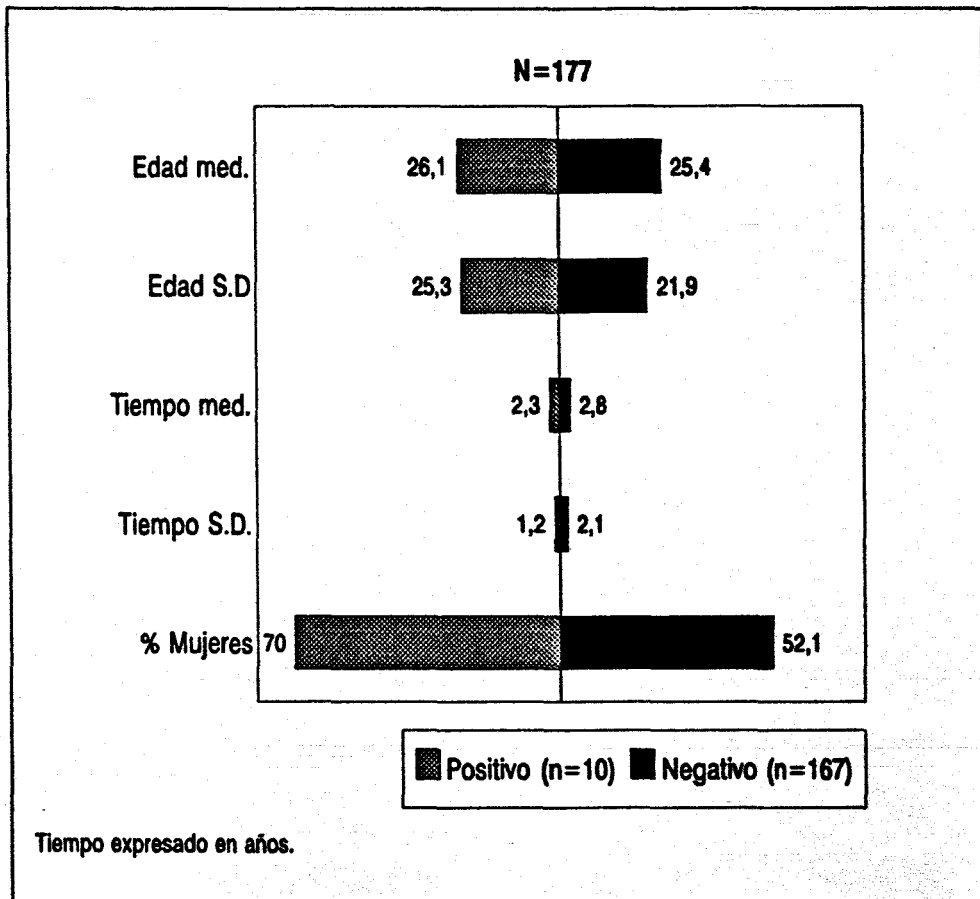


Figura 6. Tipo de parentesco de los contactos domésticos no sexuales con el caso y reactividad para anti-VHC

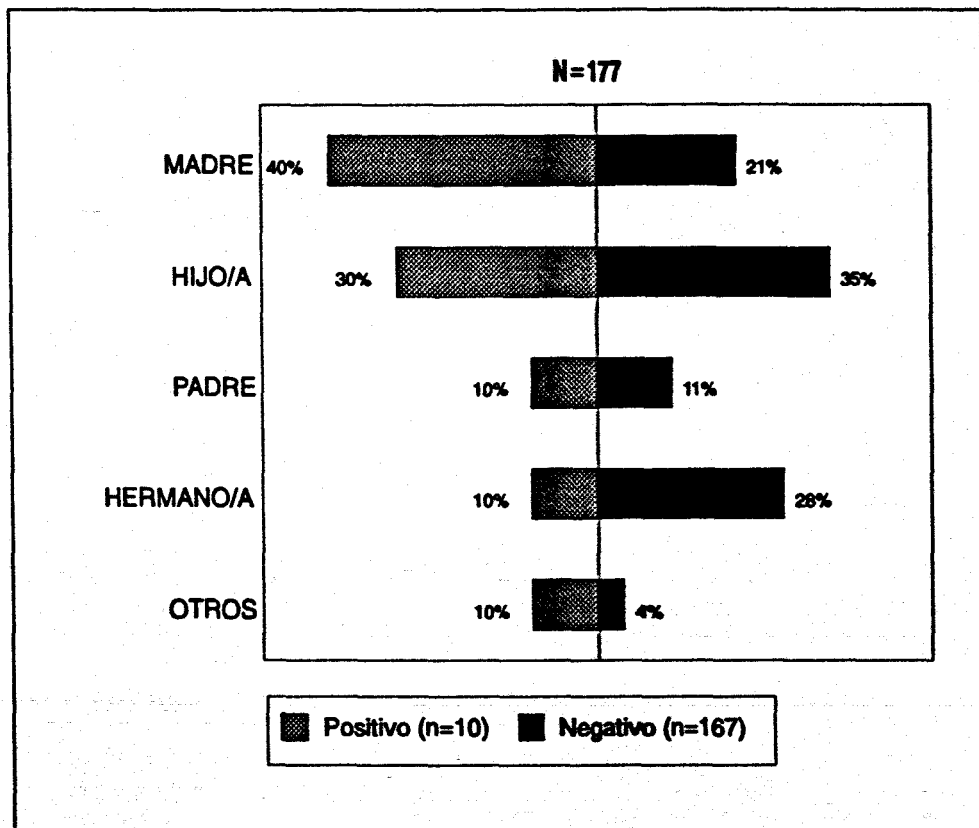
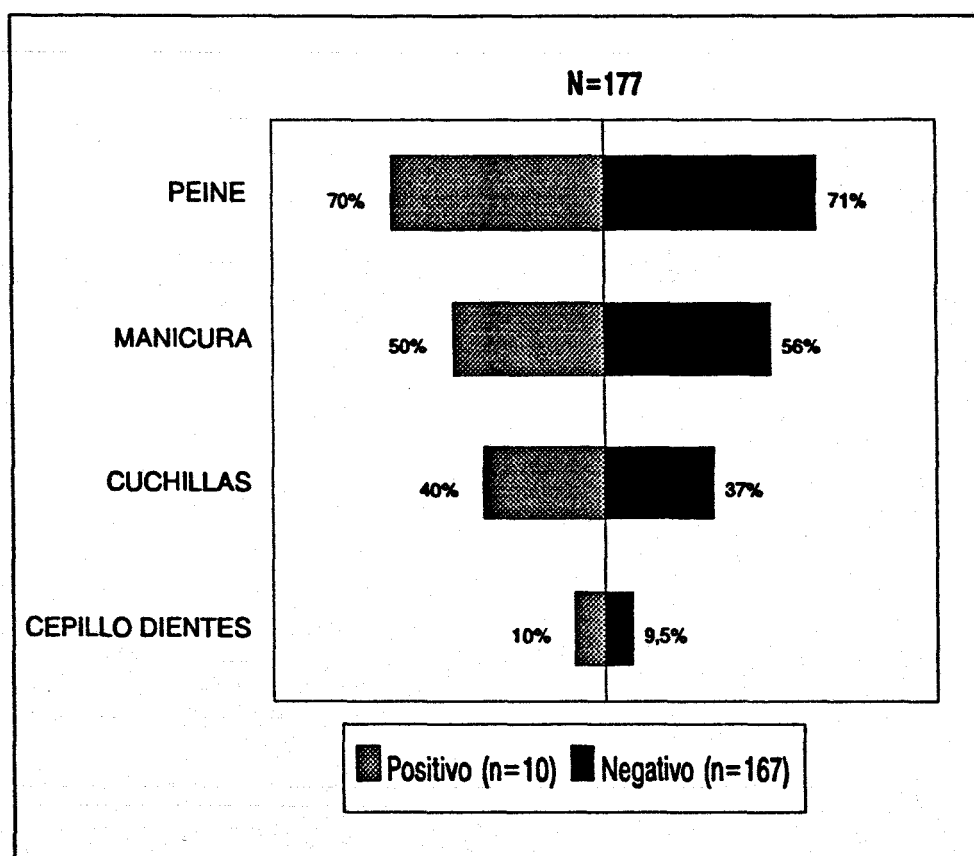


Figura 7. Enseres potencialmente contaminantes compartidos y reactividad para anti-VHC



5.2. Transmisión sexual del VHC

5.2.1. Prevalencia de anti-VHC en los grupos sexualmente promiscuos y grupo control

De los 566 sujetos sexualmente promiscuos estudiados, 33 (5.8%) fueron reactivos para anti-VHC por EIA-2 y confirmados por 4-RIBA incluyendo 20 sueros de 310 prostitutas (6.4%), 6 de 88 clientes de prostitutas (6.8%) y 7 de 168 varones homosexuales (4.2%). Por el contrario, solo 5 de los 400 donantes voluntarios de sangre (1.2%) fueron positivos para anti-VHC por EIA-2 y 4-RIBA. Las diferencias de prevalencias entre los distintos grupos sexualmente promiscuos estudiados y los donantes voluntarios fueron estadísticamente significativas ($p=0.002$) y analizando los residuos ajustados de Haberman, obtuvimos que estas diferencias eran motivadas por el grupo control de donantes de sangre (Tabla VI). No obstante, tanto los sujetos sexualmente promiscuos con positividad para anti-VHC como los no reactivos, se comportaron de forma homogénea en relación a los distintos parámetros epidemiológicos analizados como la edad, tiempo de prácticas sexuales promiscuas y número de parejas sexuales por año. (Figs. 8,9,10).

Tabla VI. Prevalencia de anticuerpos frente al VHC en grupos sexualmente promiscuos y donantes voluntarios de sangre

GRUPOS	Nº TESTADOS	Nº ANTI-VHC POSITIVO**	% ANTI-VHC POSITIVO**
Prostitutas	310	20	6,4
Heterosexuales promiscuos	88	6	6,8
Homosexuales	168	7	4,2
Donantes de sangre	400	5	1,2

Chi cuadrado = 14.786

* p=0.002

** Positivos por EIA-2 y 4-RIBA.

Figura 8. Parámetros epidemiológicos en prostitutas y reactividad para anti-VHC

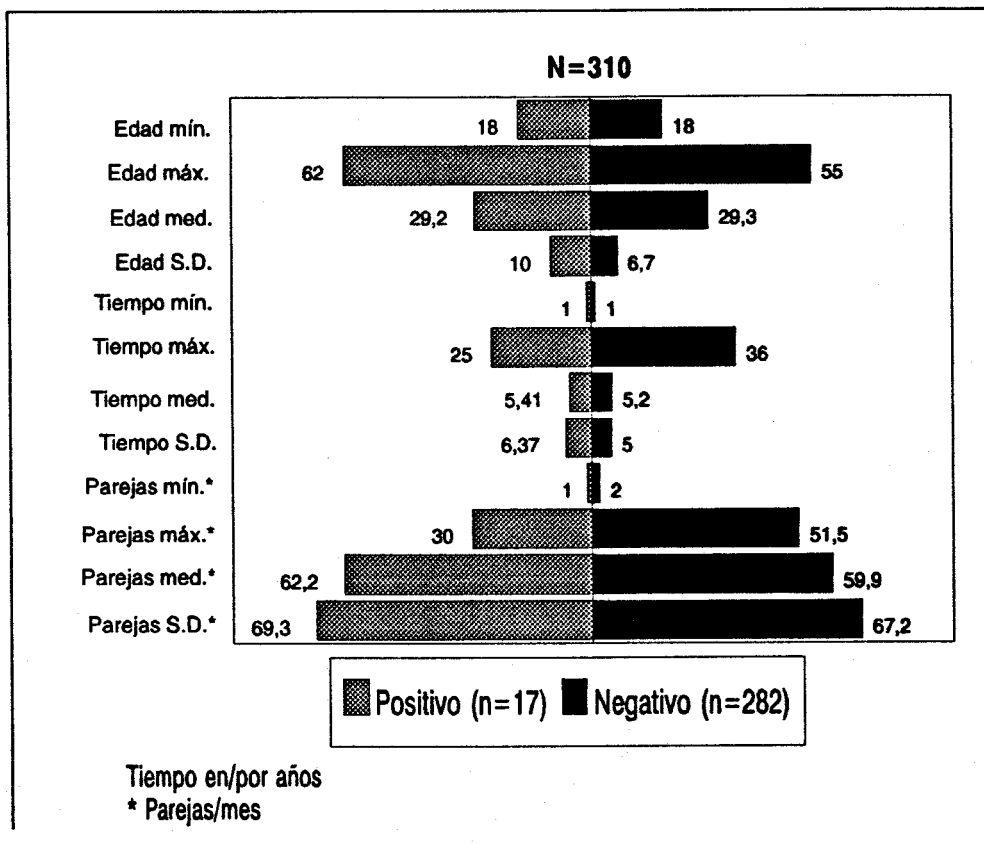


Figura 9. Parámetros epidemiológicos en clientes de prostitutas y reactividad para anti-VHC

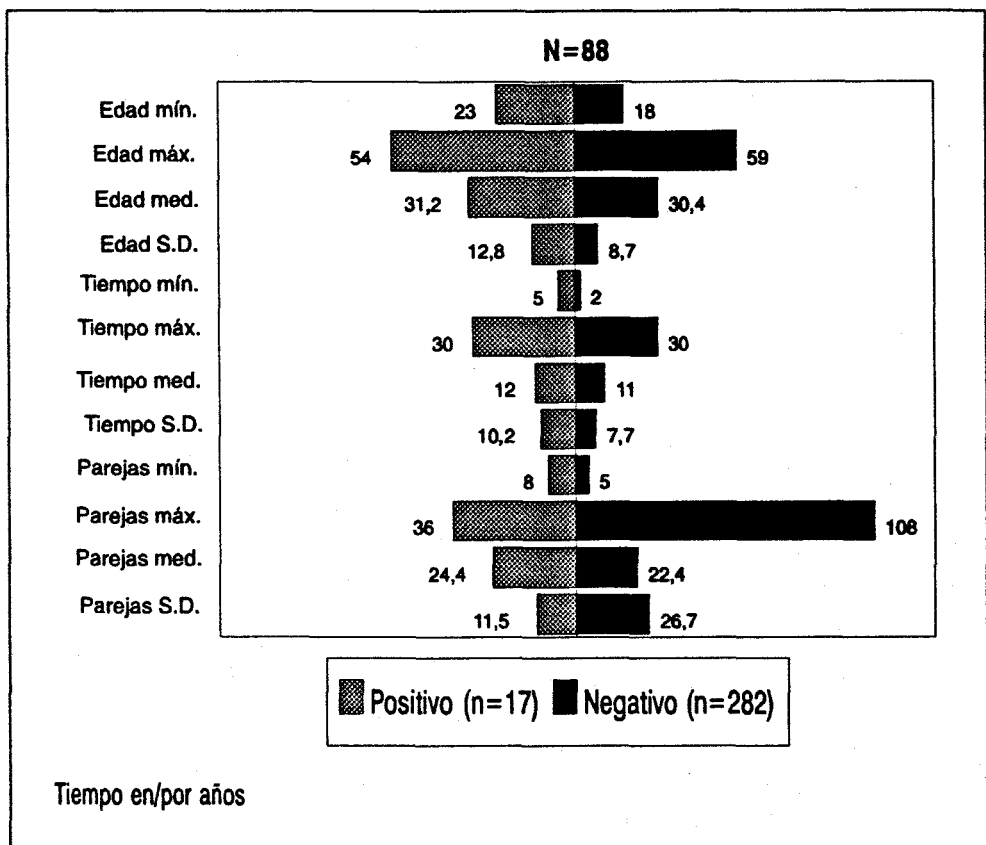
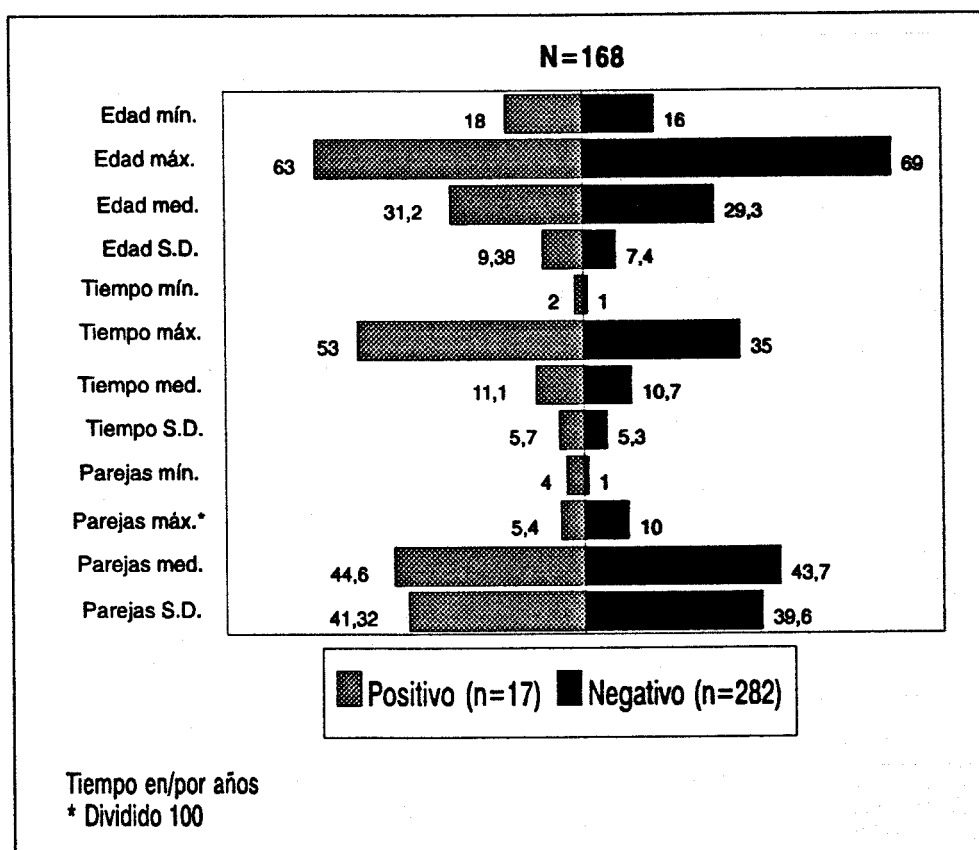


Figura 10. Parámetros epidemiológicos en varones homosexuales y reactividad para anti-VHC



5.2.2. Prevalencia de anti-VHC en las parejas heterosexuales estables de casos índices reactivos para anti-VHC y grupo control

Treinta (7.1%) de las 423 parejas heterosexuales de casos índices anti-VHC positivos, fueron reactivas para anti-VHC por las dos técnicas (EIA-2 y 4-RIBA), mientras que solo 34 de los 2886 (1.2%) fueron confirmados como reactivos para anti-VHC utilizando los mismos criterios. Las diferencias de las prevalencias entre las parejas sexuales estables y los donantes voluntarios de sangre alcanzaron significación estadística ($p < 0.001$) (Tabla VII).

Tabla VII. Prevalencia de anticuerpos frente al VHC en parejas sexuales estables y donantes voluntarios de sangre

GRUPOS	Nº TESTADOS	Nº ANTI-VHC POSITIVO*	% ANTI-VHC POSITIVO*
Parejas sexuales estables	423	30	7.1"
Donantes de sangre	2886	34	1.2"

* Positivos por EIA-2 y 4-RIBA.

** $p < 0.001$ por la prueba exacta de Fisher.

5.3. Prevalencia de anti-VHC en parejas heterosexuales estables de casos índices coinfectados o no por VIH

Ciento veintiuno (120 ADVP y un hemofílico) de los 423 casos índices anti-VHC reactivos, estaban también coinfectados por el VIH. La prevalencia de anti-VHC por EIA-2 y confirmada por 4-RIBA en las parejas heterosexuales estables fue al menos un 50% mas alta cuando el caso índice estuvo coinfectado por el VIH (9.1% frente a 6.3%; $p=0.2$) (Tabla VIII).

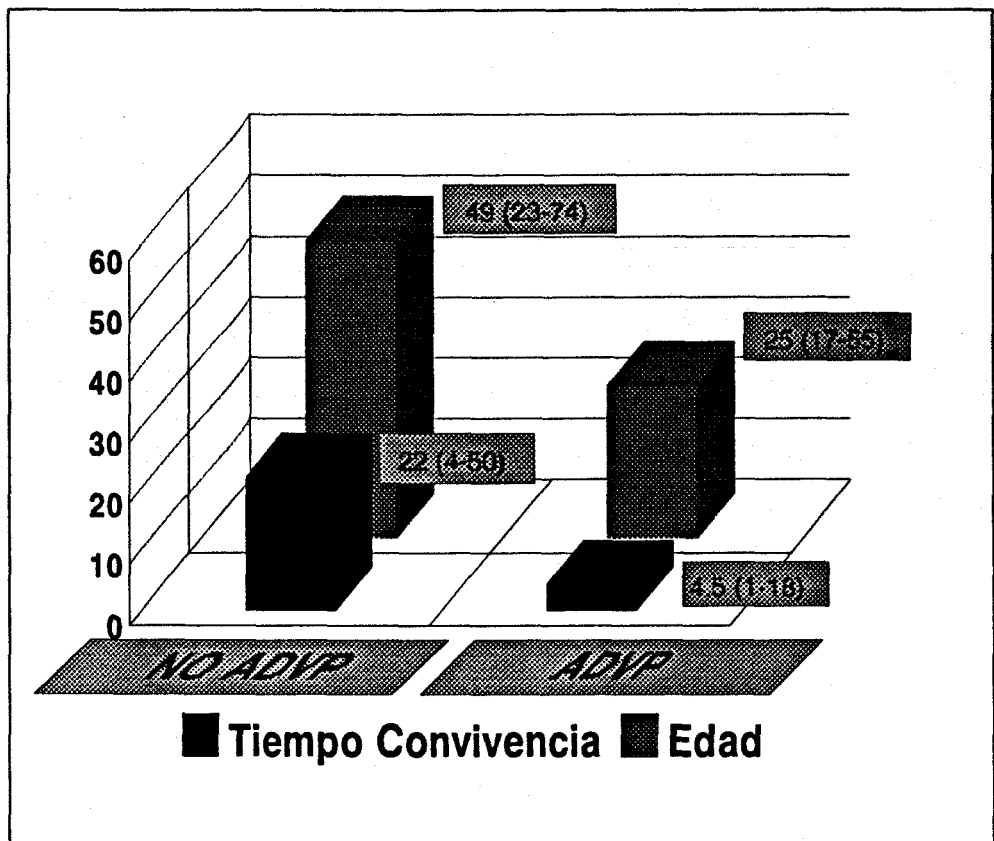
Tabla VIII. Prevalencia de anti-VHC en parejas heterosexuales estables de casos índices coinfectados o no por VIH

CASOS ÍNDICES	VHC +/VIH + (n=121)		VHC +/VIH - (n=302)	
	VHC +	VHC -	VHC +	VHC -
PAREJAS SEXUALES				
No (%)	11 (9.1)*	110 (90.9)	19 (6.3)*	283 (93.7)
Edad media (rango)	26 (20-36)	26 (17-55)	51 (24-74)	45 (17-74)
Exposición sexual media (rango)	5 (2-8)	5 (1-18)	25 (4-45)	19 (1-50)

* $p=0.2$ por la prueba exacta de Fisher

Sin embargo, observamos diferencias de edad y tiempo medio de convivencia entre las parejas de casos índices coinfectados y no coinfectados (Tabla VIII), lo que sugería que estábamos analizando dos poblaciones muy distintas no sólo en cuanto a edad y tiempo de convivencia sino probablemente también en cuanto a nivel socioeconómico, como son las parejas sexuales de casos índices ADVP y las parejas de casos índices con hepatitis crónica C postransfusional o esporádica (NO ADVP) (Fig. 11).

Figura 11. Edad y tiempo de convivencia en parejas sexuales según grupo de riesgo del caso índice



Por esta razón, analizamos separadamente al grupo más homogéneo epidemiológicamente de las parejas sexuales estables de individuos ADVP, con una edad y tiempo de convivencia similar y probablemente también con un estatus socioeconómico semejante. Ciento veinte de los 142 casos índices ADVP estuvieron coinfectados por el VIH y la prevalencia de anti-VHC en sus respectivas parejas fue de 9.2% en comparación con el 0% hallado en las parejas sexuales de casos índices ADVP sólo reactivos para anti-VHC (Tabla IX).

Por último, señalar que el 24.2% de las parejas heterosexuales de casos índices ADVP coinfectados por el VIH y VHC, fueron anti-VIH positivas comparadas con el 9.2% de reactividad para anti-VHC. En contraste, ninguna de las 22 parejas sexuales de casos índices ADVP anti-VIH negativos fue reactiva para anti-VHC o anti-VIH. (Tabla IX).

Tabla IX. Anti-VHC en parejas sexuales estables de ADVP infectados por VHC y coinfectados o no por VIH

CASOS ÍNDICES	VHC+/VIH+	VHC+/VIH-
PAREJAS SEXUALES n°	120	22
Anti-VHC +	11 (9.2%)*	0 (0%)*
Anti-VIH +	29 (24.2%)	0 (0%)
Edad media (rango)	25 (17-55)	23 (17-35)
Exposición sexual media (rango)	4.7 (1-18)	3.5 (1-9)

* p=0.1 por la prueba exacta de Fisher
Tiempo expresado en años.

5.4. Concordancia de la reactividad para anti-VHC por EIA-2 y 4-RIBA en colectivos sexualmente promíscuos y donantes de sangre

Las muestras reactivas para EIA-2 en prostitutas, clientes de prostitutas y donantes de sangre fueron concordantes con la técnica 4-RIBA en un 71.4%, 75.0% y 83.3% de los casos respectivamente, mientras que este porcentaje descendió a un 38.8% en los varones homosexuales. Estas diferencias alcanzaron significación estadística ($p=0,04$) y el análisis de los residuos ajustados de Haberman mostró que dichas diferencias eran motivadas por el grupo de varones homosexuales (Tabla X).

Tabla X. Concordancia de la reactividad para anti-VHC por EIA-2 y 4-RIBA en colectivos sexualmente promíscuos

GRUPOS EXPUESTOS	Nº	EIA-2 POSITIVO	4-RIBA POSITIVO**	PORCENTAJE CONCORDANCIA
Prostitutas	310	26	20	71.4%
Clientes de prostitutas	88	8	6	75.0%
Homosexuales	168	18	7	38.8%
Donantes	400	6	5	83.3%
Total	966	58	38	65.5%

Chi cuadrado= 8.308;

* $p = 0.04$

** Para el propósito de nuestro análisis, las muestras 4-RIBA indeterminadas se consideraron negativas.

DISCUSIÓN

6

Aunque la transmisión del VHC por exposición percutánea directa a sangre es un hecho bien documentado, en modo alguno permite explicar la epidemiología mundial de esta enfermedad ya que en aproximadamente la mitad de los casos de hepatitis NANB observados en la comunidad, no puede recogerse ningún antecedente de exposición parenteral tras una cuidadosa investigación^{90,98}. Una proporción de estos casos podría representar exposición percutánea no recogida en la historia clínica, bien porque el paciente niegue antecedentes previos de adicción a drogas intravenosas o porque ignore otras formas más sutiles de exposición percutánea. Sin embargo, esto no sería suficiente para explicar el gran porcentaje de episodios sin vía reconocida de exposición al virus; por lo que deben existir rutas inaparentes de transmisión del VHC que permanecen aún pobremente definidas.

En este sentido se ha especulado sobre diversas posibilidades de contagio, incluyendo la transmisión perinatal¹²⁸⁻¹³⁵; no obstante, una de las rutas alternativas que se han considerado con mayor interés y expectación en la propagación del VHC ha sido la vía de transmisión horizontal, tanto a través de las relaciones sexuales como de otros tipos de contacto persona-persona posibles en el ámbito familiar.

Las mayores evidencias epidemiológicas a favor de la transmisión intrafamiliar y sexual de la hepatitis NANB fueron comunicadas a principios de esta década antes del descubrimiento del VHC y derivan de estudios de casos y controles, en los que el análisis multivariante de datos epidemiológicos en pacientes con hepatitis aguda NANB, respecto a los controles, mostraban como única diferencia significativa el número de parejas sexuales en los seis

meses anteriores y tener un miembro de la familia o pareja sexual con historia de hepatitis²⁶. La reciente clonación del genoma del VHC⁴⁷, agente responsable de la mayoría de los casos de hepatitis NANB postransfusionales y esporádicos⁴⁹, y la disponibilidad de un ensayo serológico para investigar la presencia de anticuerpos frente a este virus⁴⁸, ha supuesto un paso crucial en el conocimiento de las hepatitis víricas y ha hecho posible la realización de numerosos estudios encaminados a valorar la importancia que la transmisión intrafamiliar y sexual puede representar como vía alternativa de difusión del VHC.

Observaciones preliminares han establecido prevalencias de anticuerpos frente al VHC en los familiares de pacientes con hepatopatía crónica y anti-VHC positivo más elevadas que las observadas en los donantes de sangre de la misma área geográfica. Kamitsuka y cols., en Japón¹³⁷ hallaron una prevalencia de anti-VHC del 9% en los convivientes de pacientes con hepatitis crónica NANB, cifra muy similar a la publicada por Ideo y cols (8%) en Italia¹³⁸, resultados posteriormente confirmados por otros autores^{139,147,155-158} y que parecían indicar la posibilidad de formas de contagio no bien identificadas entre los sujetos infectados y sus contactos familiares. Pese a ello, los trabajos publicados hasta la fecha resultaban a veces contradictorios, de tal manera que no en todos se ha podido demostrar la existencia de un mayor riesgo de infección en los contactos domésticos de pacientes con hepatitis crónica C analizados^{140,141-159,160}.

En nuestro estudio, evaluamos la posibilidad de transmisión intrafamiliar del VHC, analizando la presencia de anti-VHC en 177 contactos domésticos no relacionados sexualmente con casos in-

dices que presentaban un elevado riesgo para virasis de transmisión parenteral (drogadictos parenterales y hemofílicos) y con reactividad conocida para anti-VHC. Diez (5.6%) de los 177 convivientes testados presentaron anticuerpos frente al VHC, mientras que sólo uno (0.5%) de los 210 donantes voluntarios de sangre empleados como grupo control para este estudio resultó anti-VHC reactivo. Todos los convivientes negaron antecedentes de transfusión o adicción a drogas parenterales y se excluyeron los hijos de madres casos índices que hubiesen nacido antes de que esta presentara el factor de riesgo, para eliminar la posibilidad de transmisión perinatal del VHC.

Las diferencias de prevalencia de anti-VHC entre los contactos domésticos y el grupo control fueron estadísticamente significativas ($p=0.002$) y sugieren la posibilidad de formas de contagio en el entorno familiar no bien definidas hasta el momento. Es importante que entre nuestros convivientes y los casos índices el uso compartido de enseres capaces de producir inoculaciones inaparentes o encubiertas (peine, manicura, tijeras, cepillo de dientes) fue elevado. Esta circunstancia, sin embargo, fue similar entre los familiares infectados o no infectados, por lo que resulta difícil postular mecanismos de transmisión en este grupo, pudiéndose incluso interpretar este hecho como una característica propia de la población estudiada y un reflejo del bajo nivel socioeconómico de estas familias. Adicionalmente, no observamos un comportamiento distinto en relación con la edad, sexo, duración del contacto o tipo de parentesco con el caso índice entre los convivientes reactivos y los no reactivos para anti-VHC.

Estos resultados sugieren la posibilidad de transmisión intrafamiliar del VHC, pero también, una eficacia muy escasa para dicha vía. Es más, debiéramos ser cautelosos a la hora de interpretar los resultados obtenidos por diversas razones. Por un lado, las cifras de prevalencia halladas en los contactos domésticos no son lo suficientemente elevadas como para poder afirmar con seguridad que la transmisión horizontal no sexual del VHC sea una vía trascendente de difusión para este virus. Por otro lado, las comparaciones se establecen con donantes voluntarios de sangre, población que aunque en la mayoría de los estudios es empleada como grupo control y considerada representativa de la población general, en realidad constituye una muestra altamente seleccionada no sólo desde el punto de vista de su motivación inicial para donar sangre, sino por el propio proceso previo a la donación dirigido a descartar conductas de riesgo y antecedentes de hepatitis, y todo ello sin contar con muy probables diferencias de tipo socioeconómico y cultural. Un grupo control ideal sería aquel seleccionado aleatoriamente en relación a la edad y sexo y pertenecientes a la misma área geográfica, pero esto plantea grandes dificultades. En último lugar hemos de señalar que para el estudio de la transmisión horizontal intrafamiliar, solo pudimos aplicar el test de EIA-1, técnica hoy superada, pero la única disponible a la fecha en que esta parte del estudio fue ejecutada.

Por tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones, podemos decir, que si bien nuestros resultados sugieren que es posible la transmisión intrafamiliar no sexual del VHC, esta posibilidad estaría comprendida dentro de unos límites de baja eficacia y una posible explicación para ello, puede radicar en las reducidas tasas de virus circulante que habitualmente presentan los indivi-

duos infectados, circunstancia que dificultaría la capacidad de difusión del virus en el seno de la familia haciendo que este modo de transmisión no llegue a adquirir una gran relevancia.

Pero otro de los aspectos de la transmisión horizontal del VHC que mas han interesado en los adultos, y que nosotros hemos abordado en esta tesis doctoral, ha sido el papel que las relaciones sexuales pueden desempeñar en la diseminación de este agente. De hecho, numerosos trabajos han ido encaminados a valorar y definir la eficacia de la difusión a través de esta vía, habiéndose comunicado una prevalencia de anti-VHC en heterosexuales promiscuos (prostitutas o personas que acuden a clínicas para ETS) que oscila entre cinco y diez veces superior que la hallada en los donantes de sangre^{142,144-146,161,162}. Adicionalmente los anticuerpos anti-VHC están presentes en el 4%-15% de los varones homosexuales estudiados^{111,143,144,146,161-163}.

No obstante, la mayoría de estos trabajos se basan en la detección de anticuerpos frente al VHC por técnicas de EIA-1 y sin la aplicación de ensayos confirmatorios para validar los resultados. En nuestro estudio, examinamos primero, diversas poblaciones con alto riesgo para las enfermedades de transmisión sexual: prostitutas, varones no adictos que referían contacto sexual frecuente con prostitutas y varones homosexuales. Todos los sujetos incluidos en el estudio negaron antecedentes de adicción a drogas parenterales o transfusión sanguínea. La prevalencia de anticuerpos para el VHC realizado por EIA-2 y confirmado por 4-RIBA fue del 6.4% en prostitutas, 6.8% en varones heterosexuales promiscuos y del 4.2% en varones homosexuales. Estas cifras fueron significativamente diferentes al 1.2% de anti-VHC encon-

trado en el grupo control de donantes de sangre utilizado para este estudio.

Estos resultados ofrecen prevalencias de anti-VHC de 4 a 6 veces más altas en los grupos con promiscuidad sexual que en el grupo control, pero sin llegar a ser lo suficientemente elevadas como para indicar de modo concluyente que la transmisión sexual sea una vía eficaz de difusión del VHC. En primer lugar las prevalencias de anti-VHC en los grupos promíscuos son inferiores a las halladas para otros virus de conocida transmisión por vía sexual como el VHB y el VIH^{140,143,163}. En segundo lugar las comparaciones se establecen con donantes voluntarios de sangre, que como ya hemos comentado anteriormente, resulta una muestra ciertamente seleccionada. En un estudio realizado recientemente por los CDC el nivel socioeconómico se asociaba con una importante proporción de casos de hepatitis C⁸⁰. Garcia Bengoechea y cols¹⁶⁴. en nuestro país, han hallado en sujetos que acudían al servicio de urgencias de traumatología, o al hospital para análisis preoperatorio, unas cifras de anti-VHC del 1.7% excluyendo a los que tenían tatuajes o eran ADVP, y del 2,85% en la serie global. Es por tanto muy probable que la prevalencia en la población general sea más alta que en donantes voluntarios y se distancie menos de las tasas de anti-VHC halladas en los grupos con promiscuidad sexual. Las prevalencias altas de anticuerpos frente a otros virus como el VHB y el VIH entre poblaciones promíscuas, hace que la selección de controles no sea tan crucial como para el estudio de la infección por el VHC, cuyo menor predominio en estas poblaciones obliga a que la elección de controles tenga una importancia extraordinaria.

En nuestro estudio, tanto los sujetos sexualmente promiscuos con positividad para anti-VHC como los no reactivos resultaron muy similares en relación a los distintos parámetros epidemiológicos analizados como la edad, tiempo de practicas sexuales promiscuas y número de parejas sexuales por año por lo que no pudo establecerse relación entre tasa de infección y grado de promiscuidad sexual. El bajo número de sujetos anti-VHC positivos hallado en nuestras poblaciones puede haber limitado el potencial del estudio en este aspecto, siendo probablemente necesario ampliar las muestras de cada colectivo para alcanzar diferencias significativas en relación a parámetros relacionados con la conducta sexual como ya han objetivado algunos autores¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

Por otro lado hemos de tener en consideración que no todos los investigadores han hallado evidencias de transmisión sexual del VHC en las poblaciones estudiadas. Algunos autores como Esteban y cols. comprobaron una baja prevalencia de anticuerpos contra el VHC en varones homosexuales y en las parejas de pacientes drogadictos con anti-VHC positivo, por lo que sugirieron que la transmisión sexual no parecía jugar un papel importante en la difusión de la hepatitis C¹⁰⁰. Una conclusión semejante fue la obtenida por Everhardt y cols.¹⁴⁰, que no hallaron evidencias clínicas ni serológicas de infección por el VHC en las parejas sexuales estables de pacientes con hepatitis crónica anti-VHC positivo.

La discrepancia de los resultados obtenidos hasta el momento en torno a la transmisión sexual del VHC ha llevado a considerar la probable existencia de factores capaces de inducir estas divergencias. Una de las explicaciones posibles, podría radicar en la

variación individual de la infectividad y por tanto de la capacidad para transmitir el VHC. En este sentido se ha especulado sobre la influencia que la coinfección por el VIH podría ejercer en la difusión del VHC a través de la vía sexual.

En nuestro estudio examinamos a una amplia muestra de parejas heterosexuales estables de casos índices reactivos para anti-VHC. En total fueron analizadas 423 parejas heterosexuales estables procedentes de tres hospitales Españoles (Oviedo, San Sebastián y Sevilla) y la prevalencia de anti-VHC fue ahora comparada con la obtenida en 2886 donantes de sangre seleccionados aleatoriamente en las mismas áreas geográficas. Las parejas heterosexuales estables mostraron una prevalencia de anti-VHC que fue al menos seis veces mas alta que la obtenida para el grupo control de donantes (7.1% frente a 1.2%; $p < 0.001$). Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por otros autores¹³⁷⁻¹³⁹, y sugieren la posibilidad de transmisión del VHC a través de las relaciones sexuales aunque con las reservas ya indicadas en párrafos anteriores.

Adicionalmente, analizamos el posible rol de la coinfección por el VIH en la difusión del VHC y obtuvimos unos resultados de considerable interés. Ciento veintiuno de los 423 casos índices estaban coinfectados por el VIH y la presencia de anti-VHC en sus parejas fue mas alta que en la parejas de los casos índices solo reactivos para anti-VHC (9,1% frente a 6.3%; $p = 0.2$). Este hallazgo se objetivó con mayor relevancia cuando se analizaron exclusivamente a las parejas sexuales de drogadictos intravenosos, colectivo mas homogéneo epidemiológicamente en cuanto a edad, tiempo de convivencia y probablemente en estatus so-

cioeconómico, y en el que por otra parte, se concentraban la practica totalidad de los casos índices coinfectados. En este grupo, la prevalencia de anti-VHC fue de 9.2% en las parejas de individuos con infección coexistente por VIH frente al 0% en las parejas de individuos solo reactivos para anti-VHC. Hubo por lo tanto mas riesgo de adquirir la infección por VHC en presencia de coinfección VIH pero el hecho de que la población quedara ahora muy reducida pudo motivar que la fuerte tendencia hallada no llegara a alcanzar significación estadística ($p=0.1$). Una observación adicional fue que la prevalencia de anticuerpos frente al VIH llegó a ser del 24.2% en estas parejas.

Nuestros datos concuerdan con los hallazgos obtenidos en el trabajo de Eyster y cols.¹⁵¹ en el que las parejas sexuales de hemofílicos anti-VHC positivos coinfectados por VIH, mostraron mayor riesgo de adquirir el VHC, sugiriendo así, que la presencia del VIH podría facilitar la transmisión sexual del VHC. Una probable explicación para este hecho podría ser, que la deficiencia inmune asociada con la infección VIH permitiría una mayor replicación del VHC y con ello una mayor carga viral, facilitando así, la transmisión sexual de este agente. Apoyaría esta hipótesis, el estudio realizado por Simmond y cols.¹⁵² empleando técnicas de PCR, en el que detectan con mayor frecuencia RNA del VHC en sujetos coinfectados por VIH y VHC en comparación con aquellos que sólo eran reactivos para anti-VHC y también los resultados de estudios preliminares utilizando métodos de análisis cuantitativo del VHC¹⁵³.

Una clara observación que se desprende tanto de este estudio como del de Eyster y cols.¹⁵², es que el VIH difunde mas fácilmente

te a través de la vía sexual que el VHC. Nosotros hallamos que el 24.2% de las parejas de casos índices coinfectados fueron anti-VIH positivas comparado con el 9.2% de reactividad para anti-VHC. En el estudio de Eyster y cols¹⁵², donde los casos índice eran hemofílicos, las prevalencias de anticuerpos fueron de un 13% frente a un 3% para el VIH y VHC respectivamente. Esta baja transmisión del VHC probablemente refleja el hecho de que la mayoría de portadores del virus, poseen un título de partículas virales circulantes extraordinariamente bajo, como ya previamente fue demostrado en transmisión experimental a chimpancés¹⁶⁸. Por tanto aquellos factores capaces de incrementar el grado de viremia como la coinfección por VIH podrían incrementar la capacidad infectante de virus, facilitando la transmisión a través de las relaciones sexuales del VHC.

Finalmente es preciso comentar el elevado porcentaje de reactividad inespecífica para anti-VHC hallada en nuestros varones homosexuales en comparación con la objetivada en otros colectivos sexualmente promiscuos y en donantes de sangre, utilizando en todos los casos EIA-2 como técnica de cribaje y 4-RIBA como procedimiento de confirmación. Esta discrepancia ha sido escasamente destacada en la literatura¹⁶⁹⁻¹⁷¹ pese a su no desdeñable interés clínico y epidemiológico y nos llamó poderosamente la atención. Por ello y fuera ya de la metodología general propuesta inicialmente para esta Tesis Doctoral, decidimos verificar este punto mediante la aplicación de técnicas de PCR para el RNA del VHC en las muestras séricas de los varones homosexuales que resultaron reactivos para este agente por EIA-2. La superposición de los resultados obtenidos mediante 4-RIBA y PCR fue superior al 85%, lo que nos permitió confirmar la elevada tasa de falsa reac-

tividad anti-VHC hallada en este colectivo mediante EIA-2 comercial. La razón de este peculiar comportamiento, que en la actualidad estamos comenzando a estudiar con mayor profundidad, no es bien conocida. Sólo podemos adelantar hasta la fecha que, en nuestra experiencia, esta falsa reactividad no se relaciona de forma estadísticamente significativa con la positividad o negatividad para VIH de los varones homosexuales, así como con la presencia o ausencia de hipergammaglobulinemia. Sin embargo, falsas reacciones positivas para diferentes análisis serológicos y diversos trastornos inmunológicos han sido descritos entre grupos de riesgo para enfermedades de transmisión parenteral/sexual, así como en colectivos sometidos a repetidos estímulos antigénicos¹⁷²⁻¹⁷⁵, por lo que resulta razonable especular con la posible existencia de disturbios inmunológicos subyacentes y aún no bien conocidos en este colectivos que pudieran ser responsables de la alta tasa de falsa reactividad para anti-VHC aquí objetivada.

En definitiva y en un intento de integrar todas las observaciones expuestas podríamos concluir que si bien nuestros resultados parecen indicar que es posible la transmisión horizontal del VHC, en el entorno familiar, este mecanismo resulta poco eficaz como forma de contagio y aunque no hallamos observado que el uso común de determinados objetos potencialmente contaminables con sangre (cepillo de dientes, maquinilla de afeitarse, manicura, peine) sea un factor de riesgo de transmisión del VHC, parece aconsejable que se lleve a cabo una utilización personal e intransferible de los mismos entre los contactos domésticos y las personas infectadas. Otra conclusión que se desprende de nuestro estudio es que si bien es posible la transmisión del VHC a través del contacto sexual, esta vía parece escasamente relevante desde el

punto de vista epidemiológico, circunstancia que debe ser expresamente advertida a los interesados para su libre adopción o no de métodos de barrera. La eficacia de la transmisión sexual del VHC en presencia de coinfección VIH del caso índice, sin embargo, parece incrementarse de forma notable, presumiblemente en base a la mayor replicación y carga viral C de estos individuos, lo que determinaría una mayor potencia infectante de cualquier inóculo potencial. Por último, creemos que son necesarios nuevos estudios empleando ensayos confirmatorios para disminuir en lo posible los problemas de inespecificidad y definir más precisamente la verdadera tasa de infección por VHC en los grupos con riesgo para la transmisión sexual y especialmente para el colectivo colectivo de varones homosexuales en el que la aplicación de técnicas de alta especificidad podría arrojar cifras de infección más bajas a las descritas en los trabajos realizados hasta la fecha.

Considerando la importancia epidemiológica del VHC en la aparición de enfermedad hepática crónica y su posible responsabilidad en el desarrollo de carcinoma hepatocelular, así como la alta proporción de casos en los que se desconoce el modo de adquisición de la enfermedad, definir la magnitud del rol que el contagio a través de las relaciones sexuales u otros tipos de contacto persona-persona representa en la transmisión del VHC posee una extraordinaria aplicabilidad y utilidad práctica en el área sanitaria, puesto que permitirá el adecuado consejo epidemiológico y recomendar normas de profilaxis primaria como método fundamental de prevención y promoción de la salud, hasta disponer de una vacuna eficaz y segura frente al VHC.

CONCLUSIONES

7

- 1º-** La transmisión horizontal intrafamiliar no sexual del VHC parece posible aunque escasamente relevante, sobre todo si se considera que la población general de nuestra área podría soportar una tasa de infección superior a la hallada en donantes de sangre, población utilizada como control en este estudio.

- 2º-** Aunque hemos evidenciado una mayor prevalencia de anti-VHC en los grupos sexualmente promiscuos y en las parejas monógamas de casos índices reactivos para VHC, la escasa diferencia observada en las prevalencias en convivientes relacionados y no relacionados sexualmente, sugiere que la transmisión sexual de este virus aunque posible no es muy eficaz, sobre todo si se la compara con la mostrada por otros virus de conocida transmisión sexual como es el VIH.

- 3º-** Esta eficacia tiende a incrementarse de forma notable en presencia de coinfección por el VIH en el caso índice. Ello sugiere que la coinfección VIH facilita la transmisión del VHC a través de la vía sexual.

- 4º-** El alto nivel de reactividad inespecífica para el test de cribaje EIA-2 observadas en el colectivo de varones homosexuales, indica la necesidad de emplear imperativamente ensayos confirmatorios en este colectivo y sugiere que las verdaderas tasas de infección por VHC en los varones homosexuales podrían ser mas bajas a la descritas hasta el momento.

RESUMEN

8

Durante décadas la identificación del agente causal de la hepatitis NANB se resistió a los esfuerzos de un amplio número de investigadores en todo el mundo. Finalmente, en 1989 científicos de la Chiron Corporation en colaboración con el equipo del Dr. Bradley de los CDC⁴⁷, lograron clonar al agente responsable de la mayoría de los casos de hepatitis NANB postransfusionales y esporádicos⁴⁸, agente que fue denominado virus de la hepatitis C.

Aunque la transmisión del VHC por exposición parenteral es un hecho bien documentado, sólo permite explicar aproximadamente la mitad de los casos de hepatitis NANB observados en la comunidad⁸⁰⁻⁹⁸. Por ello, se ha especulado sobre la existencia de otras posibles rutas alternativas para la difusión del VHC. Entre ellas, la transmisión horizontal tanto a través de las relaciones sexuales como de otros tipos de contacto persona-persona posibles en el ámbito familiar, ha sido considerada una candidata a investigar de forma inexcusable.

Las mayores evidencias epidemiológicas a favor de este tipo de transmisión fueron comunicadas a principios de esta década, antes del descubrimiento del VHC, y derivan de estudios de casos y controles, en los que los análisis multivariante de los datos epidemiológicos de pacientes con hepatitis aguda NANB, mostraban respecto a los controles, como diferencias significativas vinculadas a un mayor riesgo de infección, la existencia de un mayor número de parejas sexuales en los seis meses previos al comienzo de la enfermedad y/o tener un miembro de la familia relacionado o no sexualmente, con historia de hepatitis²⁶. La disponibilidad de ensayos serológicos para investigar la presencia de anticuerpos frente a este agente, ha supuesto un paso crucial en el cono-

cimiento de las hepatitis víricas y ha hecho posible la realización de numerosos estudios encaminados a valorar la importancia que la transmisión horizontal puede representar como vía alternativa de difusión del VHC. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha resultan contradictorios y mientras algunos autores han sugerido la posibilidad de transmisión intrafamiliar o sexual del VHC^{137-139,142-150}, otros no han detectado enfermedad hepática ni datos serológicos indicativos de infección ni entre los convivientes de pacientes con hepatitis crónica C^{140,141}, ni en los grupos de promiscuos sexuales analizados¹⁰⁰.

Las razones de estas discrepancias son, probablemente, múltiples y tanto relacionadas con la selección de probandos y controles como dependientes de la tecnología utilizada en la investigación. Adicionalmente, y dado que el quantum de VHC circulante en los sujetos crónicamente infectados parece ser extraordinariamente bajo, se ha sugerido que factores capaces de incrementar la viremia podrían incrementar la eficacia de la transmisión de este agente. Esto podría ocurrir en los casos de coinfección del caso índice por VIH y VHC. Ello podría justificar, al menos en parte, las diferencias observadas en distintos estudios, en función de que la población analizada incluyera o no sujetos con o sin coinfección por el VIH.

Nosotros hemos abordado esta Tesis Doctoral con los objetivos de 1º) Evaluar la transmisión horizontal no sexual del VHC mediante un estudio de seroprevalencia de anti-VHC realizado en contactos domésticos de casos índices reactivos para anti-VHC. 2º) Analizar la eficacia de la transmisión sexual del VHC mediante estudio de seroprevalencia de anti-VHC en individuos con ele-

vada promiscuidad sexual (varones homosexuales, prostitutas y clientes de prostitutas) y en parejas sexuales estables de casos índices reactivos para anti-VHC. Como controles utilizamos donantes altruistas de sangre en primera donación. Adicionalmente, investigamos el papel de la coinfección VIH como posible modulador de la infectocontagiosidad del VHC en la transmisión sexual a las parejas sexuales estables.

Para el estudio de la transmisión intrafamiliar no sexual del VHC analizamos la presencia de anti-VHC en 177 contactos domésticos no relacionados sexualmente con casos índices reactivos para anti-VHC. Diez (5.6%) de los 177 convivientes testados presentaron anticuerpos frente al VHC, mientras que sólo uno (0.5%) de los 210 donantes voluntarios de sangre empleados como grupo control resultó anti-VHC positivo. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.002$). Aunque entre nuestros convivientes y los casos índices hubo un elevado uso compartido de enseres capaces de producir inoculaciones inaparentes o encubiertas (peine, manicura, tijeras, cepillo de dientes), este no fue distinto entre los infectados y no infectados, por lo que resulta difícil postular mecanismos de transmisión parenteral oculta vehiculada por enseres de este tipo. Tampoco observamos un comportamiento distinto en relación con la edad, sexo, duración del contacto o tipo de parentesco con el caso índice entre los convivientes reactivos y los no reactivos para anti-VHC.

Para evaluar la transmisión sexual del VHC examinamos a distintos grupos sexualmente promiscuos: 310 prostitutas, 88 varones no adictos que referían contacto sexual frecuente con prostitutas y 168 varones homosexuales. Todos negaron antecedentes

de adicción a drogas parenterales o transfusión sanguínea. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC realizado por EIA-2 y confirmado por 4-RIBA fue del 6.4% en prostitutas, 6.8% en varones heterosexuales promiscuos y del 4.2% en varones homosexuales. Estas cifras fueron significativamente diferentes a las obtenidas en un grupo control de donantes de sangre ($p=0.002$). Tanto los sujetos sexualmente promiscuos con positividad para anti-VHC como los no reactivos resultaron muy similares en relación a los distintos parámetros epidemiológicos analizados como la edad, tiempo de practicas sexuales promiscuas y número de parejas sexuales por año por lo que no pudo establecerse relación entre tasa de infección y grado de promiscuidad sexual. Es probable que para poner de manifiesto este aspecto se necesiten grupos poblacionales mucho mas amplios de los aquí utilizados, dada la escasa prevalencia de anti-VHC objetivada y las numerosas variables que pueden estar implicadas en esta forma de transmisión.

Adicionalmente examinamos a una amplia muestra de parejas sexuales estables de casos índices anti-VHC reactivos. En total fueron analizadas 423 parejas procedentes de tres hospitales españoles (Oviedo, San Sebastián y Sevilla). En ellas la prevalencia de infección por el VHC fue al menos seis veces mas alta que la obtenida para el grupo control de donantes (7.1% frente a 1.2%; $p<0.001$). Al investigar el rol que la coinfección por VIH en el caso índice podría jugar en la transmisión del VHC, encontramos que las parejas sexuales de casos índices coinfectados presentaron una prevalencia de anti-VHC mas elevada que las parejas sexuales de casos índices solo reactivos para anti-VHC (9,1% frente a 6.3%). Este hallazgo se objetivó con mayor relevancia (9.2%

versus 0%) cuando se analizó exclusivamente al colectivo más homogéneo en cuanto a edad, tiempo de convivencia y probablemente en nivel socioeconómico, de las parejas sexuales estables de individuos ADVP, colectivo en el que, por otra parte, se concentraba la práctica totalidad de los casos índices coinfectados por el VIH. Una observación adicional que deparó el estudio fue el hallazgo de una tasa de prevalencia de anticuerpos frente al VIH del 24.2% en estas mismas parejas.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Eyster y cols.¹⁵¹, y sugieren que la presencia del VIH podría facilitar la transmisión sexual del VHC. Una probable explicación para este hecho podría ser, que la deficiencia inmune asociada con la infección VIH permitiría la replicación del virus y el resultante mayor nivel sérico de partículas virales favorecería la transmisión sexual de este agente. Apoyaría esta hipótesis, el trabajo realizado por Simmondy cols¹⁵² utilizando técnicas de PCR, y los resultados preliminares de estudios que emplean métodos de análisis cuantitativo del VHC¹⁵³.

Finalmente, como hallazgo colateral en este estudio, observamos una alta tasa de discordancia entre EIA-2 y 4-RIBA en el grupo de varones homosexuales no observada en otros grupos de promiscuos sexuales ni en donantes de sangre. La realización de PCR para RNA del VHC mostró que esta discrepancia obedecía a reacciones inespecíficas del EIA-2, por lo que las verdaderas tasas de infección podrían ser mas bajas que las comunicadas hasta el momento. En base a ello, parece inexcusable la necesidad de emplear técnicas confirmatorias para anti-VHC en este colectivo.

En síntesis, nuestros resultados sugieren la posibilidad de transmisión horizontal intrafamiliar no sexual del VHC, aunque comprendida dentro de unos límites de escasa relevancia, sobre todo si se considera que la población general podría sufrir unas tasas de infección superiores a la objetivada en nuestra población control de donantes^{80,164}. Por otro lado aunque hemos evidenciado una mayor prevalencia de anti-VHC en los grupos sexualmente promiscuos y en las parejas sexuales monógamas de casos índices reactivos para VHC que en los donantes de sangre, la escasa cuantía de estas tasas en relación con la mostrada por otras virasís de transmisión sexual^{140,143,150,163}, y la escasa diferencia observada con la hallada en convivientes no relacionados sexualmente sugieren que si bien la infección por el VHC puede transmitirse por vía sexual, este mecanismo resulta poco eficaz. Esta eficacia, no obstante, parece incrementarse de forma notable en presencia de coinfección por el VIH en el caso índice. Por último, el alto nivel de reactividad inespecífica para el test de cribaje EIA-2 observado en el colectivo de varones homosexuales, indica la necesidad de emplear imperativamente ensayos confirmatorios en este colectivo y sugiere que las verdaderas tasas de infección por VHC en los varones homosexuales podrían ser más bajas a las descritas hasta el momento.

BIBLIOGRAFÍA

9

1. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen leukaemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541-546.
2. Alter HJ, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Schmidt PJ. Post-transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B-antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972; 77: 691-699.
3. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion associated hepatitis not due to hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-770.
4. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1978; 1: 459-463.
5. Tabor E, Gerety RJ, Drucker JA, y cols. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1978; 1: 463-466.
6. Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, y cols. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980; 2: 876-879.
7. Kane MA, Bradley DW, Shrestha SM, y cols. Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal: recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. *JAMA* 1984; 252: 3140-3145.

8. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis —Mexico. MMWR. 1987; 36: 597-602.
9. Bradley D, Andjaparidze A, Cook EH, y cols. Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. J Gen Virol. 1988; 69:731-738.
10. Alter MJ, Hadler SC, Francis DP, Maynard JE. The epidemiology of non-A, non-B hepatitis in the United State. In: Dodd RY, Barker LF, eds. Infection, Immunity, and Blood Transfusion. New York: Alan R. Liss, Inc.;1985:71-79.
11. Aach RD, Lander JJ, Sherman LA, y cols. Transfusion-transmitted viruses: interim analysis of hepatitis among transfused and non-transfused patients. In: Vyas GN, Cohen SN, Schmid R, eds. Viral hepatitis. Philadelphia: Franklin Institute Press, 1978: 386-396.
12. Tateda A, Kikuchi K, Numazaki Y, y cols. Non-B hepatitis in japanese recipients of blood transfusion: clinical and serological studies after the introduction of laboratory screening of donors blood for hepatitis B surface antigen. J Infect Dis 1979; 139: 511-518.
13. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, y cols. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. Lancet 1975; 2: 838-841.

14. Hernandez JM, Piqueras J, Carrera A, Triginer J. Posttransfusion hepatitis in Spain. A prospective study. *Vox Sang* 1983; 44: 231-237.
15. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Alling DW, Koziol DE. Donor transaminase and recipients hepatitis. Impact on blood transfusion services. *JAMA* 1981; 246: 630-634.
16. Stevens CE, Aach RD, Hollinger FB, y cols. Hepatitis B virus antibody in blood donors and the risk of Non-A, Non-B hepatitis in recipients. The Transfusion Transmitted Virus Study. *Ann Intern Med* 1984; 101: 733-738.
17. Aach RD, Szmunez W, Mosley JW, y cols. Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients. *N Engl J Med* 1981; 304: 989-994.
18. Koziol DE, Holland PV, Alling DW y cols. Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. *Ann Intern Med* 1986; 104: 488-495.
19. Alter HJ. Chronic consequences of non-A, non-B hepatitis. Seeff LB, Lewis JH, eds. *Current perspectives in hepatology*. New York: Plenum Medical Books, 1989:83-97.

20. Alter MJ, Gerety RJ, Smallwood LA, y cols. Sporadic non-A, non-B hepatitis: Frequency and epidemiology in an urban U.S. population. *J Infect Dis* 1982; 145: 886-893.
21. Esteban JI. Hepatitis postransfusional. Una asignatura pendiente. *Med Clin (Barc)* 1987; 89: 782-784.
22. Esteban R, Genesca J, Esteban JI. Hepatitis C. Epidemiology and prophylaxis. En: Rodés J, Arroyo V, eds. *Therapy in Liver Diseases*. Barcelona, Doyma, 1992; 25-32.
23. Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. I recognition, epidemiology, and clinical features. *Gastroenterology*. 1983; 85: 439-462
24. Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS, y cols. The changing epidemiology of non-A, non-B hepatitis in the United States: relationship to transfusions, abstracted. *Transfusion-Associated Infections and Immune Response*. 1988;III.1,p.14.
25. US Dept of Health and Human Services. *Hepatitis Surveillance Report 51*. Atlanta, Ga: Centers for Disease Control. 1987:19-22.
26. Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, y cols. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* 1989; 262: 1201-1205.

27. Tong MJ, Thursby M, Rakela J. Studies on the maternal-infant transmission of the viruses which cause acute hepatitis. *Gastroenterology* 1981; 80: 999-1004.
28. Guyer B, Bradley DW, Bryan JA, Maynard JE. Non-A, non-B hepatitis among participants in plasmapheresis stimulation program. *J Infect Dis* 1979; 139: 634-640.
29. Szmuness W, Stevens CE, Harley EJ, y cols. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med* 1980; 303: 833-841.
30. Bradley DW. Hepatitis C Virus: Background and Strategies for Cloning a Mayor Etiologic Agent of PT-NANBH. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 320-328.
31. Bradley DW, Cook EH, Maynard JE, y cols. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: Recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979; 3:253-269.
32. Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, y cols. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: A project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* 1978; 10: 60-68.

33. Bradley DW, Maynard JE, Popper H y cols. Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 1981; 143: 210-218.
34. Bradley DW, Maynard JE, Krawczynski K y cols. Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees infected with a factor VIII agent: Evidence of persistent hepatic disease. In Szmunes W, Alter HJ, Maynard JE (eds): "Viral Hepatitis 1981 International Symposium". Philadelphia: Franklin Institute Press, 1982, pp 319-329.
35. Wyke RJ, Tsiquaye KN, Thornton A, y cols. Transmission of non-A, non-B hepatitis to chimpanzees by factor-IX concentrates after fatal complication in patients with chronic liver disease. *Lancet* 1979; 1: 520-524.
36. Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. Non-A, non-B hepatitis: Ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979; 205: 197-200.
37. Bradley DW, Maynard JE, Popper H, y cols. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis: Physicochemical properties of two distinct agents. *J Infect Dis* 1983; 148: 254-265.
38. Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infection and Immunity* 1983; 41: 816-821.

39. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779.
40. Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri K y cols. Demonstration of two different types of non-A, non-B hepatitis by reinjection and cross-challenge studies in chimpanzees. *Gastroenterology* 1981; 81: 107-113.
41. Pfeifer U, Thomssen R, Legler K. Experimental non-A, non-B hepatitis: Four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees. *Virchows Archiv B Cell Pathology* 1980; 33: 233-243.
42. Bradley DW. Chapter 31. Transmission, etiology, and pathogenesis of viral hepatitis non-A, non-B hepatitis in non-human primates. In Chisari FV (ed): "Advances in Hepatitis Research." New York: Masson Publishing USA, 1984: 268-280.
43. Fields HA, Berninger M, Nath N y cols. Unrelatedness of factor VIII-derived non-A/non-B hepatitis and hepatitis B virus. *J Med Virol* 1983; 11: 59-65.
44. Fowler MJF, Monjardino J, Weller IV, y cols. Failure to detect nucleic acid homology between some non-A, non-B viruses and hepatitis B virus DNA. *J Med Virol* 1983; 12: 205-213.

45. Weiner AJ, Wang KS, Choo QL, Gerin JL, Bradley DW, Houghton M. Hepatitis delta cDNA clones: Undetectable hybridization to nucleic acids from infectious non-A, non-B hepatitis materials and hepatitis B DNA. *J Med Virol* 1987; 21: 239-247.
46. Bradley DW. The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *Journal of Virological Methods* 1985; 10: 307-319.
47. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
48. Kuo G, Choo QL, Alter HJ y cols. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
49. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Brit Med Bull* 1990; 46: 423-441.
50. Alter HJ. Descartes before the Horse: I Clone, Therefore I Am: The Hepatitis C Virus in Current Perspective. *Ann Intern Med* 1991; 115:644-649

51. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2057-2061.
52. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acid Res* 1989. 17: 4713-4730.
53. Choo QL, Richman K, Han J, Berger K, Lee C, Dong C, Gallejos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. The genetic organization and diversity of the Hepatitis C Virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-2455.
54. Kubo Y, Takeuchi K, Boonmar S y cols. A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acid Res* 1989; 17: 10367-10372.
55. Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biophys Res Com* 1990; 170: 1021-1025.
56. Houghton M, Richman K, Han J y cols. Hepatitis C Virus (HCV): A Relative of the Pestiviruses and Flaviviruses. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 328-333.

57. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW y cols. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute or chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-1500.
58. Bradley DW, Krawczynski K, Ebert JW y cols. Parenterally transmitted Non-A, Non-B hepatitis: virus specific antibody response patterns in hepatitis C virus infected chimpanzees. *Gastroenterology* 1990; 99: 1054-1060.
59. Garson JA, Tuke PW, Makris M y cols. Demonstration of viremia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis-C-virus-contaminated factor VIII concentrates. *Lancet* 1990; 336: 1022-1025.
60. Van der Poel CL, Reesink HW, Schaasberg W y cols. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet* 1990; 335: 558-560.
61. Esteban JI, González A, Hernández JM y cols. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Eng J Med* 1990; 323: 1107-1112.
62. Feinman SV, Berris B, Herst R. Anti-HCV in post-transfusion hepatitis: deductions from a prospective study. *J Hepatol* 1991; 12: 377-381.
63. Alberti A. Diagnosis of hepatitis C. Facts and perspectives. *J Hepatol* 1991; 12: 279-282.

64. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenic factor or false-positive result? *Lancet* 1990; 335: 258-259.
65. Dussaix E, Maggiore G, De Giacomo C, Mondelli M, Martres P, Alvarez F. Autoimmune hepatitis in children and hepatitis C virus testing. *Lancet* 1990; 335: 1160-1161.
66. Theilman L, Blazek M, Goeser T, Gmelin K, Kommerell B, Fiehn W. False-positive anti-HVC tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; 335: 1346.
67. Boudart D, Lucas JC, Muller JY, Le Carrer D, Planchon B, Harousseau JL. False-positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinaemia. *Lancet* 1990; 336: 63.
68. Menitove JE, Richards WA, Destree M. Early US experience with anti-HCV kit in blood donors. *Lancet* 1990; 336: 878.
69. Van der Poel, Cuypers HTM, Reesink HW y cols. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337: 317-319.
70. Van der Poel CL, Bresters D, Reesink HW y cols. Early Anti-hepatitis C Virus Response With Second-Generation C200/C22 ELISA. *Vox Sang* 1992; 62: 208-212.

71. Bresters D, Cuypers H.T.M., Reesink HW. Enhanced Sensitivity of a Second Generation ELISA for Antibody to Hepatitis C virus. *Vox Sang* 1992; 62: 213-217.
72. Wang JT, Wang TH, Lin JT, Sheu JC, Lee CZ, Chen DS. Improved Serodiagnosis of Posttransfusion Hepatitis C Virus Infection by a Second-Generation Immunoassay Based on Multiple recombinant Antigens. *Vox Sang* 1992; 62: 21-24.
73. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB y cols. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis: an analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991; 325: 1325-1329.
74. Craxi A, Fiorentino G, Di Marco V y cols. *Lancet* 1991; 337: 1354.
75. Weiner A, Kuo G, Bradley DW y cols. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335: 1-3.
76. Farci P, Alter HJ, Wong D y cols. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 98-104.
77. Garson JA, Tedder RS, Briggs M y cols. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 1419-1422.

78. Zanetti AR, Tanzi E, Zehender G y cols. Hepatitis C virus RNA in symptomless donors implicated in post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 336: 448.
79. Alter MJ, Sampliner RE. Hepatitis C: And miles to go before we sleep. *N Engl J Med* 1989; 321: 1538-1540.
80. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K y cols. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1.992; 327: 1899-1905.
81. Esteban JI, López-Talavera JC, Genescá J y cols. High Rate of Infectivity and liver Disease in Blood Donors With Antibodies to Hepatitis C Virus. *Ann Intern Med* 1.991; 115: 443-449.
82. Kühnl P, Seidl S, Stangel W, Beyer J, Sibrowski W, Flik J. Antibody to hepatitis C virus in German Blood donors. *Lancet* 1989; August 5: 324.
83. Janot C, Couroucé AM, Maniez M. Antibodies to hepatitis C virus in French blood donors. *Lancet* 1989; September 30:796-797.
84. Alter HJ. The hepatitis C virus and its relationship to the clinical spectrum of NANB hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol Suppl* 1990; 1: 78-94.

85. Sirchia G, Bellobuono A, Giovanetti A, Marconi M. Antibodies to hepatitis C virus in Italian blood donors. *Lancet* 1989; September 30: 797.
86. Watanabe J, Minegishi K, Mitsumori T y cols. Prevalence of anti-HCV antibodies in blood donors in the Tokyo area. *Vox Sang* 1990; 59: 86-88.
87. López-Talavera JC, Esteban JI, Hernández JM y cols. Evaluation of anti-HCV positive donors identified during routine screening. *J Hepatol* 1990; 11 (Suppl 2) 540.
88. Sánchez Tapias JM, Barrera JM, Costa J y cols. Hepatitis C virus infection in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Ann Intern Med.* 1990; 112: 921-924.
89. Sansonno D, Dammacco F. Antibodies to Hepatitis C virus in non-A non-B Post-Transfusion and Cryptogenetic Chronic Liver Disease. *Lancet* 1989; 2: 798-799.
90. Esteban R, Esteban JI, López-Talavera JC y cols. Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 413-415.

91. Mendenhall CL, Seeff L, Diehl AM y cols. Hepatitis B and C Serologic Markers: Relationship to Alcoholic Hepatitis and Cirrhosis. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 448-450.
92. Colombo M, Choo QL, Del Ninno E y cols. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 2: 1006-1008.
93. Bruix J, Calvet X, Costa J y cols. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 2: 1004-1006.
94. Miyamura T, Saito I, Yoneyama T y cols. Role of Hepatitis C Virus in Hepatocellular Carcinoma. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 559-562.
95. Kew MC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Hepatitis C virus antibodies in Southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1990; 335: 873-874.
96. Fong TL, Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Banks SM, Hoofnagle H. The Significance of Antibody to Hepatitis C Virus in Patients with Chronic Hepatitis B. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 447-448.

97. Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M y cols. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990; 335: 258-259.
98. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN y cols. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1.990; 264: 2231-2235.
99. Donahue JG, Muñoz A, Ness PM y cols. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 369-373.
100. Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L y cols. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1.989; 2: 294-296.
101. Rumi MG, Colombo M, Gringeri A, Mannucci PM. High prevalence of antibody to hepatitis C viurs in haemophiliacs with normal transaminase levels. *Ann Intern Med* 1.990; 112: 379-380.
102. Makris M, Preston FE, Triger Dr y cols. Hepatitis C antibody and chronic liver disease in haemophilia. *Lancet* 1.990; 335: 1117-1119.
103. Mannucci PM, Schimpf K, Bretler DB y cols. Low risk for hepatitis C in hemophiliacs given a high-purity, pasteurized factor VIII concentrate. *Ann Intern Med* 1.990; 113: 27-32.

104. Noel L, guerois C, Maisonneuve P, Verroust F, Laurian Y. Antibodies to hepatitis C virus in haemophilia. *Lancet* 1.989; 2: 560.
105. Shchwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM y cols. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of haemophilia A. *N Engl J Med* 1.990; 323: 1800-1805.
106. Teruel JL, Fernández Muñoz R, Gámez C y cols. Infección por el virus de la hepatitis C en enfermos tratados con hemodiálisis. *Med Clin (Barc)* 1.990; 95: 81-83.
107. Zeldis JB, Depner TA, Kuramoto IK, Gish RG, Holland PV. The Prevalence of Hepatitis C Virus Antibodies among Haemodialysis Patients. *Ann Intern Med* 1.990; 112: 958-960.
108. Schlipkoter U, Roggendorf M, Ernst G y cols. Hepatitis C virus antibodies in haemodialysis patients. *Lancet* 1.990; 335: 1409.
109. Yamaguchi K, Nishimura N, Fukuoka N y cols. Hepatitis C antibodies in haemodialysis patients. *Lancet* 1.990; 335: 1409-1410.
110. Roggendorf M, Deinhardt F, Rasshofer R y cols. Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet* 1.989; 2: 324-325.

111. Mortimer PP, Cohen BJ, Litton PA y cols. Hepatitis C virus antibody. *Lancet* 1.989; 2: 798.
112. Huemer HP, Prodinger WM, Larcher C, Most J, Dierich MP. Correlation of hepatitis C virus antibodies with HIV-1 seropositivity in intravenous drug addicts. *Infection* 1.990; 18: 122.
113. Tito L, Sánchez-Tapias JM, Barrera JM y cols. Infección por el virus de la hepatitis C en las enfermedades crónicas del hígado. *Gastroenterol Hepatol* 1.990; 13: 414-418.
114. Hernández ME, Brugera M, Puyuelo T, barrera JM, Sánchez-Tapias JM, Rodes J. Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol* 1.992; 16: 56-58.
115. Mitsui T, Iwano K, Masuko K y cols. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology* 1.992; 16: 1109-1114.
116. Pérez-Tallero E, Cilla G, Alcorta M, Elósegui ME y Sáenz-Domínguez JR. Bajo riesgo de adquisición del virus de la hepatitis C para el personal sanitario. *Med clín (Barc)* 1.992; 99: 609-611.
117. Centers for Disease Control. Protection against viral hepatitis. Non-A, non-B hepatitis. *MMWR* 1.990; 39 (RR-2): 23.

118. Sánchez-Quijano A, Pineda JA, Lissen E y cols. Prevention of post-transfusion non-A, non-B hepatitis by non-specific immunoglobulin in heart surgery patients. *Lancet* 1.988; 1: 1245-1249.
119. Klein RS, Freeman K, Taylor PE, Stevens CE. Occupational risk for hepatitis C virus infection among New York City dentists. *Lancet* 1.991; 338: 1539-1542.
120. Wang JT, Wang TH, Ling JT, Sheu JC, Lin SM, Chen DS. Hepatitis C virus RNA in saliva of patient with post-transfusion hepatitis C infection. *Lancet* 1.991; 337: 48.
121. Abe K, Kurata T, Sugitani M, Oda T. Experimental transmission of non-A, non-B hepatitis by saliva. *J Infect Dis* 1.987; 155: 1078-1079.
122. Dusheiko GM, Smith M, Sheuer PJ. Hepatitis C virus transmitted by human bite. *Lancet* 1.990; 336: 503-504.
123. De Luca M, Ascione A, Vacca C, Zarone A. Are health-care workers really at risk of HCV infection?. *Lancet* 1.992; 339: 1364-1365.
124. Wejstal R, Norkraus G. Chronic non-A, non-B hepatitis in pregnancy: Outcome and possible transmission to the off-spring. *Scandinavian Journal of Infectitious Diseases* 1.989; 21: 485-490.

125. Lapointe N, Michaud J, Pekovic D, Chausseau JP, Dupuy JM. Transplacental transmission of HTLV III. *N Engl J Med* 1.985; 312: 1325-1326.
126. Kosuhara K, Sonoda S, Takahashi K, Tokugawa K, Fukushi-ge J, Ueda K. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I): A fifteen-year follow-up study in Okinawa, Japan. *International Journal of Cancer* 1.987; 40: 755-757.
127. Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 1.975; 292: 771-774.
128. Stevens CE, Taylor PE. Perinatal and Sexual Transmission of Hepatitis C Virus: A Preliminary Report. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 407-410.
129. Fortuny C, Ercilla MG, Barrera JM. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus (HCV): A Prospective Study in Infants Born to HCV-seropositive Mothers. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 418-419.
130. Reesink HW, Wong VCW, Ip HMM, Van der Poel CL, Van Exel-Oehlers PJ, Leilie PN. Mother-to-infant transmission and hepatitis C virus. *Lancet* 1.990; 335: 1216-1217.

131. Thaler MM, Park CK, Landers DV y cols. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1991; 338: 17-18.
132. Wejstal R, Widell A, Mansson AS, Hermodsson S, Norkrans G. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1.992; 117: 887-890.
133. Reinus JF, Leikin EL, Alter HJ y cols. Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1.992; 117: 881-886.
134. Koff RS. The low efficiency of maternal-neonatal transmission of hepatitis C virus: How certain are we?. *Ann Intern Med* 1.992; 117: 967-969.
135. Giovannini M, Tagger A, Ribero ML y cols. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus and HIV-infections: a possible interaction. *Lancet* 1.990; 335: 1166.
136. Villarejos VM, Visoná KA, Eduarte CA, Porvost PJ, Hilleman MR. Evidence for viral hepatitis other than type A or type B among persons in Costa Rica. *N Engl J Med* 1.975; 293: 1350-1352.
137. Kamitsukasa H, Harada H, Yakura M y cols. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1.989; 2: 987.

138. Idéo G, Bellati G, Pedraglio E, Bottelli R, Donzelli T, Putignano G. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335: 353.
139. Bellobuono A, Zanella A, Petrini G, Zanuso F, Mozzi F, Sirchia G. Intrafamilial spread of hepatitis C virus. *Transfusion* 1991; 31: 475.
140. Everthart JE, Di Bisceglie AM, Murray LM y cols. Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. *Ann Intern Med* 1990; 112: 544-545.
141. Aguilar Reina J, Ferrer Ríos T, Torronteras R, Hernández A. Estudio de anticuerpos contra el virus C de la hepatitis (anti-VHC) en contactos domésticos de pacientes con hepatopatías crónicas y anti-VHC positivo. *Gastroenterol Hepatol* 1.990; 13: 160.
142. Hess G, Massing A, Rossol S y cols. Hepatitis C virus and sexual transmission. *Lancet* 1989; 2: 987.
143. Tor J, Llibre JM, Carbonell M y cols. Sexual transmission of hepatitis C virus and its relation with hepatitis B virus and HIV. *Brit Med J*. 1990; 301: 1130-1133.

144. Papaevangelou G, Roumeliotou A, Kotsianopoulou M, Kallinikos G, Papoutsakis G. Sexual Transmission of HCV. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams Wilkins; 1991: 420-421.
145. Mast EE, Darrow WW, Witte J y cols. Hepatitis C virus Infection Among Prostitutes: evidence for sexual transmission and protective efficacy of condoms. *Proceeding of the Third International Symposium on HCV*. Strasbourg, September 1991; abstract E52.
146. Sánchez Quijano A, Rey C, Aguado I y cols. Hepatitis C virus infection in sexually promiscuous groups. *J Infect Dis* 1990;9:610-612.
147. Pérez-Romero M, Sánchez-Quijano A, Lissen E. Transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1990;133:411.
148. Benamouzig R, Ezratty V, Chaussade S. Risk for hepatitis trough sexual contac. *Ann Intern Med* 1990;113:638.
149. Riestra S, Suarez A, Rodrigo L. Transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1.990; 113: 411-412.
150. Cilla G, Pérez-Trallero E, Iturriza M, Arrizabalaga J, Iribarren JA. Possibility of Heterosexual Transmission of Hepatitis C Virus. *J Infect Dis* 1991; 10: 533-534.

151. Eyster ME, Alter HJ, Aledort LM, Quan S, Hatzakis A, Goedert JJ. Heterosexual cotransmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med* 1991; 115: 764-768.
152. Simmonds P, Zhang LQ, Watson HG, et al. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs, and drug users. *Lancet* 1990; 336: 1469-1472.
153. Wright TL, Hollander H, Kim M y cols. Hepatitis C viremia in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients with and without AIDS (abstract). *Hepatology* 1.992; 336: 1469-1472.
154. Navarro MD, Pineda JA, Velasco MA, García de Pesquera F, Leal M, Lissen E. Recombinant EIA for anti-HIV testing is more specific than the conventional EIA. *Vox Sang* 1.988; 54: 62-63.
155. Riestra- Menéndez S, Rodríguez-García M, Sánchez-San Román F y cols. Intrafamiliar spread of hepatitis C virus. *Infection* 1.991; 19: 431-433.
156. Chiamonte M, Delaito M, Fabris P y cols. Household transmission of hepatitis C virus (HCV). *J Hepatol* 1.990; 12: 471.
157. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E y cols. Intrafamiliar transmission of hepatitis C virus in Japan. *J Med Virol* 1.991; 33: 114-116.

158. Calabrese G, Vagelli G, Guaschino R, Gonella M. Transmission of anti-HCV within the household of haemodialysis patients. *Lancet* 1991; 338: 1.466.
159. Primo J, González C, Miralles A, Hinojosa J. Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 1.990; 13: 430-431.
160. Luba D, Hsu H, Martin MC, Gregory PB, Greenberg HB, García G. Failure of transmission of hepatitis C through household or sexual contact. *Hepatology* 1.991; 14: 77A.
161. Riestra S, Rodríguez M, Palacios V y cols. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1.991; 13 (supl. 2): 64.
162. Lissen E, Sánchez-Quijano A, Leal M y cols. Sexual transmission of HCV and possible role of coexistent HIV infection in the index cases. *J Hepatol* 1.991; 13 (supl. 2): 44.
163. Melbye M, Biggar RJ, Wantzin P, Ksrogsgaard K, Ebbesen P, Becker NG. Sexual transmission of hepatitis C virus: cohort study (1981-9) among european homosexual men. *Br Med J* 1.990; 301: 210-212.
164. García Bengoechea M, Sarriguarte A, Emparanza JI y cols. La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en la población general. Seroprevalencia y factores de riesgo. *Gastroenterol Hepatol* 1.993; 16: 263-264.

165. Osmand DH, Charlebois E, Sheppard HW y cols. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1.993; 167: 66-71.
166. Morales MA, Pineda JA, Leal M y cols. Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en un colectivo de varones homosexuales. *Med Clin (Barc)* 1.993; 100: 50-52.
167. Pineda JA, Aguado I, Rivero A y cols. HIV-1 infection among non-intravenous drug user female prostitutes in Spain. No evidence of evolution to pattern II. *AIDS* 1.992; 6: 1365-1369.
168. Feinstone SM, Alter HJ, Dienes HP, Purcell HR. Studies on non-A, non-B hepatitis in chimpanzees and marmosets. In: Szmuness V, Alter HJ, Maynard JE (ed): *Viral hepatitis*, 1.981 International Symposium. Franklin Institute Press, Philadelphia, 1.982, p. 295-304.
169. Van der Poel CL, Reesink HW, Mauser-Bunschotten EP y cols. Prevalence of anti-HCV antibodies confirmed by recombinant immunoblot in different populations subsets in The Netherlands. *Vox. Sang.* 1.991; 61: 30-36.
170. Tedder RS, Gilson QJC, Loveday C y cols. Hepatitis C virus: evidence for sexual transmission. *B Med J* 1.991; 302: 1299-1302.

171. García Samaniego J, Enriquez A, Soriano V, Muñoz F. Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en sujetos VIH positivos de diferentes grupos de riesgo. *M Clin (Barc)* 1.992; 99: 357-358.
172. Cherubin CE, Millian SJ. Serologic investigation in narcotic addicts. *Ann Intern Med* 1968; 69: 739-742.
173. Brettler DB, Levine PH. Factor concentrates for treatment of hemophilia: wich one to choose? *Blood* 1.989; 73: 2067-2073.
174. Madhok R, Gracie A, Lowe GDO ky cols. Imaired cell mediated immunity in haemophilia in the absence of infection with human immunodeficiency virus. *B Med J* 1.986; 3: 363-370.
175. Novick DM, Brown DJC, Lok ASF, Lloyd JC, Thomas HC. Influence of sexual preference and chronic hepatitis B virus infection on T lymphocyte subsets, natural killer activity and suppressor cell activity. *J Hepatol* 1.986; 3: 363-370.