

Virus de la hepatitis C: estado actual. Avances y problemas en el diagnóstico. Transmisión en hemodiálisis

J García-Valdecasas, M. C. Bernal, F. García y S. Cerezo.
Hospital Clínico Universitario. Granada.

I. Antecedentes históricos

La primera noticia sobre la existencia de un virus productor de hepatitis transmitida por vía parenteral y diferente al VHB surge en 1974, cuando Prince y cols.¹ notifican que de 204 pacientes del New York Blood Center intervenidos de cirugía cardiovascular, en un 25 % se desarrolló una hepatitis postransfusional, la mayoría de ellos sin relación con el VHB, concluyendo que «una gran proporción de hepatitis post-transfusionales no están relacionadas con el VHB, por lo que se precisa la identificación de un nuevo tipo C de virus productor de dichas hepatitis». De un modo similar, Feinstone describió en 1975 la existencia de hepatitis postransfusional en un grupo de pacientes con cirugía cardíaca del National Institutes of Health². En ese mismo año, una editorial del *Lancet* introduce el término de hepatitis no A-no B para definir estas hepatitis postransfusionales, cuyo agente viral era desconocido, y, por tanto, el diagnóstico había que hacerlo por exclusión³.

Estas hepatitis postransfusionales no A-no B presentaban una distribución mundial y afectaban principalmente a ADVP, hemofílicos y hemodializados. La mayor parte de ellas cursaban de forma asintomática, pero en ocasiones se asociaban graves lesiones hepáticas, evolucionando un 20 % a cirrosis.

A comienzos del año 1982, mediante la utilización de métodos biológicos e inmunológicos, se inician los estudios para la identificación de este agente causal, y en 1988 se consigue el clonaje del virus utilizando suero de chimpancés que habían sido inoculados con concentrados del factor VIII humano que transmitían la hepatitis no A-no B; tras concentración y extracción del ácido nucleico, se realizó su transcripción a ADN. El ADN complementario resultante (ADNc) se clonó en *Escherichia coli* y se logró

la expresión del ADNc en un polipéptido. Se demostró que el clon 5-1-1 obtenido codificaba un antígeno capaz de unirse con anticuerpos circulantes de individuos gravemente infectados por el virus no A-no B. Ello permitió realizar una técnica de ELISA que detectaba anticuerpos en personas infectadas⁴. El nuevo agente descubierto fue denominado virus C de la hepatitis (VHC).

2. Etiología

En el momento actual sabemos que el VHC es un virus ARN de 30-34 nm, con envoltura lipoproteica que se destruye por calor, disolventes lipídicos, formol y exposición a rayos ultravioleta. Su coeficiente de sedimentación es aproximadamente 200 S⁵ y su densidad de 1,09-1,11 g/cc en cloruro de cesio. Su genoma es ARN monocatenario de polaridad positiva, y está constituido por aproximadamente 9.700 nucleótidos. Comparte la organización genómica de los miembros de la familia de los Flavivirus; por ello, taxonómicamente se incluye en la familia *Flaviviridae*, si bien muestra diferencias con los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*⁶. No presenta ningún tipo de analogía con los *Retrovirus*, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis D.

3. Organización genómica

Este virus contiene una sola región translacional o región de lectura abierta (ORF), que abarca casi su totalidad y codifica una poliproteína precursora de 3.010-3.011 aminoácidos⁷.

Precediendo al ORF, en su extremo 5' existe una región de 324-341 nucleótidos, que se denomina 5' no codificante (5'UTR), cuya secuencia está altamen-

Correspondencia: Dr. J García-Valdecasas.
Hospital Clínico Universitario.
Servicio de Nefrología.
Granada.

te conservada entre los distintos aislados del VHC, con una homología superior al 98 %, por lo que se piensa que puede jugar un papel importante en la regulación de la replicación vírica. Es decir, es donde probablemente se encuentra el lugar de acción de la ARN-polimerasa. Aquí se controla la síntesis de la poliproteína de la que derivan las distintas proteínas víricas⁸. En el extremo 3' del genoma puede existir una cola de poliadenina que implica que el ARN vírico puede servir como ARN mensajero⁹.

La poliproteína codificada origina las diferentes proteínas individuales por la acción combinada de proteasas virales y celulares¹⁰. Estas proteínas proceden de las diferentes regiones del genoma e incluyen las proteínas que forman parte de la estructura del virión, que son el producto del gen C (core) y E1 y E2/NS1 (envoltura). Las proteínas no estructurales (NS) implicadas en la replicación del VHC son procesadas por el extremo 3' y son el producto de los genes NS2, NS3, NS4 y NS5¹¹ (fig. 1).

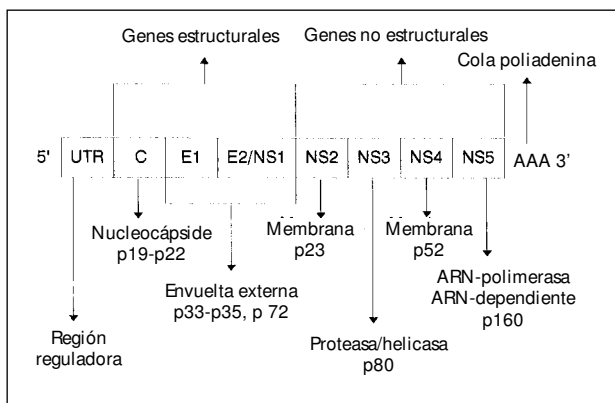


Fig. 1. – Esquema del genoma y de las proteínas del VHC.

Las proteínas codificadas son: la región C codifica una proteína de 19-22 kD (p19-p22), relacionada con la nucleocápside¹²; las dos proteínas glicosiladas de envoltura están codificadas por las regiones génicas E1 y E2 (también denominada región E2/NS1). E1 codifica una glicoproteína de 190 aminoácidos y Pm 33-35 kD, y E2 codifica una glicoproteína de 72 kD, que se caracteriza por presentar un dominio hipervariable, con un grado muy elevado de heterogeneidad y que desempeña un importante papel en la respuesta inmune frente a las células infectadas¹³. El resto del genoma codifica las proteínas no estructurales, NS2 codifica la p23 y NS4 la p52, de las que no se conoce con exactitud su actividad, aunque al ser hidrofóbicas podrían estar asociadas a membranas celulares e incluso a replicación vírica. La región génica

NS3 codifica la p80, con una acción de proteasa-helicasa que dirige la síntesis de la proteasa vírica¹⁴ y la región NS5 codifica la p160 o ARN polimerasa-ARN dependiente.

4. Heterogeneidad genómica

Como todos los virus ARN, es un virus con una alta frecuencia de mutación, es decir, presenta una gran heterogeneidad genómica (diferencias en la secuencia de nucleótidos). Su secuenciación genómica ha revelado la existencia de grandes diferencias entre los clones de aislados víricos de distintas regiones geográficas, de diversos individuos dentro del mismo área y entre aislados del mismo paciente a lo largo de la infección e incluso dentro de una misma cepa.

El grado de variabilidad no es homogéneo dentro de todo el genoma. Las regiones más conservadas son 5' UTR, C, NS3 y NS4. Por el contrario E1, E2/NS1, NS2 y NS5, son las regiones en las que se demuestra una mayor variabilidad entre los aislados¹⁵. Existe una región hipervariable en los genes E2/NS1 que difiere incluso entre los virus del mismo genotipo, presentando hasta un 51 % de diferencias entre los distintos aislados¹⁶. Esta región induce la aparición de anticuerpos neutralizantes y su hipervariabilidad es consecuencia del escape inmunológico durante el curso de la infección crónica. Se postula que la selección inmune de estas variantes puede ser uno de los mecanismos de la infección persistente por VHC, lo cual podría explicar la elevada frecuencia de cronicidad¹⁷.

Como consecuencia de la elevada tasa de mutación espontánea del VHC, en las personas infectadas el virus no se puede identificar como una secuencia única, sino que está constituido por una secuencia mayoritaria o secuencia consenso, acompañada de un amplio espectro de secuencias mutantes¹⁸. Esta característica es lo que se denomina «cuasi-especie», que podría asimismo estar implicada en la elevada persistencia del virus y en las fluctuaciones que se producen en la hepatitis crónica.

La caracterización molecular de aislados del VHC procedentes de distintos portadores ha permitido distinguir diferentes genotipos virales. Los genotipos son diferentes a los mutantes, que, al igual que ocurre con el VHB, son inestables e incrementan individualmente en el curso de la enfermedad crónica. Los genotipos son formas más estables del virus y parece que se originan durante largos períodos de tiempo. Actualmente se acepta la clasificación de los mismos propuesta por Simmonds en 1993¹⁹ en 6 genotipos mayores, que se numeran del 1 al 6, y una serie de subtipos que se identifican con letras minúsculas (a, b, c), en base a su homología en las secuencias de

ácidos nucleicos mediante análisis de la región NS5. Cuando se identifica un nuevo aislado de VHC y se secuencia su genoma, se incluye como un nuevo genotipo cuando tiene una homología inferior al 72 % con los ya existentes, y como nuevo subtipo si hay una homología entre el 72-85 %.

5. Poder patógeno

En el momento actual se desconoce si el daño hepático producido por el VHC depende de la capacidad citopática de éste, si está mediada por el sistema inmune o si intervienen ambos conjuntamente. Lo que actualmente está más admitido es que la lesión hepatocelular está producida por linfocitos T citotóxicos (CD8+)²⁰, siendo probable que el mecanismo patogénico se deba a una compleja interacción entre la infección vírica y la inmunorrespuesta del huésped.

Los conocimientos sobre los mecanismos de replicación del VHC son muy limitados, pero está claro que el virus no utiliza en su replicación ningún intermediario de ADN ni se integra en el genoma del huésped. Se propone que el virus replica a través de un intermediario de ARN de sentido negativo²¹ que se ha detectado en hígado y células mononucleares de sangre periférica. Este hecho nos indica que el VHC es hepatotropo y linfotropo²².

6. Cuadro clínico

Tras un período de incubación variable, que oscila de quince días a seis meses (media de dos meses), la infección produce una sintomatología común a todas las hepatitis, con frecuentes formas inaparentes, raros casos de fulminantes y elevada tendencia a la cronicidad. Esta cronicidad llega a ser del 50-85 % en las formas postransfusionales, bien como hepatitis crónica activa, persistente o cirrosis, existiendo una clara relación con el hepatocarcinoma²³. La resolución del cuadro tiene lugar en el 20-30 % de los casos y un 20-30 % permanecen como portadores. Debido al curso generalmente asintomático de la infección y a las fluctuaciones de las transaminasas, es difícil demostrar la curación de la enfermedad. Se ha demostrado que existe viremia con transaminasas normales, e incluso en pacientes que han eliminado los anticuerpos.

Los estudios realizados al respecto en nuestro entorno²⁴⁻²⁷ muestran que el 75 -90 % de los pacientes dializados con positividad al VHC presentan hepatitis crónica, siendo la mayoría de los casos hepatitis crónica activa, y que de ellos el 20-25 % suelen

evolucionar a cirrosis. Estos datos demuestran la importancia de este agente viral en la morbilidad y mortalidad de estos pacientes. Sin embargo, la repercusión que esta infección tiene sobre la evolución del injerto renal difiere del período estudiado²⁸: durante el período postoperatorio el curso clínico de la hepatopatía por virus C no se ve modificado ni por el tipo ni por la dosis de la droga inmunosupresora utilizada, pero a largo plazo (más de cinco años), aunque se observa que aproximadamente el 60 % de los trasplantados con positividad al virus C continúan asintomáticos, el restante 40 % (tuvieran o no enfermedad hepática crónica previa al trasplante) empeoran y agravan su lesión hepática. Los estudios preliminares han mostrado que el tratamiento con Interferón alfa no solamente es ineficaz en estos pacientes trasplantados, sino que incluso puede ser motivo de rechazo.

7. Diagnóstico

Ante la imposibilidad de cultivar el virus, el diagnóstico de infección se realiza mediante la detección de anticuerpos séricos, ya que el VHC posee numerosos epítomos inmunológicos, tanto en proteínas estructurales como en no estructurales. Sin embargo, en el momento actual no existe un patrón inmunológico que permita discernir entre los pacientes con infección actual de aquellos que han curado.

El diagnóstico de infección por VHC se puede realizar por métodos serológicos, que detectan la presencia de anticuerpos en suero, o por técnicas de biología molecular, que permiten detectar la presencia de ARN del VHC en suero u otras localizaciones, tales como las células mononucleares de sangre periférica y células hepáticas.

7.1. Estudio de anticuerpos IgG

Las primeras investigaciones demostraron que el clon 5-1-1 codificaba un epítomo o epítomos dominantes e inmunológicos, capaces de unirse a los anticuerpos circulantes presentes en individuos infectados de VHC. Por ello se seleccionó la región NS4 de la poliproteína del VHC para el montaje de una prueba enzimática. Para este fin se solaparon los clones 5-1-1, 81, 36 y 32, creando el antígeno c-100; posteriormente este antígeno se expresó en levaduras recombinantes mediante la fusión del c-100 con el gen humano que codifica la superóxido dismutasa (SOD), obteniéndose el antígeno c100-3, de naturaleza peptídica.

Este péptido (c100-3) contiene unos epítomos que

vienen a representar el 12 % de la poliproteína codificada por el VHC y fue el antígeno utilizado en el test ELISA de primera generación²⁹. Su utilización supuso un enorme avance en el diagnóstico de infección por VHC, pero se obtuvieron numerosos falsos negativos, ya que, por un lado, algunos individuos no elaboran anticuerpos frente a c100-3, y por otro, el tiempo que transcurre para la seroconversión al c100-3 es muy variable, oscilando de cuatro a treinta y dos semanas (media de tres meses tras la infección)³⁰. Por ello, para diagnosticar infección por VHC con esta técnica era necesario probar muestras secuenciales al menos durante seis a nueve meses. Estos falsos negativos eran más frecuentes en pacientes tratados con Interferón, en el 25 % de donantes de sangre y en el 10 % de pacientes con hepatitis crónicas³¹. Por otro lado, se observaron falsos positivos hasta en el 30 % de individuos de áreas endémicas y en el 80 % de áreas de baja prevalencia. Los pacientes tratados con técnicas de diálisis tampoco escaparon a esta falsa negatividad y/o positividad; son numerosos los trabajos publicados en nuestro medio donde se describen elevados porcentajes de falsos negativos, con cifras cercanas al 25 %^{32,33}, así como un 5-10 % de falsos positivos³⁴.

Con objeto de mejorar la sensibilidad y especificidad se diseñaron técnicas inmunoenzimáticas de segunda generación, que utilizan antígenos representativos de distintas regiones estructurales y no estructurales del genoma viral, con lo cual se consigue disminuir el número de falsas positividades y negatividades. Todas incluyen antígenos del Core y de las regiones NS3 y NS4, que al ser las más inmunógenas producen una mejor respuesta de anticuerpos. Con estos nuevos antígenos se acortó el período ventana a 8 semanas, permitiendo detectar un 10-20 % más de hepatitis agudas, lo que reduce el número de falsos negativos³⁵, pero se pueden producir falsos positivos en pacientes con hepatitis crónica autoinmune o en hipergammaglobulinemias. Tras utilizar estas técnicas, la prevalencia de anticuerpos entre los pacientes dializados aumentó 1,2 a 3,8 veces frente a la obtenida con técnicas de primera generación.

En el momento actual, las técnicas de inmunoenzimoensayo utilizadas son de tercera generación, que incluyen péptidos de la región NS5 además de las ya mencionadas.

Cualquiera que sea el método EIA utilizado, las reactividades no específicas pueden ser frecuentes. Por ello se recomienda que las muestras positivas se analicen con otra técnica suplementaria de inmunoblot recombinante o dot-EIA, que detecta anticuerpos frente a las distintas proteínas o péptidos aislados del VHC³⁶. Los antígenos que se utilizan más frecuentemente en las distintas técnicas suplementarias son:

de la región C, el c22-3 y NC450; de E1, el gp33; de E2/NS1, el gp70; de NS3 el c33-c; de la región NS4 se utiliza su epítipo inmunodominante 5-1-1, que, como ya se ha comentado, solapado con los clones 81, 36 y 32 (parte de ellos de NS3) dan lugar al c100-3, así como la proteína c200 resultante del c33-c más c100-3. La técnica suplementaria inmunoblot RIBA de segunda generación ha sido considerada como la más sensible y específica para detectar la presencia de anticuerpos frente al VHC, pero últimamente, con el fin de mejorar la sensibilidad de éste, se ha comercializado el RIBA de tercera generación, que incluye la detección de anticuerpos frente a la región no estructural NS5. El criterio de positividad viene dado por la presencia de anticuerpos frente a dos o más antígenos representativos, y se consideran indeterminadas las muestras que sólo reaccionan a un solo antígeno. Este criterio es válido en pacientes no inmunocomprometidos, pero en pacientes en diálisis con positividad aislada a un péptido viral por técnica suplementaria hemos de ser muy cautos a la hora de valorarlos como seronegativos, sobre todo si de ello depende el tomar alguna medida preventiva. Nosotros hemos detectado que el 20-30 % de estos pacientes indeterminados (que por otro lado apenas representan el 5 % de los positivos por ELISA) son serológicamente positivos cuando se enfrenta su suero a otras técnicas suplementarias con diferentes péptidos virales³⁴, o bien demostrando por técnica PCR la existencia de genoma viral en el mismo. Por ello, estos casos indeterminados deben ser valorados de forma individual mediante múltiples métodos que proporcionen información adicional.

El problema que sigue planteando el diagnóstico serológico del VHC es la correcta valoración de la detección de sus anticuerpos, ya que su presencia no distingue entre infección aguda, pasada, condición de portador o crónica, es decir, no proporcionan información sobre el grado real de infectividad³⁷. Por otra parte, los anticuerpos pueden desaparecer del suero después de un intervalo variable, sobre todo en pacientes con rápida resolución bioquímica, pero se desconoce si estos pacientes pueden transmitir o no la enfermedad. Su presencia mantenida tampoco permite discernir si persiste la infectividad en pacientes con normalización bioquímica, y asimismo hay que tener en cuenta que, en cualquier sospecha de infección, una serología negativa no la descarta.

7.2. Estudio de anticuerpos IgM

Como ya hemos comentado, la aparición de anticuerpos de tipo IgG puede demorarse hasta un año tras el contacto con el virus; por ello se han desarro-

llado diversos métodos para la detección de anticuerpos tipo IgM frente al Core, NS3 y NS4.

Las grandes expectativas que despertó la detección de estos anticuerpos, consecuencia de que en la mayoría de infecciones virales permite discernir entre fase aguda y fase crónica de la enfermedad, así como acortar el período ventana, se desvanecieron rápidamente, ya que por lo general su aparición coincide con la de los IgG, y no sólo están presentes en la fase aguda de la infección por el VHC, sino también en la fase crónica de la misma³⁸ (fig. 2). Por este motivo, su significado está muy controvertido en el momento actual. Respecto a su aparición, para unos es precoz y frecuente³⁹, pero para otros varía mucho de un paciente a otro, lo que limita su utilidad⁴⁰. En un estudio realizado por nosotros en pacientes dializados VHC positivos⁴¹ pudimos observar que los anticuerpos anti-core tipo IgM no guardan relación con la presencia o no de genoma viral en suero, aunque sí pudimos establecer una correlación con la elevación de transaminasas ($R = 0,81$), hecho descrito por otros autores en pacientes no dializados⁴².

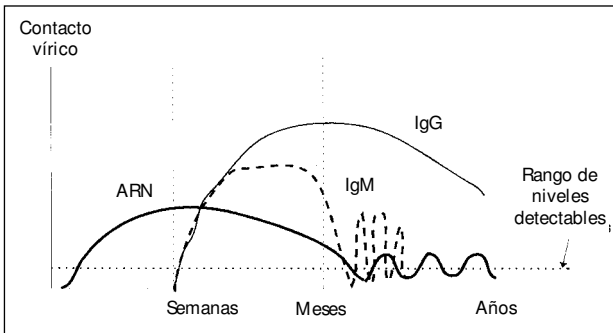


Fig. 2.— Evolución de los anticuerpos IgG, IgM y RNA séricos en la infección crónica por VHC.

7.3. Antígenos del virus C

Se ha publicado la detección de antígenos de la nucleocápside mediante un formato de ELISA⁴³, notificándose que existe una elevada correlación entre su presencia y la del genoma, si bien todavía no se ha desarrollado ningún test comercial para su identificación en suero de pacientes.

El estudio de los antígenos del virus C en biopsias hepáticas se puede realizar mediante anticuerpos monoclonales dirigidos frente a diversos antígenos (anti-core, anti-NS3, anti-envoltura) empleando técnicas de inmunofluorescencia. Estos antígenos se localizan exclusivamente en el citoplasma de los hepatocitos, tanto en la fase aguda como en la crónica de la enfermedad⁴⁴.

Tabla I. ARN. VHC en el ultrafiltrado.

	Presión transmembrana	Muestras estudiadas	ARN-VHC positivo	Dializador utilizado
Polisulfona	+ 400 mmHg	4	3	HF 80
	+ 100 mmHg	4	1	
Polimetilmetacrilato	+ 400 mmHg	2	1	Filtrizer B2 1.2 H
	+ 100 mmHg	2	No	
Cuprofan	+ 400 mmHg	2	1	Renak 1.2
	+ 100 mmHg	2	No	

7.4. Detección de ARN-VHC por PCR

El ARN-VHC se puede detectar en suero, tejido hepático y células mononucleares de sangre periférica mediante técnicas de amplificación génica o PCR, que permiten detectar secuencias específicas del virus. Debido a la baja concentración en que se encuentra el virus en suero, las técnicas de hibridación molecular convencionales no son lo suficientemente sensibles para determinar la presencia del ARN-VHC. Por este motivo se recurre a la reacción en cadena de la polimerasa. Al ser el VHC un virus ARN, para aplicar la PCR hay que realizar previamente su transcripción a ADNc y posterior amplificación (Nested-PCR) para aumentar su sensibilidad⁴⁵. No obstante, se pueden producir falsos negativos por mala manipulación o conservación inadecuada de la muestra y falsos positivos por contaminación de la misma. Recientemente se han descrito técnicas que permiten cuantificar la carga viral; de ellos, los que mayor aceptación presentan son la branched-DNA assay y la PCR competitiva, siendo esta última la que presenta mayor sensibilidad. Su empleo se aconseja en la monitorización de la terapia antiviral y se propone su utilización, junto al genotipado, como predictor de la respuesta al tratamiento.

El ARN-VHC se puede detectar tras la primera semana de la infección en hepatitis agudas postransfusionales y permite diagnosticar infección y replicación activa (fig. 2). El porcentaje de individuos seropositivos que presentan ARN-VHC en suero varía según los distintos autores y el grupo de población estudiada. No se detecta en una hepatitis resuelta, pero sí en portadores⁴⁶ y en pacientes con hepatitis crónica.

Un hecho a tener en cuenta es que, en las hepatitis crónicas, la viremia cursa en picos y valles con menor concentración de viriones, que pueden no ser detectables por PCR, lo cual limita su utilización como técnica patrón de referencia.

Los estudios realizados en pacientes dializados muestran gran variabilidad en la detección de ARN, oscilando entre el 52-93% de los VHC positivos; un hecho importante es la detección de ARN-VHC por PCR en el 2,5-12% de pacientes seronegativos⁴⁷, que se podría explicar por la inmunosupresión de estos pacientes o porque las técnicas serológicas que determinan la presencia de anticuerpos frente a los péptidos virales no sean por el momento suficientemente sensibles. Aunque la técnica de PCR identifica a los pacientes con replicación viral, sólo se observa elevación de transaminasas en el 31% de los ARN-VHC positivos. Igualmente, su positividad no implica lesión hepática morfológica, ya que sólo en el 30% de los pacientes ARN-VHC positivo es posible observar lesiones histológicas por biopsia.

Por todo ello, en el momento actual no existe ninguna técnica (detección de anticuerpos IgG, IgM, PCR) que no dé lugar a falsos positivos o falsos negativos, por lo que no existe patrón de referencia idóneo. Entre nuestros enfermos dializados es muy difícil discernir entre pacientes con infección actual o pasada, en gran parte porque la alteración inmunitaria existente en ellos^{48, 49} impide valorar correctamente incluso la negativización de los anticuerpos. Nosotros hemos observado pacientes que sin lesión histológica evidente, con transaminasas normales durante más de 2 años y con caída paulatina de los niveles de anticuerpos frente a los diversos péptidos virales, se detectaba ARN-VHC, e incluso un paciente que llegó a seronegativizar los anticuerpos y el ARN-VHC, meses más tarde se seropositivizaba y se detectaba de nuevo el ARN-VHC sin ningún factor de riesgo sobreañadido. Aunque este último caso pudiera ser consecuencia de reinfección, la existencia de valles con normalidad serológica impide una correcta valoración del mismo.

En el momento actual se considera que la detección de ARN-VHC por PCR tiene utilidad para:

- Confirmar infección por VHC en pacientes con técnicas suplementarias positivas o indeterminadas.
- Diagnóstico precoz de hepatitis aguda.
- Monitorización de transmisión perinatal.
- Seguimiento tras tratamiento antiviral.
- Establecer infecciones crónicas en pacientes con déficit de inmunidad humoral, que pueden ser incapaces de responder total o parcialmente con niveles detectables de anticuerpos: trasplantados, hemodializados, receptores de quimioterapia, así como pacientes con enfermedad hepática criptogénica y hepatitis autoinmunes⁵⁰.

Actualmente existen evidencias de que los distintos genotipos del VHC poseen diferentes características patogénicas y que su distribución parece estar relacionada con el área geográfica de origen. Algunos

genotipos presentan una distribución mundial, como ocurre con los genotipos 1 y 2; sin embargo, otros, como el 5 y 6, sólo se presentan en regiones geográficas específicas. Respecto a la distribución de genotipos, en España se ha descrito el predominio de los genotipos 1, 2 y 3, aunque su frecuencia es muy variable en función de la edad de los pacientes y del mecanismo de transmisión de la infección. En los pacientes tratados con diálisis, nosotros hemos estudiado el genotipo viral de nuestros pacientes PCR positivos, observando gran predominio del subtipo 1b (87,5%), mientras que el 1a estuvo presente en el resto. Este hecho ha sido ya descrito por otros autores para este tipo de población⁵¹, y es de destacar que prácticamente el 100% de los pacientes tratados en diálisis están infectados por el genotipo 1, que se ha descrito como el de mayor poder patógeno entre los genotipos del virus de la hepatitis C.

Respecto al valor que se debe otorgar a la detección de ARN-VHC y su posible cuantificación, cabe destacar que, en general, la viremia es un factor que está íntimamente ligado al genotipo infectante y que no guarda una estrecha correlación con la producción de IgM ni con los valores de enzimas hepáticas. Parece, por tanto, que estos marcadores tienen un significado bien distinto: mientras que el primero es un fiel reflejo de la actividad replicativa del virus en un momento dado, la detección de IgM aportaría datos acerca del estado de hepatitis crónica C.

8. Epidemiología

La transmisión del VHC es eminentemente parenteral, siendo responsable del 80-90% de las hepatitis postransfusionales; por ello son fundamentalmente los receptores de transfusiones de sangre, hemofílicos, hemodializados y ADVP, los individuos con mayor factor de riesgo para infectarse por el VHC. Sin embargo, en un alto porcentaje de pacientes positivos no existen factores de riesgo conocidos.

Los primeros estudios realizados entre los pacientes hemodializados permitieron observar una elevada prevalencia de infección por el VHC, con diferencias muy llamativas entre las diferentes áreas geográficas estudiadas. Así, en Europa se observaron prevalencias incluso del 35% en el área mediterránea, contrastando con porcentajes cercanos al 5% en los países del norte de Europa; incluso en algunos países se observaron grandes diferencias según la latitud geográfica. Aunque se ha descrito en la literatura anglosajona que ello se debe en gran parte a las propias medidas de prevención, parece difícil considerar que, excepto en algún caso muy aislado, sea éste el motivo de estas divergencias regionales, máxime

cuando nosotros hemos encontrado una elevada prevalencia de anticuerpos anti-VHC en pacientes con insuficiencia renal antes de ser incluidos en diálisis^{52, 53}, e igualmente el Estudio Multicéntrico Español de VHC⁵⁴ ha encontrado prevalencias del 15% en prediálisis, lo que difícilmente se justifica por las condiciones higiénicoambientales de las unidades de diálisis. Cada vez son más las publicaciones que establecen un nexo de unión entre distintas glomerulonefritis, crioglobulinemia mixta y VHC, habiendo observado nosotros⁵⁵ que la mayoría de los pacientes VHC positivos con enfermedad renal no incluidos en diálisis presentan como patología de base una glomerulonefritis membranoproliferativa o membranosa, con elevado porcentaje de crioglobulinas séricas⁵⁶. Por ello pensamos que posiblemente estas diferencias geográficas se deban a factores ambientales y/o constitucionales que faciliten o determinen nefritogenicidad del virus.

9. Transmisión intradiálisis

Respecto a la transmisión intradiálisis, estudios epidemiológicos realizados en nuestro país^{57, 58} ya mostraban un hecho que posteriormente fue confirmado por numerosos autores dentro y fuera de nuestro entorno geográfico: que la positividad al VHC de estos pacientes estaba en relación con las transfusiones de sangre recibidas y con el tiempo de permanencia en diálisis. Y ello era lógico, puesto que no disponíamos de eritropoyetina, por lo que eran frecuentes y repetidas las transfusiones a que se veían sometidos muchos de nuestros pacientes. A ello podemos añadir la práctica habitual de muchos de nuestros centros de diálisis, que sometíamos a los pacientes a transfusiones programadas con el fin de mejorar la evolución de un posible trasplante posterior. Sin embargo, en el momento actual, como consecuencia de la introducción en nuestro arsenal terapéutico de la eritropoyetina y la identificación de los donantes de sangre VHC positivos, las transfusiones de sangre han dejado de ser un factor importante de transmisión. Ello no evita que, debido al período ventana relativamente amplio de aparición de anticuerpos, puedan ser las transfusiones responsables de algún caso aislado de seroconversión.

Todo ello permite pensar que en estos pacientes existen otros factores epidemiológicos relacionados con la duración del tratamiento, ya que siguen existiendo seroconversiones en las unidades de diálisis, incluso en sujetos que nunca han sido transfundidos³⁴. Además, la prevalencia del VHC en estas unidades sigue aumentando, como ha puesto de manifiesto el Grupo de Trabajo del Virus C en España⁵⁹. Ello per-

mite considerar que el tratamiento con hemodiálisis acarrea un riesgo importante de exposición a este virus, constituyendo estos pacientes un grupo de riesgo para padecer infección por el VHC. Este hecho es importante si tenemos en cuenta la elevada incidencia de hepatopatía crónica observada en estos pacientes seropositivos⁶⁰. Probablemente la fuente de infección pueda ser el material contaminado con sangre de portadores del VHC. Todo ello lleva a considerar que esta transmisión se pueda realizar de paciente a paciente a través de diferentes vectores, siendo la máquina de diálisis un elemento importante a considerar entre otros.

Aunque no todos los autores que han estudiado esta transmisión horizontal han encontrado relación entre seroconversiones al VHC y el hecho de compartir la máquina de diálisis con seropositivos⁶¹⁻⁶⁵, el Grupo de Trabajo VHC en Nefrología⁶⁶ ha observado una clara reducción de seroconversiones en las unidades de España donde se ha aplicado alguna medida de aislamiento. En un estudio prospectivo durante 5 años de seguimiento realizado entre nuestros enfermos⁵¹, pudimos observar un elevado porcentaje de seroconversiones cuando no aplicábamos medidas de aislamiento (16,7%), con una incidencia global de 1,39 pacientes/100 pacientes/mes. Debemos mencionar que el 85% de los seroconvertidos no habían sido transfundidos en ningún momento. La incidencia de seroconversiones fue superior entre los pacientes que compartían máquina de diálisis con pacientes VHC positivos (2,87 pacientes/100 pacientes/mes) que en los que no compartían máquina (0,49 pacientes/100 pacientes/mes) ($p = 0,002$) (fig. 3). Tras esta observación decidimos realizar aislamiento en dos de nuestras tres unidades de diálisis, tratando los pacientes positivos en máquinas especialmente dedicadas a ellos, aunque situados en la misma unidad (es decir, compartiendo el mismo vestuario, sala de espera, etc.), con dedicación especial de personal sanitario para seropositivos y seronegativos. En la tercera unidad se procedió únicamente a intensificar las medidas universales de prevención^{67, 68}. El personal sanitario fue estudiado al comienzo del estudio y cada año durante el mismo para determinar anticuerpos frente al VHC; un miembro resultó positivo en el primer año de estudio y fue dedicado a otras labores dentro de la unidad.

Se pudo observar una reducción muy importante de la incidencia de seroconversiones en las unidades con aislamiento (de 1,59 pacientes/100 pacientes/mes, en el primer año a 0,15 pacientes/100 pacientes/mes en los siguientes 4 años, $p < 0,001$). Una lectura inmediata de estos resultados obliga a decir que el aislamiento de pacientes positivos en máquinas de diálisis especialmente dedicadas a ellos reduce signi-

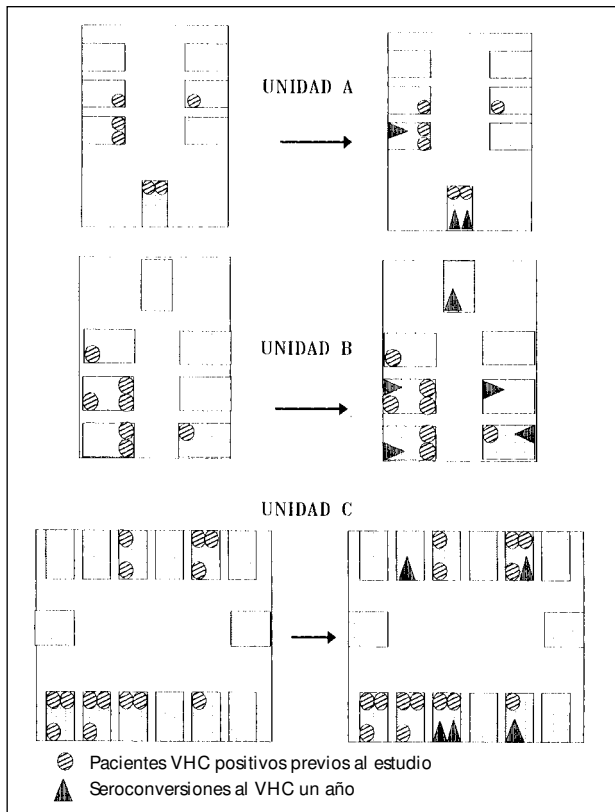


Fig. 3.—Pacientes positivos al VHC previos al estudio y seroconversiones originadas durante el primer año del mismo en nuestras tres unidades de hemodiálisis (A, B y C). Se representan los pacientes positivos atendiendo a su puesto de diálisis (máquina compartida). Los pacientes seronegativos no se indican.

ficativamente la transmisión intradiálisis. Sin embargo, no fue posible erradicar por completo nuevas seroconversiones. En la unidad sin medidas de aislamiento, donde sólo se intensificaron las medidas preventivas, se observaron resultados en cierto aspecto similares: la incidencia de seroconversiones disminuyó de 0,69 pacientes/100 pacientes/mes en el primer año de estudio a 0,22 pacientes/100 pacientes/mes en los restantes 4 años, $p < 0,05$, sin diferencias significativas con respecto a las unidades con aislamiento. En realidad, nuestros resultados no están de acuerdo con los obtenidos por otros grupos de investigadores⁶¹⁻⁶⁵, lo que consideramos que se debe al corto período de estudio prospectivo de estos últimos trabajos, que en ningún caso superó los 18 meses. En una de nuestras unidades con aislamiento, la única seroconversión objetivada lo fue tras 4 años de observación. Por todo lo expuesto, nosotros consideramos que no es suficiente el aislamiento parcial de los pacientes y/o el intensificar las medidas preventivas para evitar nuevas seroconversiones.

Para comprobar la transmisión a través de máquinas compartidas con pacientes infectados hemos investigado la presencia de ARN en el ultrafiltrado de seis pacientes seropositivos con ARN-VHC en suero (tabla I). Para este fin se utilizaron membranas de cuprofán, polimetilmetacrilato y polisulfona de alta permeabilidad, obteniéndose ultrafiltrado sin contacto con líquido de diálisis y a diferentes presiones transmembrana (+100 y +400 mmHg). La detección de ARN-VHC por PCR fue positivo en 6 de las 16 muestras de ultrafiltrado (37,5%).

Puesto que el tamaño de la partícula del VHC es de 35 nm⁶⁹ y el cut-off de las membranas de diálisis nunca excede de 7 nm⁷⁰, sería lógico pensar que el dializador ofrece una barrera segura que se opone al paso del VHC, pero recientemente algunos autores^{71,72} han demostrado el paso de esta partícula viral a través de la membrana de acrilonitrilo, al igual que en el pasado se demostró el paso al ultrafiltrado del VHB^{73,74}, cuyo tamaño es de 40 nm. En nuestro estudio⁵¹, se detectó la presencia de ARN-VHC en el ultrafiltrado conseguido a través de tres membranas de diálisis diferentes, siendo este paso más frecuente con las membranas de alta permeabilidad y con presiones transmembrana elevadas. Otros autores que obtuvieron el ultrafiltrado mezclado con el líquido de diálisis no observaron este paso; de hecho, si ambos líquidos se mezclan, el volumen obtenido para estudio debe ser concentrado; en este proceso de concentración se elevan los niveles de magnesio, metal que en elevadas concentraciones puede inhibir la amplificación por PCR⁷⁵.

Queda por demostrar si la partícula obtenida en el ultrafiltrado es la partícula viral completa e intacta y, por lo tanto, infectante, o si, por el contrario se trata de partículas incompletas o virus defectivos que dan positivo el test PCR, pero sin capacidad infectante.

Todo ello soporta nuestra hipótesis de que el aislamiento de pacientes VHC positivos en la misma unidad donde se dializan pacientes VHC negativos permite eliminar la transmisión horizontal paciente-paciente a través de la máquina de diálisis, pero no puede erradicar la transmisión horizontal por otros vectores (transmisión directa, utensilios, mobiliario, etcétera). En nuestra opinión, si queremos evitar seroconversiones debidas al tratamiento de hemodiálisis, es necesario el desarrollo de unidades independientes para cada grupo de pacientes.

Bibliografía

1. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW y Millian SJ: Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* ii:241-246, 1974.

2. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ y Holland PV: Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292:767-770, 1975.
3. Editorial: Non A- non B?. *Lancet* ii, 64-65, 1975.
4. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW y Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non A-non B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362, 1989.
5. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G y Bradley DW: Hepatitis C virus: The major causative agent of viral NANB hepatitis. *Br Med Bull* 46:423-441, 1990.
6. Miller RH y Purcell RH: Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2057-2061, 1990.
7. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R y Barr PJ: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2451-2455, 1991.
8. Takamizawa A, Mori A, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I y Okayama H: Structure and organization of hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 65:1105-1113, 1991.
9. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T y Shimotohno K: Molecular cloning of human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non A-non B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9524-9528, 1990.
10. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M y Shimotohno K: Gene mapping of the putative structural regions of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5547-5551, 1991.
11. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM y Rice CM: Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 67:2832-2843, 1993.
12. Santolini E, Migliaccio G y La Monica N: Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68:361-364, 1993.
13. Lok AS, Chien D, Choo QL, Chan TM, Chiu EKW, Cheng IKP, Houghton M y Kuo G: Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens-comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology* 18:497-502, 1993.
14. Houghton M, Weiner AJ, Han J, Kuo G y Choo QL: Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14:381-388, 1991.
15. Ogata N, Alter HJ, Miller RH y Purcell RH: Nucleotide sequence and mutation rate of the strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3392-3396, 1991.
16. Han JH, Shyamala V y Richman KH: Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4942-4945, 1992.
17. Kuroshaski M, Enomoto N, Marumo F y Sato C: Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology* 18:1293-1299, 1993.
18. Martell M, Esteban J y Quer J: Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: Quasi-species nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66:3225-3229, 1992.
19. Simmonds P, Holmes EC y Cha TA: Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol* 74:2391-2399, 1993.
20. Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstang J, Houghton M, Falston R y Walkers BD: Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in person with chronic hepatitis. *J Immunol* 149:3339-3344, 1992.
21. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R y Rice CM: Flavivirus genome organization expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 44:649-688, 1990.
22. Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, Romagnoni S, Gentilini P y Bréchet C: Infection of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Hepatol* 17 (Supl 1):S13, 1992.
23. Resnick RH y Koff R: Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Prevalence and significance. *Arch Inter Med* 153:1672-1677, 1993.
24. Espinosa M, López F, Martín A, Alvarez de Lara MA, Berdud I y Aljama P: Perfil clínico histológico de la infección por el VHC en enfermos en hemodiálisis. Necesidad de una actuación terapéutica. *Nefrología* XIII, nº 5:447-452, 1993.
25. Gentil MA, Rocha JL, Torronteras R, Algarra GR, Pereira P, Alpañés E, Gil L, García Sierra F, Marco MJ y Mateos J: Etiología de la hepatopatía crónica en pacientes con trasplante renal: importancia de la hepatitis C. *Nefrología* XIII, nº 5:453-459, 1993.
26. Ponz E, Campistol JM, Torregrosa JV, Barrera JM, Gil C, Oppenheimer F, Andreu J y Bruguera M: Evolución de la infección por el virus de la hepatitis C después del trasplante renal. *Nefrología* XIII, nº 5:460-466, 1993.
27. Morales JM, Castellano G, Colina F, Andrés A, Muñoz MA, Hernández E, Fuertes A y Rodicio J: Evolución clínico-patológica de la hepatitis C tras el trasplante renal. *Nefrología* XIII, nº 5:493-497, 1993.
28. Morales JM: Hepatitis C and transplantation. Symposium XII: Hepatitis-C virus in Nephrology, 110. XIIIth International Congress of Nephrology, Madrid, 1995.
29. Alter HJ, Purcell RH y Shih JW: Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 321:1494-1500, 1989.
30. Cuthbert JA: Hepatitis C: Progress and problems. *Clin Microbiol Rev* 7:505-532, 1994.
31. Esteban J, González A y Hernández JM: Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion associated hepatitis. *N Engl J Med* 323:1107-1112, 1990.
32. Jiménez C, Miguel J, Martínez-Zapico R, Bajo MA, Martínez-Ara J, Selgas R y Del Peso G: Prevalencia de anticuerpos anti-VHC en pacientes en hemodiálisis, familiares y personal sanitario de un servicio de nefrología. *Nefrología* XIII, nº 5:430-434, 1993.
33. Barril G, Castro M, Rincón B, Sánchez Tomero JA, Bernis C, Naya T y Traver JA: Epidemiología del virus C. *Nefrología* XIII, nº 5:435-439, 1993.
34. García-Valdecasas J, Bernal MC, García F, Roldán C y Cerezo S: Factores de riesgo e incidencia de seroconversiones del virus de la hepatitis C en pacientes hemodializados. Estudio con diferentes técnicas serológicas. *Nefrología* (aceptado, en prensa).
35. Alter HJ: New kit on the block: Evaluation of second generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 15:350-353, 1992.
36. Echevarría JM y León P: Aspectos actuales del diagnóstico de la hepatitis C. *Enf Infecc Microbiol Clín* 13:387-389, 1995.
37. Laguna del Estal P: Infección por VHC: Seroprevalencia y diagnóstico serológico. *An Med Inter* 10:38-46, 1993.
38. Camps J y Esteban R: Hepatitis C. *Enf Infecc Microbiol Clín* 13:31-39, 1995.
39. Clemens JM, Tascas S, Chau K, Vallari D, Shih JW, Alter HJ, Schleicher JB y Mimms LT: IgM antibody response in acute hepatitis C viral infection. *Blood* 79:169-172, 1992.
40. Zaaijer HL, Minns LT, Cuyper HTM, Reesink HW, Van der Poel CL, Taskar S y Lelie PN: Variability of IgM response in hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 40:184-187, 1993.

41. García-Valdecasas J, Bernal MC, Cerezo S, García F, Montiel N, Leyva A, Umana WO y Bosch JP: Hepatitis C virus RNA in patients with anti-HCV con hemodialysis. *ASAIO Journal* 40: M450-M453, 1994.
42. Brillanti S, Masci C, Ricci P, Miglioli M y Barbara L: Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 15:998-1001, 1992.
43. Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, Munekata T, Tachibana K, Akabane Y, Yoshizawa H y Mishiro S: Demonstration of the hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected host. *J Gen Virol* 73:667-672, 1992.
44. Krawczynski K: Identification of HCV associated antigen(s) in hepatocytes. *Arch Virol* 4:196-198, 1992.
45. Garson JA, Ring C, Tuke P y Tedder RS: Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet* 336:878-879, 1990.
46. Villa E, Ferretti I, de Palma M, Melegari M, Scaglioni PP, Trande P, Vecchi C, Fratti N y Manenti F: HCV-RNA in serum of asymptomatic blood donors involved in posttransfusion hepatitis (PTH). *J Hepatol* 13:256-259, 1991.
47. Pereira BJ: Hepatitis C infection in patients on dialysis. Symposium XII: Hepatitis-C virus in Nephrology, 109-110. XIIIth International Congress of Nephrology, Madrid, 1995.
48. Kay NE y Raji LR: Immune abnormalities in renal failure and hemodialysis. *Blood Purification* 4:120-129, 1986.
49. Haag-Weber M y Horl WH: Uremia and infection: Mechanism of impaired cellular host defense. *Nephron* 63:125-131, 1993.
50. León P, López JA y Eola: Characterization of hepatitis C virus infections among recipients of intravenous human immunoglobulin. *Prog Immun Deficiency* 5:122-123, 1995.
51. García-Valdecasas J, García F, Bernal MC, Cerezo S, Gallardo A, Maroto MC y Pereira BJG: A five year follow-up of hepatitis C virus transmission among hemodialysis patients. Efficacy of isolation measures. *Kidney International* (en prensa).
52. García-Valdecasas J, Bernal MC, García F y Cerezo S: Antibodies against hepatitis C virus in patients prehemodialysis: prevalence and epidemiological factors. XXXth Congress of the European Dialysis and Transplant Association. Glasgow, 1993.
53. García-Valdecasas J, Bernal C, García F, Cerezo S, Umana WO, Von Albertini B y Kimmel PL: Epidemiology of hepatitis C virus infection in patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 5:186-192, 1994.
54. Barril G y Traver JA: Predialysis patients: high prevalence of Ac HCV Spanish multicentric study. *Nephrol Dial Transplant* 10, nº 6:980, 1995.
55. García-Valdecasas J, Bernal MC, García F, Leyva A y Cerezo S: Epidemiological factors involved in hepatitis C virus infection in patients with renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 10 (Suppl. 6):81-82, 1995.
56. García-Valdecasas J, Bernal MC, Roldán C, Martínez F y Cerezo S: HCV antibodies in patients with chronic glomerulonephritis. XIII International Congress of Nephrology. Madrid, 1995.
57. García-Valdecasas J, Bernal MC, Montiel N, Manjón M, García M y Cerezo S: Estudio seroepidemiológico de anticuerpos frente al virus C en una unidad de hemodiálisis. XXII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Bilbao, 1990.
58. Esforzado N, Cases A, Barrera JM, Bergada E, López Pedret Jy Revert L: Incidencia y factores de riesgo de infección por virus de la hepatitis C en una población de hemodiálisis. XXII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Bilbao, 1990.
59. Barril G y Traver JA: Virus C: dos años de seguimiento en una población de más de 4.500 pacientes en diálisis en España. IX Congreso Latinoamericano de Nefrología y II Congreso Ibero-Americano de Nefrología. San Juan, Puerto Rico, 1994.
60. Barril G y Traver JA: Study of hepatopathy in patients on hemodialysis with hepatitis C virus. Multicentric study in Spain. XXXIst Congress of the European Dialysis and Transplant Association. Vienna (Austria), julio 1994.
61. Vagelli G, Calabrese G, Guaschino R y Gonella M: Effect of HCV positive patients isolation on HCV infection incidence in a dialysis unit. *Nephrol Dial Transplant* 7:1068-1073, 1992.
62. Besso L, Rovere A, Peano G, Menardi LM, Fenoglio S y Ghezzi PM: Prevalence of HCV antibodies in uremic population undergoing maintenance dialysis therapy and the staff members of the dialysis units. *Nephron* 61:304-306, 1992.
63. Pru CE, Cuervo C, Ardila M y Terán M: Hepatitis C transmission through dialysis machines. *ASAIO Journal* 40, M889-M891, 1994.
64. Blumberg A, Zehnder C y Burckhardt J: Prevention of hepatitis C infection in haemodialysis units. A prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 10:230-233, 1995.
65. Arenas MD, González C, Enríquez R, Cabezuolo JB, Lacueva J, Antolín A y Reyes A: Eficacia del aislamiento de pacientes anti-VHC positivos en hemodialisis. *Nefrología* XV:141-147, 1995.
66. Barril G y Traver JA: Utilidad del aislamiento de pacientes VHC positivos para reducir las seroconversiones del VHC en las unidades de diálisis. Estudio multicéntrico en 81 centros en España. XXV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Alicante, septiembre, 1994.
67. Centers for Disease Control: What control measures should be taken when hemodialysis patients are suspected of having non A, non B hepatitis? *CDC Hepatitis Surveillance Report* 49:3-4, 1985.
68. Centers for Disease Control, Atlanta. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *JAMA* 260:462-465, 1988.
69. Yuasa T, Ishikawa G, Manabe S, Sekiguchi S, Takeuchi K y Miyamura T: The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre. *J Gen Virol* 72:2021-2024, 1991.
70. Chiamonte S, Tagger A, Ribero ML, Grossi A, Milan M y La Greca G: Prevention of viral hepatitis in dialysis unit: isolation and technical management of dialysis. *Nephron* 61:287-289, 1992.
71. Sampietro M, Craziani G, Badalamenti S, Salvadori S, Caldarelli R, Como G y Fiorelli G: Detection of hepatitis C virus in dialysate and in blood ultrafiltrate of HCV-positive patients. *Nephron* 68:140, 1994.
72. Lombardi M, Cerrai T, Dattolo P, Pizzarelli F, Michelassi S, Maggiore Q y Zigneno AL: Is the dialysis membrane a safe barrier against HCV infection? *Nephrol Dial Transplant* 10:578-579, 1995.
73. Moynot A, Lazizi Y, Dubreuil P, Buisson C y Pillot J: Nature of AgHBs ultrafiltrate of haemodialysis patients: presence of viral DNA. *Nephrol Dial Transplant* 7:732, 1992.
74. Kroes ACM, Van Bommel EFH, Niesters HGM y Weimar W: Hepatitis B viral DNA detectable in dialysate. *Nephron* 67: 369, 1994.
75. White TJ, Madej R y Persing DH: The Polymerase Chain Reaction: Clinical applications. *Adv Clin Chem* 29:161-196, 1992.