

Aspectos actuales del diagnóstico de la hepatitis por virus C en enfermos en diálisis

P. De Sequera, V. Carreño* y C. Caramelo

Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo. Servicios de Nefrología y *Hepatología. Fundación Jiménez Díaz

INTRODUCCION

La existencia de hepatitis diferentes de las causadas por los virus A ó B era un conocimiento corriente desde la década de los 70. Estas entidades se agruparon bajo el nombre genérico de hepatitis no A no B. La identificación de su principal agente causal, el virus C de la hepatitis (VHC) tuvo lugar en 1988¹. Para la identificación del virus se infectó a un chimpancé experimentalmente de hepatitis no A no B, posteriormente se procedió a la extracción del ARN total del suero. A partir de este ARN se produjeron copias de ADN y se clonaron en *E. coli*. De entre todos los clones obtenidos se seleccionó uno que producía material antigénico que podía ser reconocido por anticuerpos presentes en el suero de un enfermo convaleciente de una hepatitis no A no B. Este ADN se clonó posteriormente en levaduras para obtener un material antigénico suficiente (que se denominó C100) y se utilizó en experimentos de inmunoanálisis para investigar la existencia y especificidad de los anticuerpos anti C100 en la hepatitis no A no B. La aparición de estos anticuerpos en pacientes y en chimpancés infectados, pero no en los sanos demostró que se trataba de una prueba válida para la identificación de la infección.

ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

El VHC es un virus ARN monocatenario cuya secuencia de nucleótidos tiene homología con flavivirus y pestivirus, considerándose actualmente como un nuevo género de la familia *Flaviviridae*. Su genoma (fig. 1) está constituido por 9.379 nucleótidos que se organizan en dos grupos de genes: estructurales, que codifican las proteínas que van a formar la nucleocápside (C) y 2 glucoproteínas de la envoltura (E1 y E2), y no estructurales (NS2-NS5), que codifican las proteínas necesarias para la replicación vírica. Existen dos regiones no codificantes en los dos extremos 5' y 3' que delimitan una gran zona de lectura abierta (*open reading frame*) que comprende casi todo el genoma vírico. La región no codificante del extremo 5' del genoma es una región muy conservada, y es donde se localiza la regulación de la replicación vírica y el control de la traducción. Las regiones que codifican las glucoproteínas de superficie (E1 y E2) son, en cambio, las que experimentan más variaciones. El conocimiento de esta estructura genómica es importante para entender los métodos de diagnóstico serológico de detección de anticuerpos.

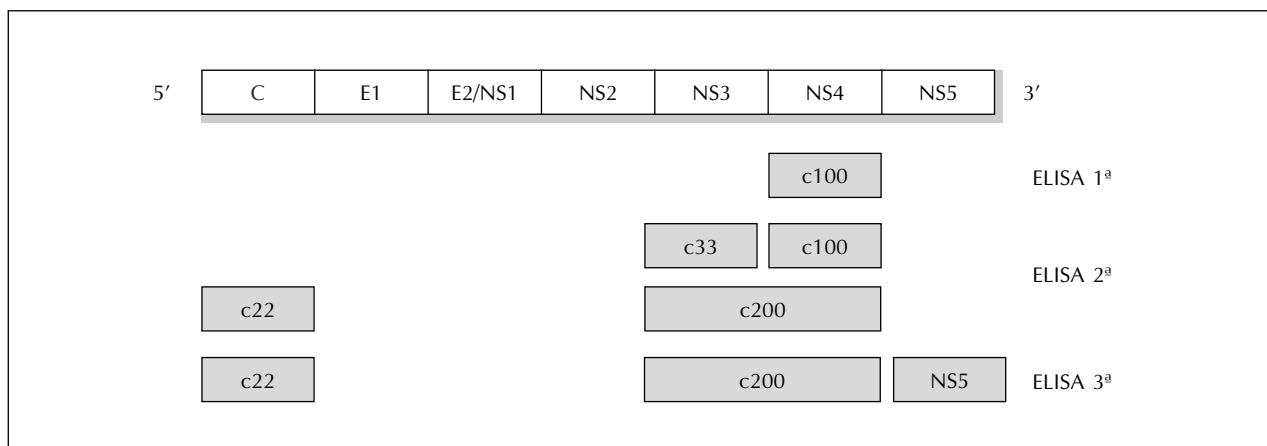


Fig. 1.—Estructura genómica del VHC y antígenos utilizados en los ensayos de 1ª, 2ª y 3ª generación.

DIAGNOSTICO

En la mayoría de los casos la hepatitis crónica por el VHC es una enfermedad bioquímica e histológica, sin síntomas. La elevación de las cifras de aminotransferasas es la que lleva a analizar los anticuerpos anti-VHC. Para el diagnóstico propiamente dicho, disponemos de dos tipos de pruebas. Las técnicas serológicas de detección de anticuerpos frente al VHC (anti-VHC); y las técnicas de biología molecular que detectan, cuantifican y/o caracterizan el ARN del VHC en pacientes infectados. Es importante conocer bien los marcadores bioquímicos y virológicos de infección por el VHC, así como sus particularidades en los pacientes en hemodiálisis (HD) para realizar el diagnóstico de infección lo más precozmente posible.

Aminotransferasas

La actividad sérica de las aminotransferasas, alanino aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT) ha sido utilizada para el diagnóstico de las hepatitis no A no B, mucho antes del descubrimiento del VHC². Los límites de los valores de ALAT considerados normales han sido objeto de numerosos estudios. Estos valores se calculan en la actualidad a partir de la media obtenida en la población general. Se considera que la sensibilidad de la ALAT es superior a la de la ASAT³.

Se han descrito tres formas evolutivas de la actividad de la ALAT en la hepatitis por virus C: un gran pico con posterior resolución, un aumento permanente en meseta, y una elevación fluctuante con fases de normalización. Sin embargo, los niveles de ALAT en el curso de una hepatitis aguda, no permiten prever el tipo de lesión histológica que presentarán los pacientes infectados por el VHC que evolucionen a la cronicidad⁴. Tampoco está clara la correlación existente entre la actividad de la ALAT y la carga viral, ya que si bien algunos autores han constatado esta correlación⁵, otros no lo han hecho⁶.

Aminotransferasas en HD

Las aminotransferasas constituyen la 1ª herramienta diagnóstica, pero para interpretarlas correctamente, hay que considerar que los valores de las mismas en los pacientes dializados son inferiores a los de la población sana^{7,8}, considerándose valores normales en dializados $9,2 \pm 2,4$ UI/L para la ASAT, y $7,4 \pm 1,7$ UI/L para la ALAT⁷.

Es probable que la elevada prevalencia de hepatopatía haya enmascarado esta hipoaaminotransferase-

mía. No se conoce con exactitud cual es la causa de la misma en los pacientes en diálisis, algunos autores han invocado un déficit de vitamina B6⁹, pero esto no ha sido confirmado por otros autores⁷. Otra hipótesis ha sido la presencia en el suero urémico de sustancias que interferirían con la señal calorimétrica empleada en los métodos bioquímicos de determinación de aminotransferasas¹⁰. Las aminotransferasas constituyen una prueba económica y sencilla para identificar a los pacientes con posible infección por VHC y en especial, en casos de infección con negatividad de los anticuerpos anti VHC, para seleccionar a aquellos en los que convendría determinar el ARN del VHC para realizar el diagnóstico de hepatitis por VHC. Basados en lo dicho anteriormente, deberían considerarse niveles elevados, cuando los valores de ALAT son superiores a 24 UI/L¹¹. No obstante, aunque las aminotransferasas son un parámetro esencial, no siempre se correlacionan con el grado de severidad histológico, habiéndose encontrado alteraciones histológicas significativas en pacientes infectados por el VHC que presentaban niveles enzimáticos normales⁶. Las elevaciones de ALAT son generalmente pequeñas e intermitentes en los pacientes dializados infectados por el VHC. Los niveles de ALAT se encuentran elevados de forma intermitente en más del 30% de los pacientes infectados. Se ha descrito también, una correlación directa entre los niveles de aminotransferasas y de ferritina en plasma en los pacientes dializados infectados por el VHC¹²; este dato ha de tenerse en cuenta a la hora de evaluar los depósitos de hierro de estos pacientes mediante la ferritina, ya que la coexistencia de hepatitis por el VHC podría llevar a una sobrevaloración del capital férrico.

El conocimiento los niveles de aminotransferasas en los pacientes en diálisis tiene implicaciones terapéuticas directas, ya que va a permitir diagnosticar de forma más precoz la infección por el VHC, y por lo tanto mejorar las posibilidades de éxito terapéutico. Además, dada la mayor periodicidad con la que se realizan las determinaciones de aminotransferasas (mensual o bimensual en la mayoría de las Unidades de diálisis españolas), en relación con las pruebas serológicas de detección de anticuerpos (cada 3-12 meses), son las que nos van a alertar sobre la existencia de una posible seroconversión. En este sentido, e insistiendo en el aspecto de los niveles reducidos de aminotransferasas en los pacientes renales, debemos tener en cuenta que no es necesaria una elevación muy marcada de la actividad plasmática de estas enzimas para que debamos sospechar la aparición de una hepatitis aguda por VHC. En nuestra experiencia, algunos pacientes han experimentado seroconversiones para el VHC con pequeños movimientos de aminotransferasas (X3 o 4 con respecto al basal).

Detección de anticuerpos frente al VHC

Disponemos en la actualidad de dos tipos de pruebas para la detección de anticuerpos, unas empleadas para el despistaje de pacientes positivos, y otras para la confirmación de la positividad de las primeras. Para comprender los métodos serológicos es importante conocer la estructura del virus, cuyo genoma se representa en la [figura 1](#).

El primer ensayo comercial desarrollado, conocido como prueba de 1ª generación, fue un ELISA¹³. Este tiene muchas ventajas, entre las que figura su fácil manejo y automatización, la baja variabilidad del mismo, y el relativo bajo coste. Detecta la presencia de anticuerpos frente a la proteína C100 del VHC (anti-VHC)¹⁴. Con este método se comprobó la presencia de anticuerpos frente al VHC en un 70-80% de las hepatitis crónicas no A no B de transmisión desconocida. La sensibilidad de estas determinaciones se vio incrementada en 1992 con el desarrollo de ensayos de 2ª generación¹⁵, que incluyeron, además del péptido C100, otros dos péptidos adicionales el C22, y el C33. Los ensayos de 2ª generación han permitido detectar la presencia de anti-VHC de forma más precoz y en un mayor porcentaje de pacientes¹⁵, pudiéndose detectar anticuerpos a las 4 semanas de la exposición¹⁶. No obstante, en individuos inmunocomprometidos, como los receptores de trasplante de órganos o infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, pueden no detectarse anticuerpos, incluso en presencia de infección viral activa¹⁷. Sin embargo, habiéndose comprobado que con los ELISA de 1ª y 2ª generación existen falsos positivos, se ha desarrollado una 3ª generación de pruebas (ELISA 3) que contiene Ag reconfigurados del core y la región NS3, y un antígeno adicional (NS5) que no está presente en los ELISA 2. Estudios preliminares muestran una mayor sensibilidad de esta prueba en la detección del VHC tanto en donantes como en hepatópatas crónicos. El período ventana se reduce con esta prueba a 2-3 semanas¹⁸, y la mayor sensibilidad parece depender más de los Ag reconfigurados que del Ag NS5¹⁹.

Para confirmar los resultados positivos que se obtienen por la técnica de ELISA se han diseñado diferentes métodos confirmatorios, como son los ensayos de neutralización o de inmunoblot (RIBA)²⁰. La técnica de RIBA contiene las mismas proteínas recombinantes que los ELISA de 2ª y 3ª generación, y permite detectar la presencia de cada anticuerpo específicamente, así como una estimación semicuantitativa de los mismos¹³. Los resultados se interpretan como positivos (cuando existe positividad a dos o más antígenos), indeterminados (sólo un antígeno positivo), o negativos. Algunos estudios realizados en

pacientes inmunodeprimidos muestran un porcentaje elevado (58-85%) de resultados indeterminados con el RIBA 2, que dan resultado positivo cuando se analizan por las pruebas de 3ª generación²¹.

También se han desarrollado métodos para la detección de anti-VHC de tipo IgM²². Los ensayos se basan en modificaciones de los ELISA disponibles comercialmente, y determinan la presencia en suero de anticuerpos IgM específicos frente al virus mediante un anticuerpo dirigido contra la IgM humana conjugado enzimáticamente. Inicialmente se esperó una detección más temprana de los anti-VHC tipo IgM en el curso de la infección, como ocurre en la mayoría de las infecciones virales, permitiéndonos además, diferenciar entre la fase aguda y la crónica, y disminuir el «período ventana». Sin embargo, estos anticuerpos no sólo están presentes en la fase aguda de la enfermedad, sino también en la crónica, habiéndose correlacionado la existencia de los mismos con una evolución a la cronicidad²³ y en la respuesta al tratamiento antiviral. Además, la determinación de este marcador durante la fase crónica de la enfermedad puede servir como factor pronóstico de respuesta a la terapia con Interferón (INF). Así, los pacientes con respuesta completa al tratamiento con INF presentan basalmente niveles de anti-IgM superiores a los no respondedores, y su desaparición durante el tratamiento se correlaciona con una respuesta mantenida.

A pesar de la progresiva mejoría en sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos, en poblaciones de alto riesgo no todos los pacientes con infección activa (ARN VHC positivos) son identificados por técnicas serológicas. Más aún, los métodos serológicos de detección de anticuerpos no proporcionan información acerca del grado de infectividad o el curso de la infección, ya que su presencia no distingue entre infección aguda, resuelta o condición de portador crónico. Son necesarias por lo tanto, técnicas complementarias para aclarar estas cuestiones. Un aspecto de interés adicional al interpretar el hallazgo de anticuerpos frente al VHC es que, como hemos señalado anteriormente, su presencia no indica que exista inmunidad frente a la enfermedad, ya que estos anticuerpos pueden considerarse globalmente como no protectivos.

Estudios preliminares sugieren que el Ag de la envuelta E2 (Anti-E2), pudiera ser un buen candidato para la realización de futuros ELISA²⁴. Yokosuka y cols., encontraron una disminución gradual de los niveles de anti-E2 hasta su desaparición tras el tratamiento con INF²⁵, sugiriendo que el anti-E2 podría ser un marcador de replicación viral. Otros autores han encontrado correlación entre la detección de la proteína E2 del VHC (anti-E2) en hígado y la existencia de infección activa²⁶.

Anti-VHC en HD: Los pacientes inmunodeprimidos, como es el caso de los pacientes hemodializados y receptores de trasplante tienen alterada la respuesta de producción de anticuerpos frente a antígenos del VHC^{17,27}. La discrepancia existente entre las pruebas de 1ª y 2ª generación es particularmente marcada en los pacientes inmunodeprimidos, en los cuales el grado de detección con el ELISA 2 puede llegar a ser el doble que el obtenido con el ELISA 1^{28,29}. El bajo grado de reactividad contra la proteína C100-3 comparado con las proteínas C22 y C33 explica el mayor grado de detección obtenido con el ELISA de 2ª generación con respecto a los de 1ª en pacientes hemodializados y trasplantados²⁸.

Estudios recientes muestran que el ELISA 3 es más sensible y detecta la seroconversión antes que el ELISA 2 en pacientes hemodializados^{30,31}, (las pruebas de 3ª generación se positivizan una media de 17 días antes que los de 2ª³⁰). De las técnicas serológicas estudiadas, el inmunoblot RIBA 3 en pacientes en HD es el que ofrece mayor especificidad, superando a las otras técnicas de ELISA e inmunoblot de segunda generación^{32,33}. En estudios realizados en pacientes trasplantados, las pruebas de 3ª generación también han mostrado una mayor sensibilidad y especificidad que las de 2ª³¹, dando un menor número de resultados indeterminados.

Los antígenos recombinantes frente al VHC han jugado un papel principal en la mejora de la sensibilidad de las determinaciones serológicas de detección de anti-VHC. Futuras investigaciones se dirigirán a la identificación y generación de mejores antígenos para mejorar la detección de anticuerpos frente al VHC, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. En esta línea, en pacientes hemodializados los anti-E2 han mostrado su superioridad con respecto a las pruebas de 3ª generación en el diagnóstico de infección por VHC³⁴.

DetECCIÓN DEL ARN DEL VHC

Las técnicas moleculares para la detección del ARN del VHC pueden dividirse en 3 categorías generales: 1) Aquellas que detectan la presencia o ausencia del ARN VHC en plasma o suero (pruebas cualitativas), 2) Las que determinan la cantidad de ARN VHC en sangre, es decir las que miden la carga viral (pruebas cuantitativas), y 3) Las que determinan la naturaleza genética del VHC (pruebas para determinar el genotipo).

La detección del ARN viral es la única forma de realizar el diagnóstico directo de infección activa, su presencia implica un mayor riesgo de desarrollar enfermedad hepática. La tecnología que se usa para la detec-

ción de este marcador viral es la «reacción en cadena de polimerasa» (polymerase chain reaction: PCR). La detección del ARN del VHC mediante la PCR constituye el método más sensible para la identificación de la infección por el VHC. Puede ser la única herramienta diagnóstica en fases precoces de la infección. También es muy útil como factor predictivo de respuesta al tratamiento con INF alfa. Para la realización de la PCR, dado que el genoma del VHC es de tipo ARN hay que realizar un paso previo de transcripción del ARN viral a su ADN complementario (ADNc), utilizando para ello la enzima transcriptasa inversa, y después se realiza la amplificación convencional. La PCR es una técnica muy sensible que permite la identificación del genoma viral en productos sanguíneos [suero, plasma, células mononucleares de sangre periférica (CMSP)] o tejidos (hígado). Sin embargo, la principal limitación de esta técnica viene condicionada por la posibilidad de resultados falsamente positivos o falsamente negativos. La elevada sensibilidad de la PCR, que es capaz de detectar niveles de ARN VHC en suero de hasta 100 copias/ml de suero del paciente, puede conllevar resultados falsamente positivos si no se manipulan o almacenan correctamente las muestras³⁵. La calidad del suero para la detección del ARN del VHC depende de 3 parámetros: el tiempo transcurrido entre la formación del coágulo y la centrifugación del tubo, el tiempo transcurrido entre la centrifugación y la obtención del suero, y las condiciones de almacenamiento³⁶. Davis y cols. han observado que la tasa de ARN del VHC disminuye un 4-8%, 22% y 44% si el tiempo transcurrido entre la formación del coágulo y el la centrifugación del tubo es de 1-2, 4 y 24 horas respectivamente³⁶. Se recomienda por lo tanto, centrifugar las muestras de sangre antes de que pasen dos horas de la formación del coágulo. El suero debe recuperarse inmediatamente después de la centrifugación y congelarlo en las dos horas siguientes. Es importante considerar que los niveles de ARN VHC fluctúan en el tiempo, y pueden ser «falsamente» negativos si los niveles de replicación viral son bajos o la replicación viral se limita a compartimentos no sanguíneos. Además de su uso para el diagnóstico precoz, la detección del ARN del VHC tiene especial interés en dos situaciones, cuando las pruebas de confirmación dan un resultado indeterminado, y cuando existe una elevación de aminotransferasas en ausencia de anticuerpos.

No obstante, a pesar de la disponibilidad de estas pruebas diagnósticas, podemos encontrarnos con dificultades a la hora de interpretar los resultados:

– Pacientes anti-VHC negativo, ARN VHC positivo: esta situación podría darse como consecuencia de:

a) El paciente puede encontrarse en el «período ventana» entre la infección y la seroconversión.

b) La prueba utilizada para la detección de anticuerpos puede no ser lo suficientemente sensible para

detectarlos, debido a la existencia de un título muy bajo o a que el antígeno utilizado no es el adecuado.

c) Alteración del sistema inmunitario que modifique la producción de anticuerpos.

d) Los anti-VHC pueden desaparecer, a pesar de la presencia de ARN VHC. El ARN del VHC puede permanecer en el compartimento no sanguíneo (CMSP o hígado) y servir como reservorio del virus.

– Pacientes anti-VHC positivo, ARN negativo:

a) Puede deberse a la presencia del ARN VHC fuera del compartimento sanguíneo (CMSP o hígado), en los lugares de replicación del virus.

b) La viremia puede presentarse de forma intermitente, pudiendo darse la circunstancia de que el ARN del virus no esté en sangre en el momento de la realización de la PCR.

c) La cantidad de partículas virales puede estar por debajo del límite de detección de la PCR.

d) Los anticuerpos frente al VHC pueden persistir una vez resuelta la infección.

Los test de cuantificación del ARN del VHC constituyen una herramienta importante en el manejo de la infección por el VHC³⁷. El nivel de ARN circulante en el suero o plasma del enfermo se denomina carga viral, y es probablemente el reflejo de la relación dinámica entre el grado de replicación viral y el aclaramiento del virus por el huésped infectado. La carga viral del VHC parece ser bastante estable en pacientes con infección crónica por el VHC que no reciben tratamiento antiviral³⁸. No obstante, la existencia de viremia no implica daño hepático³⁹. En el estudio de Al Meshari y cols.³³ de 6 biopsias hepáticas realizadas en pacientes en hemodiálisis ARN-VHC positivo sin anticuerpos frente al VHC, ninguna de ellas presentó datos histológicos de hepatitis crónica, mientras que esta estaba presente en el 81% de los ARN VHC positivos con anticuerpos. Nosotros hemos biopsiado a 3 pacientes con ARN VHC positivos sin anticuerpos, y coincidiendo con lo observado por Al Meshari y cols., estos sólo presentaron cambios histológicos mínimos¹¹. Esto podría sugerir que para que se produzca daño hepático son necesarios tanto el genoma viral como la respuesta humoral al VHC.

Dado que el VHC es una familia heterogénea de virus, con al menos 6 genotipos distintos, y numerosos subtipos⁴⁰ las pruebas dirigidas a determinar el genotipo del VHC, tienen un papel fundamental en la epidemiología del virus, fundamentalmente en la detección de la transmisión horizontal del VHC. También es importante en la valoración de la respuesta al tratamiento con INF, ya que se considera un factor predictor independiente de respuesta, y por último, el genotipo viral también tiene valor pronóstico.

PCR en HD: a pesar de que las nuevas pruebas de detección de Ac han disminuido el «período venta-

na», (hasta varios meses en pacientes dializados), existe un porcentaje de pacientes en HD con infección por el VHC que no desarrollan un nivel detectable de anticuerpos^{11,33,41}. En estos pacientes la única forma de realizar el diagnóstico serológico es la detección del genoma del VHC (VHC-ARN) mediante la PCR. Además, el tiempo transcurrido entre la detección del ARN del VHC y la detección de anticuerpos frente al mismo puede ser mayor (hasta más de 10 meses) en los pacientes hemodializados y trasplantados renales¹⁷. Existen pocos estudios epidemiológicos en pacientes dializados basados en la detección del ARN del VHC. La prevalencia en dializados de Ac VHC negativos con PCR positiva oscila entre un 0 y un 28%¹¹. Por lo tanto, el ARN VHC debería realizarse en todo paciente inmunodeprimido sin anticuerpos frente al VHC, con sospecha clínica de infección por el VHC. No obstante, dada la complejidad y elevado coste de la técnica de la PCR, no debe ser utilizada como prueba de 1.ª elección. La detección del ARN viral supone que el virus se está replicando y por lo tanto que la infección es activa. Más de un 80% de los dializados anti-VHC+ son virémicos^{28,41}. La PCR es una técnica cara y que no está disponible en todos los centros, pero su realización es de máxima utilidad en todo paciente en diálisis que presenta elevación persistente de aminotransferasas sin causa clara. La detección del ARN del VHC tiene también un papel fundamental en la selección y seguimiento de los pacientes que recibirán tratamiento antiviral.

Las indicaciones para la determinación del ARN del VHC en pacientes hemodializados se podrían resumir en las siguientes:

– Diagnóstico de infección en el «período ventana».

– Diagnóstico de infección activa. Hay que considerar la posibilidad de una viremia intermitente, y por ello repetir la PCR en aquellos pacientes VHC +, aunque hayan presentado negatividad a la PCR.

– Estudio de una elevación de aminotransferasas en cualquier paciente, independientemente de su serología:

a) En los anti-VHC+, la elevación de aminotransferasas se asocia a replicación viral, aunque ésta sea inconstante en los pacientes hemodializados.

B) En los anti-VHC-, la elevación de aminotransferasas puede ser el primer signo de infección.

– Con el fin de realizar un diagnóstico epidemiológico. El análisis del genotipo viral puede permitirnos el diagnóstico de transmisión nosocomial en una misma Unidad de Diálisis.

– Para la indicación y seguimiento de la terapia antiviral con interferón.

Para resumir y rentabilizar al máximo las pruebas diagnósticas proponemos el siguiente árbol de decisiones (fig. 2), que tiene como punto de partida las pruebas de detección de anticuerpos.

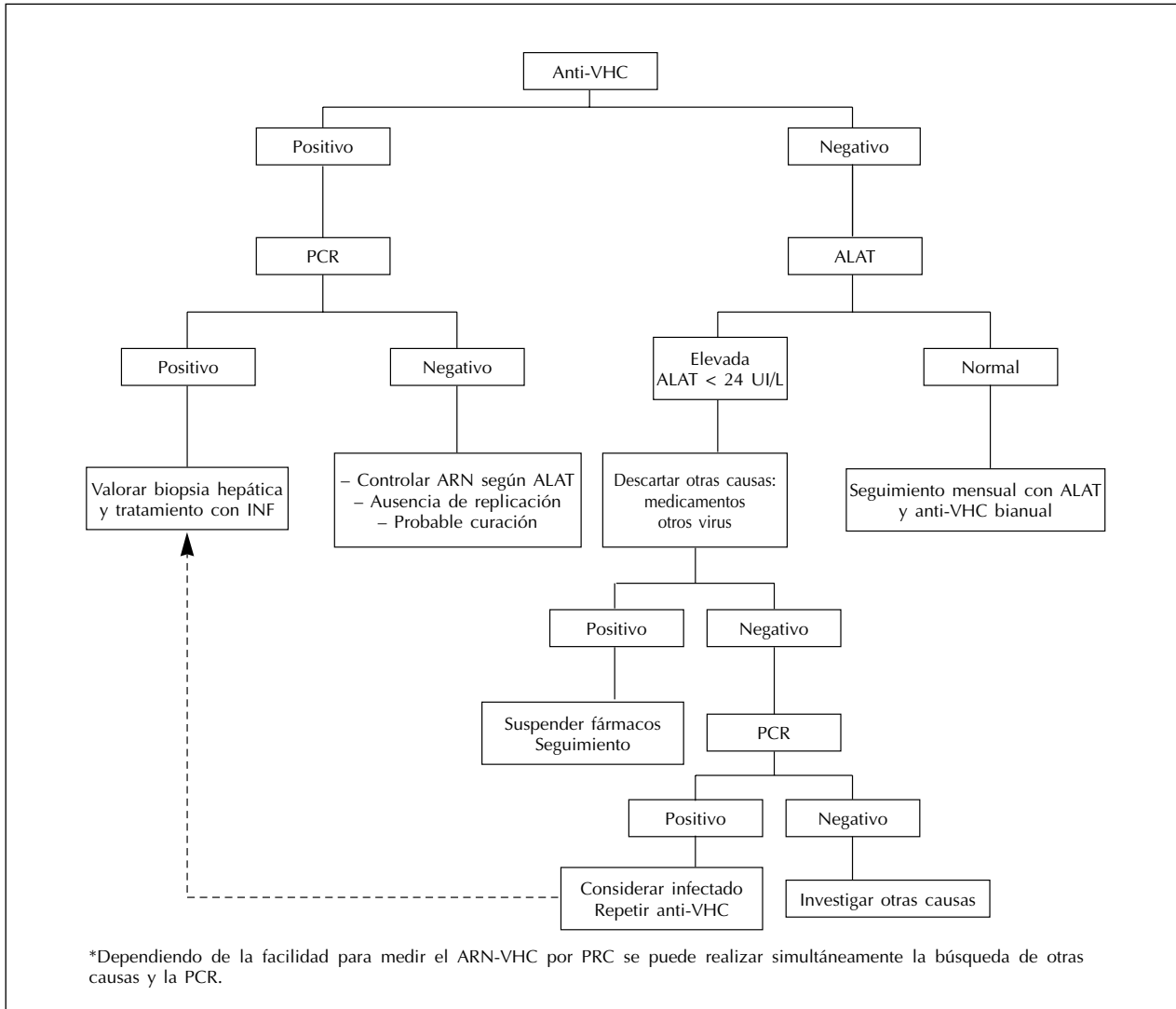


Fig. 2.—Esquema diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en pacientes en diálisis.

Bibliografía

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M: Isolation of cDNA derived from a blood-borne non-A, non-B hepatitis genome. *Science* 244: 359-362, 1989.
2. Dienstag JL: Non A non B hepatitis I. Recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* 85: 439-462, 1983.
3. Koretz RL, Stone O, Gitnick GL: The long-term course of non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology* 79: 893-898, 1980.
4. Alter MJ, Margolis JS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ y cols.: The natural history of community-acquired hepatitis C in United States. The Sentinel Countries Chronic Non-A, Non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 327: 1899-1905, 1992.
5. Ohkoshi S, Tawaraya H, Kuwana K, Harada T, Watanabe M, Higuchi S y cols.: A retrospective study of hepatitis C virus carriers in a local endemic town in Japan. A possible presence of asymptomatic carrier. *Dig Dis Sci* 40: 465-471, 1995.
6. Dubois DB, Gretch D, De la Rosa C, Lee W, Fine J, Blagg CR y cols.: Quantitation of hepatitis C viral RNA in sera of hemodialysis patients: gender related differences in viral load. *Am J Kidney Dis* 24: 795-801, 1994.
7. Yasuda K, Okuda K, Endo N, Ishiwatari Y, Ikeda R, Hayashi H, Yokozeki K, Kobayashi S, Irie Y: Hypoaminotransferasemia in patients undergoing long-term hemodialysis: Clinical and biochemical appraisal. *Gastroenterology* 109: 1295-1300, 1995.
8. Guh JY, Lai YH, Yang CY, Chen SC, Chuang WL, Hsu TC, Chen HC, Chang WY, Tsai JH: Impact of decreased serum transaminase levels on the evaluation of viral hepatitis in hemodialysis patients. *Nephron* 69: 459-465, 1995.

ASPECTOS ACTUALES DEL DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS

9. Dobbelstein H, Korner WF, Mempel W, Gross-Wilde H, Edel HH: Vitamin B6 deficiency in uremia and its complications for the depression of immune responses. *Kidney Int* 5: 233-239, 1974.
10. Vaziri ND, I. Kim: Niveles enzimáticos séricos. En: Daugirdas JT, Manual de Diálisis. Barcelona, Masson S.A., 1996: 399-414.
11. Caramelo C, Bartolomé J, Albalade M, De Sequera P, Navas S, Bermejillo T, Oliva H, Marriot E, Ortiz A, Ruiz Tuñón C, Casado S, Carreño V: Undiagnosed hepatitis C virus in hemodialysis patients: value of HCV RNA determination and liver enzyme levels in HCV antibody negative patients. *Kidney Int* 50: 2027-2031, 1996.
12. Caramelo C, Albalade M, Bermejillo T, Navas S, Ortiz A, De Sequera P, Casado S, Carreño V: Relationships between plasma ferritin and aminotransferase profile in haemodialysis patients with hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant* 11: 1792-1796, 1996.
13. Younossi Z, McHutchison J: Serological test for HCV infection. *Viral Hepatitis Rev* 2: 161-173, 1996.
14. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnik GL, Redeker AG, Purcell RH y cols.: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364, 1989.
15. Alter2 o HO1 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.
16. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB et al: Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *N Engl J Med* 325: 1325-1329, 1991.
17. Lock A, Chien D, Choo Q, Chan T, Chiu E, Cheng I, Houghton M y cols.: Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology* 18: 497-502, 1993.
18. Barrera J, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, Lee S: Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang* 68: 15-18, 1995.
19. Lee SR, Wood CL, Lane MJ, Francis B, Gust C, Higgs CM, Nelles MJ y cols.: Increased detection of hepatitis C virus infection in commercial plasma donors by a third-generation screening assay. *Transfusion* 35: 845-849, 1995.
20. Van der Peol CL, Cuypers HTM, Reusing HW y cols.: Confirmation of hepatitis C virus infection by new four antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 337: 317-319, 1991.
21. Buffet C, Charnaux P, Laurent-Puig P, Chopineau S, Quichon JP, Briantais MJ, Dussaix E: Enhanced detection of antibodies to hepatitis C virus by use of a third-generation recombinant immunoblot assay. *J Med Virol* 43: 259-261, 1994.
22. Brillanti S, Masci C, Ricci P, Miglioli M, Barbara L: Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 15: 998-1001, 1992.
23. Quiroga JA, Binsbergen JV, Wang CY, Pardo M, Navas S, Trines C, Herrero M, Carreño V: Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus core antigen: correlations with viral replication, histological activity, and liver disease outcome. *Hepatology* 22: 1635-1640, 1995.
24. Lesniewski R, Okasinski G, Carrick R, Vant Sant C, Desai S, Johnson R, Scheffel J y cols.: Antibody to hepatitis C virus second envelope (HCV-E2) glycoprotein: a new marker of HCV infection closely associated with viremia. *J Med Vir* 45: 415-422, 1995.
25. Yokosuka O, Omata M, Ito Y, Ohto M: Expression of HCV E2/NS1 protein as a fusion protein with maltose binding protein: Detection of anti-E2/NS1 antibody in chronic liver disease. *Gut* 34: S64-S65, 1993.
26. Nakamoto Y, Kaneco S, Honda M y cols.: Detection of putative E2 protein of hepatitis C virus in human liver. *J Med Virol* 42: 374-379, 1994.
27. Lau JYN, Davis GL, Brunson ME, Qian KP, Lin HJ, Quan S, DiNello R y cols.: Hepatitis C virus infection in kidney transplant recipients. *Hepatology* 18: 1027-1031, 1993.
28. Chan TM, Lok ASF, Cheng IKP, Chan RT: Prevalence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: a longitudinal study comparing the results of RNA and antibody assays. *Hepatology* 17: 5-8, 1993.
29. Huang C-S, Ho M-S, Yang C-S, Lee C-L, Tan CA: Hepatitis C markers in hemodialysis patients. *J Clin Microbiol* 31 (7): 1764-1769, 1993.
30. Couroucé A, Bouchardeau F, Chauveau P, Le Marrec N, Girault A, Zins B, Naret C, Poignet J: Hepatitis C virus infection in haemodialysed patients: HCV-RNA and anti-HCV antibodies (third generation assays). *Nephrol Dial Transplant* 10: 234-239, 1995.
31. Soffredini R, Rumi MG, Lampertico P, Aroldi A, Tarantino A, Ponticelli C, Colombo M: Increased detection of antibody to hepatitis C virus in renal transplant patients by third-generation assays. *Am J Kidney Dis* 28: 437-440, 1996.
32. García-Valdecasas J, Bernal MC, García F, Roldán C, Cerezo S: Factores de riesgo e incidencia de seroconversiones del virus de la hepatitis C en pacientes hemodializados. Estudio con diferentes técnicas serológicas. *Nefrología XVI* (1): 68-73, 1996.
33. Al Meshari, Al Ahdal M, Alfurayh OHA, De Vol E, Kessie G: New insights into hepatitis C virus infection of hemodialysis patients: the implications. *Am J Kidney Dis* 25: 572-578, 1995.
34. Lee D-S, Lesniewski R R, Sung Y-C, Min W-K, Park S-G, Lee K-H, Kim H-S: Significance of anti-E2 in the diagnosis of HCV infection in patients on maintenance hemodialysis: Anti-E2 is frequently detected among anti-HCV antibody-negative patients. *J Am Soc Nephrol* 7: 2409-2413, 1996.
35. Busch MP, Wilber JC, Johnson PJ, Tobler L, Evans CS: Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis C virus RNA. *Transfusion* 32: 420-425, 1992.
36. Davis GL, Lau JYN, Urdea MS, Neuwald PD, Wilber JC, Lindsay K y cols.: Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology* 19: 1337-1341, 1994.
37. Grecht D, Corey I, Wilson J, De la Rosa C, Wilson R, Carithers RJ, Busch M, Hart J, Sayers M, Han J: Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J Infect Dis* 169: 1219-1225, 1994.
38. Nguyen T, Sedghi-Vaziri A, Wilkes L, Mondala T, Pockros P, Lindsay R, McHutchison J: Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepatol* 3: 75-78, 1996.
39. Brillanti S, Gaiani S, Miglioli M, Folli M, Masci C, Barbara L: Persistent hepatitis C viremia without liver disease. *Lancet* 341: 464-465, 1993.
40. Simmonds P: Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21: 570-582, 1995.
41. Fernández JL, Del Pino N, Lef L, Valtuille R, Berridi J, Rendo P, Viola L: Serum hepatitis C virus RNA in anti-HCV negative patients. *Nephrol Dial Transplant* 25: 14-18, 1996.
42. Fernández J, Giulioni P, Del Pino N, Cavalli N, Alberro C, Rendo P, Viola L: Infección por el virus de la hepatitis C en pacientes de hemodiálisis: hallazgos epidemiológicos, clínicos e histológicos. *Nefrología XVI* (4): 353-358, 1996.