

Guías del laboratorio para *screening*, diagnóstico y monitoreo de la injuria hepática*



The National Academy
of Clinical Biochemistry

EDITOR

D. Robert Dufour
Chief, Pathology and Laboratory Medicine
Service, VA Medical Center, Washington, DC;
Professor of Pathology, George Washington
University School of Medicine.

GUIDELINES COMMITTEE

John A. Lott. Professor of Pathology, The Ohio
State University College of Medicine
Frederick S. Nolte. Associate Professor of
Pathology and Laboratory Medicine, Emory
University School of Medicine
David R. Gretch. Associate Professor of
Laboratory Medicine, University of Washington
School of Medicine
Raymond S. Koff. Professor of Medicine,
University of Massachusetts Medical Center
Leonard B. Seeff. Senior Scientist, Hepatitis C
Programs, National Institute of Diabetes,
Digestive, and Kidney Diseases, National
Institutes of Health; Professor of Medicine,
Georgetown University School of Medicine.

* Este documento ha sido traducido con permiso de la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), Washington, DC. La NACB no se hace responsable de la exactitud de la traducción. Los puntos de vista presentados son los de los autores y no necesariamente los de la NACB.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

SECCIÓN II

Pruebas de ácidos nucleicos y marcadores serológicos en hepatitis

Virus de la Hepatitis A (HAV)

El virus de la Hepatitis A es un virus a ARN de la familia de los picornavirus. El HAV se disemina por vía oral-fecal, y causa injuria hepática luego de un período de incubación de unas pocas semanas. El ARN HAV se presenta en materia fecal y plasma antes del período de manifestación de los síntomas clínicos, pero desaparece rápidamente luego de la manifestación clínica de la enfermedad. Anticuerpos IgM para HAV (anti-HAV IgM) están presentes típicamente al comienzo de la aparición de los síntomas, y permanecen detectables por un promedio de 3 a 6 meses luego de la infección (rango < 30-420 días, con un 13,5% de positivos más allá de 4 meses) (128). El anti-HAV total persiste por largos períodos luego de la infección, tal vez durante toda la vida (129); la seroprevalencia aumenta con la edad, con un rango del 11% en niños menores de 5 años a 74% en los mayores de 50 años (130). La vacuna contra HAV induce anti-HAV detectable dentro de las 2 a 4 semanas de la dosis inicial de vacunación (131) y el anticuerpo permanece detectable a los 5 años en el 99% de los individuos con vacunación completa (132). No hay disponibles en el mercado *tests* para la detección de antígeno o ácido nucleico para HAV. Los métodos de inmunoensayo e inmunoelectromicroscopía han sido usados para detectar el antígeno de HAV en filtrados de materia fecal y en otros especímenes y se han utilizado en ensayos para ARN de HAV se han utilizado para documentar estudios epidemiológicos y de investigación.

Recomendaciones: Se debe utilizar IgM anti-HAV para el diagnóstico de la infección aguda por HAV (IB).

La medición de anticuerpos totales debe ser usada para determinar el estado inmune para HAV (IB).

Virus de la Hepatitis B (HBV)

El virus de la Hepatitis B es un virus a ADN del grupo de los hepadnavirus. Estos virus se replican formando un ARN intermediario, que es copiado usando la enzima transcriptasa reversa para regenerar las hebras del ADN. El HBV es transmitido por intercambio de fluidos corporales; se transmite principalmente a través de suero, relaciones sexuales y transmisión de la madre al niño (generalmente ocurre luego del nacimiento). Mientras la infección de HBV es típicamente aguda con recuperación completa en adolescentes y adultos inmunocompetentes, la infección crónica también puede ocurrir. Aproximadamente 1-3% de los adultos sanos, 5-10% de los adultos inmunocomprometidos y 90% de los neonatos expuestos al HBV desarrollan una infección crónica.

El HBV produce varios antígenos proteicos que pueden inducir una respuesta de anticuerpos. El más abundante, el antígeno de superficie HBV (HBsAg) es producido en exceso junto con partículas virales, pero también se puede presentar cuando HBV ADN es integrado dentro del ADN celular y ya no produce viriones infecciosos. El antígeno *core* HBV y los antígenos e (HBcAg y HBeAg) son producidos por la misma región genética en el virus y se encuentran en partículas infecciosas. En la Figura 6 se observa el curso serológico y clínico típico de una infección aguda por HBV (133).

El anticuerpo IgM para HBcAg (anti-HBc) es generalmente considerado de máxima utilidad para el diagnóstico de la hepatitis B aguda (134). También puede estar presente en títulos bajos y fluctuantes en pacientes con hepatitis B crónica, particularmente cuando los pacientes también tienen positivos en plasma HBeAg, HBV ADN o episodios de aumentos de ALT indicando reactivación de la enfermedad (135). El anti-HBc total persiste típicamente durante toda la vida (136). HBsAg se presenta en forma característica y anti-HBs está ausente en la presentación en pacientes con la infección HBV aguda, pero ambos están ocasionalmente ausentes (134), dejando a la IgM anti-HBc como el único marcador de infección ("ventana *core*"). Resultados positivos aislados para anti-HBc también pueden representar un bajo nivel de viremia, pérdida del anti-HBs muchos años después de la recuperación, o un resultado falso positivo (136-138). Hay dos factores asociados con la probabilidad de resultados falsos positivos: bajo nivel de reactividad de anti-HBc y ausencia de anti-HBs usando inmunoensayos sensibles. En varios estudios, virtualmente ninguno con bajos niveles de anti-HBc y negatividad para anti-HBs mostró una respuesta anamnéstica para una inyección única de vacuna con HBsAg, mientras que 35-40% de aquellos con débil positividad para anti-HBc y 50-80% de aquellos con alto nivel de anti-HBc, respondieron (137) (139) (140). La convalecencia de la infección es indicada por la pérdida de

HBsAg y el desarrollo de anti-HBs. Concomitantemente, HBsAg y anti-HBs pueden ser vistos en un número de pacientes con infección crónica de HBV. Este fenómeno parece ser particularmente común en pacientes que se mantienen con hemodiálisis (7%) comparado con otros pacientes positivos para HBsAg (2%) (141). La presencia de anti-HBs en estos grupos no parece tener importancia clínica. Patrones de marcadores serológicos en varias formas y fases de la infección por HBV se muestran en la Tabla IX (142).

Ejemplos de discordancia o perfiles de hepatitis no comunes se pueden observar en la Tabla X.

Los *tests* con resultados discordantes deben ser repetidos y testeados para marcadores serológicos adicionales que deben ser indicados para establecer el diagnóstico correcto (143).

Recomendaciones: *Tests* para HBsAg, anti-HBs, y anti-HBc deben ser realizados para el diagnóstico de infección HBV actual o pasada. En caso de sospecharse infección aguda por HBV se deben utilizar *test* para IgM anti HBc (IB).

HBeAg y anti-HBe no son requeridos para el diagnóstico de Hepatitis B aguda o para la evaluación de rutina del estado HBV (IIIB, E).

En pacientes con resultados discordantes, los *tests* deben ser repetidos; resultados discordantes persistentes deben ser evaluados por un hepatólogo o gastroenterólogo (IIIB).

Tabla IX. Diagnóstico serológico de la infección viral de Hepatitis B (modificada a partir de la referencia 142).

Marcador	Incubación	Infección aguda	Post infección	Infección crónica	Vacunación
HBsAg	+ ^a	+	-	+	-
HBcAg	+	+	-	+/-	-
HBV ADN	+	+	.b	+/-	-
IgM anti-HBc	-	+	-	+/- ^c	-
Total	-	+	+	+	-
Anti-HBe	-	-	+/-	+/- ^d	-
Anti-HBs	-	-	+	-	+

^a detectable; - no detectable; +/- puede ser detectable.

^b Sin métodos PCR (métodos no basados en PCR).

^c Puede ser positivo en 10-15% de los pacientes con reactivación de la infección.

^d Pacientes con infección HBV crónica generalmente tienen HBeAg o Anti-HBe detectables.

En pacientes con presencia crónica de HBsAg, HBcAg y anti-HBe son pruebas útiles para determinar el estado de la infección. HBV ADN se puede presentar en los hepatocitos en dos formas: como virus replicante, conduciendo a la producción de partículas infecciosas, o integrado al ADN del huésped, en una forma no replicativa. HBeAg sólo es producido como parte de virus

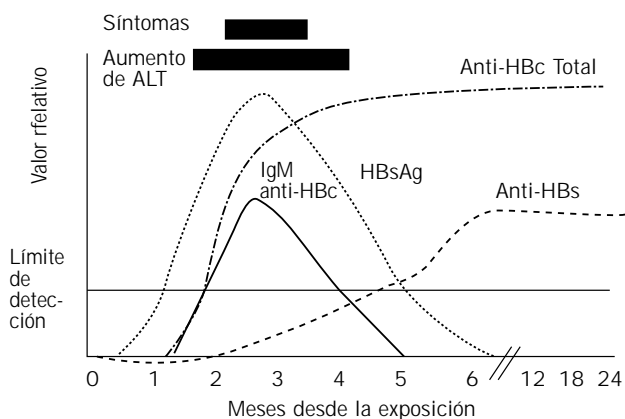


Figura 6. Curso de los marcadores serológicos en la infección aguda de hepatitis B con resolución. Luego de la infección, el primer marcador de infección que aparece es el antígeno de superficie (HBsAg), de 1 a 3 meses luego de la exposición. Aproximadamente 1-2 meses más tarde, la primera respuesta de anticuerpos son anticuerpos IgM para el antígeno core de la hepatitis B (IgM anti-HBc), generalmente alrededor del tiempo de incremento en las actividades de AST y ALT en plasma. En el momento de aparición de la ictericia, la mayoría de los pacientes tienen ambos HBsAg y IgM anti-HBc. Con la eliminación del virus el anti-HBs se hace detectable. En un pequeño porcentaje de pacientes, suele haber un período de transición en el que no se pueden medir ni HBsAg ni anti-HBs. El único marcador comúnmente presente en este tiempo es IgM anti-HBc, un patrón denominado la "ventana core". Aunque no se ilustra en este diagrama, estos pacientes generalmente son positivos para anti-HBe, si un segundo test es necesario para confirmar el resultado de anti-HBc. Con la recuperación de la infección HBV, anti-HBc y anti-HBs persisten durante toda la vida en la mayoría de los individuos.

replicativo, y así puede ser utilizado para determinar indirectamente el estado de la producción de ADN HBV del hepatocito. En el paciente positivo para HBeAg, la pérdida de HBeAg y la seroconversión a anti-HBe positivo están típicamente asociadas con la pérdida de ADN HBV circulante por métodos distintos de la reacción PCR, normalización de aminotransferasas y mejoramiento histológico, implicando un estado de replicación bajo y mejoramiento clínico significativo (144). Las medidas de ADN HBV son más útiles para seguir a pacientes con hepatitis B crónica que reciben terapia antiviral. La pérdida de ADN HBV detectable por un método de hibridación en fase de solución es un indicador más temprano de respuesta a la terapia antiviral

Tabla X. Perfiles discordantes o poco usuales de hepatitis B que requieren evaluación posterior.

- HBsAg positivo / anti-HBc negativo.
- HBsAg, anti-HBs, y anti-HBc positivos.
- Solamente anti-HBc positivo.
- Anti-HBs positivo sólo en paciente no inmunizado.
- HBsAg negativo / HBcAg positivo.
- Positivo para HBcAg y anti-HBc.
- Anti-HBc total negativo / IgM anti-HBc positiva.

que la pérdida de HBcAg (143). Varios ensayos para la detección de ADN HBV están disponibles; los límites de sensibilidad están dados en la Tabla XI. Generalmente no hay estandarización de los ensayos del ADN HBV entre laboratorios.

Tabla XI. Límites de detección inferiores para ensayos de HBV ADN

Método	Límites de detección (copias/mL) ^a
Captura híbrida	3,0 x 10 ⁶
ADN "branched"	0,7 x 10 ⁶
Hibridación líquida	4,0 x 10 ⁴
Reacción de polimerasa en cadena (PCR)	10 ² - 10 ³

^a Los resultados pueden también ser expresados como pg/mL de ADN HBV dividiendo por 2.85 * 10⁵.

El ADN HBV circulante puede ser detectado por métodos sensibles como PCR en un alto porcentaje de pacientes con HBsAg negativo y anti-HBs, anti-HBe, y anti-HBc positivos, meses o años posteriores a la recuperación clínica de una hepatitis aguda (145) o hepatitis crónica (146). La significancia no es clara, ya que la mayor parte del ADN viral se encuentra en complejos inmunes (145), y puede no representar al genoma entero. Un estudio reciente de 7 dadores hepáticos potenciales que eran HBsAg negativos y anti-HBs y anti-HBc positivos encontró formas replicantes del virus dentro de los hepatocitos en 6 de los 7 individuos (147). Similarmente, en pacientes con hepatitis C crónica, el ADN viral HBV es encontrado comúnmente (usando métodos PCR sensibles) tanto en hígado como en suero, particularmente en pacientes con anti-HBc como un marcador aislado HBV (137) (138). Estos estudios sugieren que muchos pacientes que se supuso se habían recuperado de HBV realmente tienen niveles bajos pero controlados de replicación viral persistentes por muchos años luego de la recuperación clínica. No está claro qué nivel de viremia ADN HBV debe ser usado para considerar a un paciente "curado" de la infección HBV para propósitos clínicos.

Recomendaciones: HBeAg y anti-HBe son útiles para monitorear pacientes con positividad crónica HBsAg (IB).

El ensayo cuantitativo de ADN HBV debe ser usado para monitorear la respuesta a la terapia antiviral (IIB).

Un estándar internacional para los tests de ADN HBV debe ser establecido y los fabricantes deben calibrar sus kits contra ese estándar.

Los tests para ADN HBV deben ser cuantitativos y se debe definir la utilidad clínica del rango dinámico para los tests de ADN HBV (IIIB).

Virus de la Hepatitis C (HCV). El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus de ARN de la familia flaviviridae. Hasta ahora el HCV no ha sido cultivado; fue reconocido por detección de secuencias virales a través de la tecnología recombinante, y el genoma entero ha sido ahora secuenciado. Al momento que este documento se escribe, no hay ensayos comerciales disponibles para detectar los antígenos HCV, aunque ha sido desarrollada un ensayo altamente sensible para la proteína del *core* HCV (148).

La mayoría de los *tests* para HCV miden anticuerpos contra HCV. Los *tests* de *screening* para la infección por HCV detectan anticuerpos contra las proteínas del HCV, aparentemente en un promedio de 80 días (rango 33 - 129) luego de la infección usando enzimo-inmunoensayos de segunda generación anti-HCV (EIA-2) (149). Los pacientes inmunocomprometidos y aquellos sometidos a diálisis raramente pueden carecer de anticuerpos detectables por EIA-2 a pesar de otra evidencia de infección viral activa (150). Un EIA de tercera generación (EIA-3) para anti-HCV ha sido aprobado por la FDA para el *screening* de productos hemáticos; contiene antígenos reconfigurados del *core* y NS3 y un antígeno adicional (NS5) no encontrado por EIA-2. EIA-3 provee un ligero aumento en la sensibilidad pero menor especificidad que EIA-2, y acorta el tiempo de detección de anticuerpos a un promedio de 7 - 8 semanas luego de la infección (151). En los pacientes que han eliminado el HCV de la circulación, los títulos de anti-HCV caen gradualmente (152), y eventualmente se tornan negativos en el 6-10% de los individuos infectados (153) (154). Para evaluar una posible transmisión perinatal de HCV, hay que considerar que los anticuerpos maternos son eliminados alrededor de los 12 meses en el 90% de los infantes no infectados y alrededor de los 18 meses en el 100% (155). Aproximadamente el 90% de los infantes infectados tiene ARN HCV detectable en plasma alrededor de los 3 meses de edad (156).

Tests suplementarios para anti-HCV ayudan a resolver resultados por EIA sospechados de falsos positivos. Ensayos por *immunoblot* recombinante (RIBA) contienen los mismos antígenos HCV que los *tests* EIA, junto con superóxido dismutasa (SOD) para detectar anticuerpos no específicos contra proteínas de levaduras (los antígenos recombinantes HCV son típicamente derivados usando las levaduras como vector). Un RIBA positivo es definido como reactividad contra dos o más antígenos HCV de diferentes regiones del genoma, sin reactividad para SOD. Reactividad contra un único antígeno HCV o reactividad multibanda con reactividad para SOD es considerada indeterminada. En poblaciones de alto riesgo para infección de HCV menos del 1% de los especímenes positivos por EIA-2 serán falsos positivos. Adicionalmente, en individuos recientemente infectados, RIBA es positivo en sólo 85% de los casos

(157). Por lo tanto, los *tests* RIBA en poblaciones de alto riesgo no son necesarios para el diagnóstico de hepatitis C (158).

La infección activa por HCV se define por la presencia de ARN HCV en plasma. ARN HCV puede ser detectado dentro de 1 - 2 semanas luego de la infección aguda, semanas antes que la ALT se torne anormal y previo a la aparición de anti-HCV (152). El curso en el tiempo de los marcadores en una infección por HCV típica se ilustra en la Figura 7.

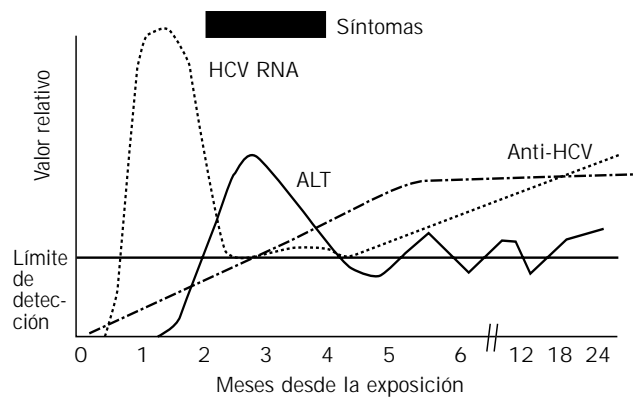


Figura 7. Curso en el tiempo de los marcadores serológicos de infección de hepatitis C aguda. Siguiendo la infección, el primer marcador en aparecer es el ARN HCV usualmente detectable luego de 1-2 semanas de la exposición al virus. La concentración de ARN HCV aumenta gradualmente, pero comienza a disminuir con el desarrollo de la respuesta de anticuerpos; puede ser transitoriamente negativo en aproximadamente 15% de los casos. Anti-HCV aparece en promedio a las 8 - 10 semanas luego de la exposición; el tiempo es más corto con los ensayos anti-HCV de tercera generación que con los de segunda generación. Luego del episodio agudo, que es clínicamente silencioso en la mayoría de los individuos, 75-85% de ellos desarrollará la infección crónica. Durante la transición de la infección aguda a la crónica tanto ALT como el ARN HCV pueden ser intermitentemente positivos; es más probable que persistan positivos durante muchos años luego de la infección aunque el 15-25% de los individuos crónicamente infectados pueden tener ALT normal.

Aunque no han sido aprobados por la FDA los ensayos de PCR por transcripción reversa (RT) para ARN HCV se utilizan comúnmente en la práctica clínica; los más sensibles pueden detectar > 100 copias/ mL de ARN HCV. Los ensayos de ARN HCV no están estandarizados y los resultados cuantitativos pueden variar significativamente entre diferentes laboratorios usando diferentes ensayos (158) (159). ARN HCV es muy susceptible a la degradación por las altas actividades de ARNasa presente en la sangre; por lo tanto, los especímenes de suero para ARN HCV deben ser centrifugados tan pronto como sea posible luego de la forma-

ción del coágulo. Se prefieren especímenes obtenidos con EDTA o citrato de sodio para los *tests* de ARN HCV. El plasma heparinizado es inhibitorio de muchos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, y los especímenes en suero proveen estabilidad subóptima a menos que el suero sea congelado rápidamente luego de la recolección de las muestras. Si la centrifugación es realizada inmediatamente, menos del 10% de ARN HCV se pierde aún si el plasma o suero no es separado de los elementos de la sangre antes de 6 horas como máximo (160). Si se utiliza un tubo separador de suero, los especímenes son estables luego de la centrifugación por 24 horas (160). Es aceptable el almacenamiento por corto tiempo (< 7 días) de suero o plasma a 4 °C. Una vez congeladas, las muestras son estables por lo menos durante tres ciclos de congelamiento – descongelamiento (160). Los ensayos cuantitativos para ARN HCV son a menudo menos sensibles que las técnicas de ARN cualitativas usando la misma tecnología, pero esto no es universal. La versión actual del ensayo de ADN “branched” es la de menor sensibilidad, con un límite inferior de detección de 200.000 copias/mL; sin embargo, los análisis de ADN “branched” tienen mejor linealidad y reproducibilidad que los ensayos por PCR. Un ensayo de ADN “branched” está siendo introducido comercialmente en los Estados Unidos. En pacientes con HCV crónica que no han sido tratados, es inusual encontrar especímenes con ARN HCV no detectable por ADN “branched”, pero positivos por PCR. Resultados de diferentes métodos no pueden ser comparados directamente porque se utilizan diferentes estándares. Actualmente está disponible un estándar de la Organización Mundial de la Salud para ARN HCV para ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (161) y está siendo introducido para su uso por los fabricantes de *kits*.

Recomendaciones: Los *tests* de *screening* EIA para anticuerpos HCV son adecuados para el diagnóstico de infección por HCV actual o pasada en una población de pacientes con alta prevalencia de la enfermedad; no se necesita testeo suplementario en tales pacientes. Si se necesita la confirmación de la infección activa, se debe utilizar ARN HCV (IIB, E).

Deben ser utilizados *tests* suplementarios anti-HCV (RIBA) en poblaciones con baja prevalencia de la enfermedad, o para confirmar infección previa por HCV en un paciente que es ARN HCV negativo (IIIB, E).

Se requiere un mejoramiento de la concordancia intermétodo y de la precisión para los *tests* de ARN HCV; los métodos deberían utilizar un estándar tal como el desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (IIB).

Los especímenes para ARN HCV deben ser plasmas con EDTA o citrato, o ser rápidamente centrifugados para prevenir falsos resultados bajos (IIB).

Hay 6 genotipos principales y más de 90 subtipos de HCV que varían en su distribución mundial. Además, el HCV tiene una alta velocidad de mutación espontánea, produciendo “cuasi especies” discretas que varían de un individuo a otro (162).

Los genotipos 1a y 1b dan cuenta de alrededor de 2/3 de las infecciones en los Estados Unidos; el genotipo I representa el 90-95% de las infecciones en los afroamericanos comparadas con alrededor del 60% en pacientes blancos (163). La amplificación y el secuenciamiento genómicos, seguidos por comparación de secuencias y la construcción del árbol filogenético es el método de referencia para la determinación del genotipo (164). Una variedad de ensayos de *screening* de genotipos han sido descritos incluyendo PCR que utiliza *primers* genotipo específicos (165), fragmentos de polimorfismos de restricción de secuencias amplificadas (166), y una técnica con una sonda comercialmente disponible (167).

Estos métodos se comparan favorablemente con el método de referencia para determinar el genotipo HCV (168).

Virus de la Hepatitis D

HDV es un virus ARN defectuoso que se replica sólo en presencia de HBsAg. Las pruebas para la evidencia de la infección por HDV deben ser consideradas en pacientes con HBsAg positivo con síntomas de hepatitis aguda o crónica, particularmente en aquellos con hepatitis fulminante o donde hay un alto riesgo para infección por HDV. El único *test* serológico para HDV ampliamente disponible en el comercio detecta anti-HDV total. En los pacientes en los cuales el virus ha sido eliminado, el anticuerpo desaparece típicamente entre 1 y 5 años (169). En la mayoría de las situaciones clínicas anti-HBsAg, IgM anti-HBc y anti-HDV total son adecuados para diagnosticar la infección por HDV. Los pacientes con co-infección aguda por HDV son generalmente positivos para anti-HBc IgM, mientras que los pacientes con superinfección HDV son usualmente negativos para IgM anti-HBc.

Virus de la Hepatitis E. El HEV es un virus a ARN que causa hepatitis epidémica aguda y esporádica en los países en desarrollo; no causa hepatitis crónica. En los Estados Unidos la infección por HEV se ha visto raramente como causa de hepatitis, predominantemente entre aquellos que han realizado un viaje a áreas endémicas, aunque al menos ha ocurrido un caso sin antecedentes de viaje (170). Se han desarrollado inmunoensayos para anti-HEV para uso diagnóstico (171). Una evaluación de los múltiples métodos anti-HEV mostró una variación significativa en los títulos reportados, y discordancia entre métodos, aunque los *tests* que detec-

tan anticuerpos para ORF2 fueron más seguros (172). Se encontró un anticuerpo reactivo para antígenos HEV en 15-25% de hombres homosexuales, usuarios de drogas intravenosas, y dadores de sangre en Baltimore, sugiriendo falta de especificidad de los ensayos (173).

Referencias bibliográficas

128. Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1995; 175 (Suppl 1): S9-S14.
129. Skinhoj P, Mikkelsen F, Hollinger FB. Hepatitis A in Greenland: importance of specific antibody testing in epidemiologic surveillance. *Am J Epidemiol* 1977; 105: 140-7.
130. Koff RS. Seroepidemiology of hepatitis A in the United States. *J Infect Dis* 1995; 171 (Suppl 1): S19-S23.
131. Goubau P, Gan Gerven V, Safary A. Effect of virus strain and antigen dose on immunogenicity and reactivity of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1992; 10 (Suppl 1): S114-8.
132. Totos G, Gizaris V, Papaevangelou G. Hepatitis A vaccine: persistence of antibodies 5 years after the first vaccination. *Vaccine* 1997; 15: 1252-3.
133. Hollinger FB, Dreesman GR. Hepatitis viruses. In: Rose NR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds.). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1997.
134. Lemon SM, Gates NL, Simms TE, Bancroft WH. IgM antibody to hepatitis B core antigen as a diagnostic parameter of acute infection with hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1981; 143: 803-9.
135. Czaja AJ, Shiels MT, Taswell HF, Wood JR, Ludwig J, Chase RC. Frequency and significance of immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in corticosteroid-treated severe chronic active hepatitis B. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 119-25.
136. Seeff LB, Beebe GW, Hoofnagle JH, Norman JE, Buskch-Bales Z, Waggoner JG, *et al.* A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *N Engl J Med* 1987; 316: 965-70.
137. Silva AE, McMahon BJ, Parkinson AJ, Sjogren MH, Hoofnagle JH, DeBisceglie AM. Hepatitis B virus DNA in persons with isolated antibody to hepatitis B core antigen who subsequently received hepatitis B vaccine. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 895-7.
138. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Grenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341: 22-6.
139. McMahon BJ, Parkinson AJ, Helminiak C, Wainwright RB, Bulkow L, Kellerman-Douglas A, *et al.* Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1992; 103: 590-4.
140. Aoki SK, Finegold D, Kuramoto IK, Douville C, Richards C, Randell R, *et al.* Significance of antibody to hepatitis B core antigen in blood donors as determined by their serologic response to hepatitis B vaccine. *Transfusion* 1993; 33: 362-7.
141. Foutch PG, Carey WD, Tabor E, Cianflocco AJ, Nakamoto S, Smallwood LA, *et al.* Concomitant hepatitis B surface antigen and antibody in thirteen patients. *Ann Intern Med* 1983; 99: 460-3.
142. Chernesky MA, Gretch D, Mushahwar IK, Swenson PD, Yarbough PO. *Cumitech 18A. Laboratory diagnosis of the hepatitis viruses.* Coordinating ed. S. Young. Washington DC: American Society for Microbiology; 1998.
143. Hollinger FB, Dienstag JL. Hepatitis B and D Viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Ed. Washington DC: ASM Press; 1999.
144. Hollinger FB, Liang TJ. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Hawley PM (eds.). *Fields Virology*, 4th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2000.
145. Yostuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, *et al.* Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998; 27: 1377-82.
146. Lorient MA, Marcellin P, Walker F, Boyer N, Degott C, Randrianatoairna I, *et al.* Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg. *J Hepatol* 1997; 27: 251-8.
147. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Veda Y, Tanaka K, Shimotohno K, *et al.* Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000; 31: 488-95.
148. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura K, Tanaka F, Kiyosawa K, *et al.* Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1802-8.
149. Alter HJ. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 15: 340-53.
150. Lu RH, Hwang SJ, Chan CY, Chang FY, Lee SD. Quantitative measurement of serum HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C: comparison between Amplicor HCV monitor system and branched DNA signal amplification assay. *J Clin Lab Anal* 1998; 12: 121-5.
151. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, *et al.* Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang* 1995; 68: 15-8.
152. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, *et al.* Persistent hepatitis C viremia after acute self-limited posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1995; 21: 639-44.
153. Seeff LB, the NHLBI Study Group. Mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B hepatitis and type C hepatitis: and NHLBI multi-center study. *Hepatology* 1994; 20: 204A.

154. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multi-center study. *Hepatology* 2000; 32: 91-6.
155. Mast AF, Hwang L-Y, Seto D, Nolte FS, Kelly MG, Alter MJ. Perinatal hepatitis C virus transmission: maternal risk factors and optimal timing of diagnosis. *Hepatology* 1999; 30: 499A.
156. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, Ades AE, Hall AJ. Use of polymerase chain reaction and antibody tests in the diagnosis of vertically transmitted hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 711-9.
157. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999; 29: 908-14.
158. Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, Reynard B, Darthuy F, Remire J, *et al.* What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998; 27: 1700-2.
158. Ravaggi A, Biasin MR, Infantolino D, Cariani E. Comparison of competitive and non-competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA. *J Virol Methods* 1997; 65A: 123-9.
159. Lunel F, Cresta P, Vitour D, Payan C, Dumont B, Frangeul L, *et al.* Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and Monitor assays. *Hepatology* 1999; 29: 528-35.
160. Davis GL, Lau JY, Urdea MS. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification assay: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology* 1994; 19: 1337-41.
161. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology assays for HCV RNA. *Vox Sanguinis* 1999; 76: 149-58.
162. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63.
163. Reddy KR, Hoofnagle JH, Tong MJ, Lee WM, Pockros P, Heathcote EJ, *et al.* Racial differences in response to therapy with interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999; 30: 787-893.
164. Forns X, Bukh J. Methods for determining the hepatitis C virus genotype. *Viral Hepatitis* 1998; 4: 1-19.
165. Germer JJ, Rys PH, Thorvilson JN, Pershing DH. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2625-30.
166. Marshall DJ, Heisler LM, Lyamichev V, Murvine C, Olive DM, Ehrlich GD, *et al.* Determination of hepatitis C virus genotype in the United States by cleavage fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3156-62.
167. Pawlotsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, *et al.* Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1734-9.
168. Lau JY, Mizokami M, Kolberg JA, Davis GL, Prescott LE, Ohno T, *et al.* Application of six hepatitis C genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J Infect Dis* 1995; 171: 281-9.
169. Rizetto M, Ponzetto A, Forzani I. Epidemiology of hepatitis delta virus: overview. *Prog Clin Biol Res* 1991; 364: 1-20.
170. Erker JC, Dessai SM, Schlauder GG, Dawson GJ, Mushawar IK. A hepatitis E variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* 1999; 80: 681-90.
171. Yarbrough, PO, Tam AW, Gabor K. Assay development of diagnostic tests for hepatitis E. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds.): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo: Springer-Verlag; 1994.
172. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998; 27: 857-61.
173. Thomas DL, Yarbrough PO, Vlahov D, Tsarev SA, Nelson KE, Saah AJ, *et al.* Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1244-7.