

## HEPATITIS C EN VENEZUELA. COMUNICACION PRELIMINAR

GRETE MULLER, MERCEDES ZABALETA, LUIS H. CALDERA, NICOLAS BIANCO, IRMA V. MACHADO

Centro Nacional de Referencia en Inmunología Clínica e Instituto de Inmunología, SAS-UCV

Quinientas muestras de suero de donantes voluntarios de Banco de Sangre fueron investigadas para determinar la presencia de anticuerpos anti-VHC mediante un método inmunoenzimático de reciente desarrollo a nivel mundial. La prevalencia de muestras verdaderamente positivas fue de 1.2% (6/500), 2 veces superior a la reportada en la gran mayoría de los países industrializados. De estos 6 sueros positivos, uno (16.6%) mostró reactividad simultánea de anticuerpos anticore del VHB. De 12 sueros provenientes de pacientes con diagnóstico de hepatitis No A No B, 3 (25%) resultaron reactivos para anticuerpos anti-VHC mientras de 32 sueros con pesquisa inmunodiagnóstica negativa para VHA y VHB, 4 (12.5%) mostraron anticuerpos anti-VHC. Dos muestras (12.5%) de 16 sueros persistentemente anticore positivos demostraron presencia de anticuerpos anti-VHC resultando este último indetectable en 2 casos de hepatitis crónica autoinmune. Nuestros resultados indican que en Venezuela la VHC constituye un problema significativo de salud pública coexistente en algunos casos con infección por VHB. Palabras claves: Hepatitis - Anticuerpos - AntiVHC Hepatitis C.

HEPATITIS C IN VENEZUELA:  
PRELIMINARY COMMUNICATION

Five hundred serum samples from volunteers blood donors were investigated in order to determine the presence of anti-HCV antibodies by an enzyme-linked immunoassay recently developed worldwide. Prevalence of true-positive samples was 1.2% (6/500), 2 fold higher than the reported prevalence in most of the industrialized countries. From these 6 sera, one (16.6%) showed simultaneous reactivity for HBV anticore antibody. Three sera (25%) from 12 patients with diagnosis of No A No B hepatitis were reactive for anti-HCV antibodies while in a group of 32 sera with negative HAV and HBV screening, 4 (12.5%) showed anti-HCV antibodies. Two samples out of 16 sera persistently positive for anticore demonstrated the presence of anti-HCV antibodies. The anti-HCV antibodies were undetectable in two cases of autoimmune chronic hepatitis. Our results indicate that in Venezuela, HCV represents a significant problem of public health coexisting in certain cases with HBV infection. Key words: Hepatitis, Anti-HCV-Antibodies, C Hepatitis.

Durante la década de los 70, se desarrollaron métodos diagnósticos definitivos para el virus de la hepatitis A (VHA) y el virus de la hepatitis B (VHB), confirmándose que muchos de los casos de hepatitis posttransfusional, no estaban serológicamente relacionados con el virus B<sup>1,2</sup>. El agente responsable de este tercer grupo de hepatitis viral, comenzó a llamar-

se virus no A no B, permaneciendo sin ser identificado estructuralmente por más de una década<sup>3,4</sup>.

Mediante estudios de Biología Molecular realizados en colaboración entre el Centro para el Control de Enfermedades, el Instituto Nacional de Salud y la Corporación Chiron de Estados Unidos, se llegó recientemente al descubrimiento y clonaje molecular del genoma de un agente no A no B, el cual fue designado virus de la hepatitis C (VHC)<sup>5</sup>. El agente

fue caracterizado como un virus pequeño con una cubierta de lípidos esenciales. Estudios de filtración revelaron que el mismo es menor de 60 nm de diámetro; fisicoquímicamente es sensible a solventes orgánicos como el cloroformo. El genoma consistió de una molécula de ARN de cadena sencilla de 10.000 nucleótidos. Todas estas características lo hacen similar a un grupo de virus conocidos como los flavivirus<sup>5,6,7</sup>. Utilizando además, procedimientos de Ingeniería Genética, se obtuvo el clonamiento de una porción del genoma del VHC, representado por el antígeno polipeptídico C-100-3, el cual fue seleccionado para elaborar un radioinmunoensayo (RIA) de fase sólida y posteriormente un inmunoensayo enzimático específico (ELISA), útiles para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus C en las muestras sanguíneas de diferentes poblaciones<sup>8,9</sup>. Mediante una de estas tecnologías, la seroprevalencia de los anticuerpos anti-virus de hepatitis C (anti-VHC) en la población general de diversos como Alemania, Estados Unidos, Gran Bretaña y España, fue establecida estudiando un total de 4.535 muestras de donantes voluntarios de Banco de Sangre, dando como resultado cifras que oscilan entre 0.2 y 1.2%<sup>9,10</sup>.

Por otra parte la prevalencia de anticuerpos anti-VHC en pacientes con hepatitis post-transfusional ha resultado elevada. Así, en pacientes con hepatitis aguda no A no B, la prevalencia varía entre 15 y 25% en diferentes países, y, en pacientes con hepatitis crónica no A no B, la prevalencia oscila entre 67 y 85%<sup>9,10,11</sup>.

La presente comunicación reporta la prevalencia en Venezuela, de anticuerpos anti-VHC en una población de donantes voluntarios de Banco de Sangre, y en pacientes con diagnóstico presuntivo y/o comprobado de hepatitis viral.

## SUJETOS Y METODOS

### Grupo A: Donantes Voluntarios de Banco de Sangre:

Se recolectaron 500 muestras de donantes voluntarios provenientes de tres Bancos de Sangre de Caracas; divididas en la siguiente forma: A1: Trescientos quince muestras del Banco de Sangre del Hospital de Clínicas Ca-

racas. A2: Ciento cuarenta y cinco muestras del Banco de Sangre del Hospital Clínico-Universitario. A3: Cuarenta muestras del Hospital "Jesús Yerena," de Lídice. De las 500 muestras sólo una demostró antígeno de superficie del virus B positivo, confirmado en 2 determinaciones.

### Grupo B: Pesquisa Inmunodiagnóstica:

Sesenta sueros fueron seleccionados provenientes de la consulta de Inmunogastroenterología y de la Sección de Inmunodiagnóstico del Instituto de Inmunología, UCV. Doce sueros pertenecían a pacientes ya conocidos con los siguientes diagnósticos: 6 hepatitis crónica no A no B, 4 hepatitis aguda no A no B y 2 hepatitis crónica autoinmune. Treinta y dos sueros negativos para IgM anti HVA, Antígeno de superficie VHB, IgM anticore, anticore total y anticuerpos antisuperficie fueron incluidos, todos provenientes de pacientes con el diagnóstico presuntivo de hepatitis viral. Finalmente, fueron analizados 16 sueros cuyo único marcador positivo era el anticore total (IgG + IgM) en altos dinteles.

**METODOS:** Para la detección de los anticuerpos anti-VHC presentes en el suero, la técnica utilizada fue el ensayo inmunoenzimático (ELISA) desarrollado por Laboratorios Abbott, División Diagnóstica, Chicago, Estados Unidos.

Este ensayo es de tipo indirecto y utiliza un antígeno (Ag) polipeptídico, el C-100-3, obtenido mediante la tecnología de ADN recombinante. El antígeno se encuentra adsorbido a una fase sólida que en este caso es una perla de poliestireno, a la cual se le agrega una fase fluida, con probabilidad de contener el anticuerpo específico anti-VHC (suero en estudio). De existir el anticuerpo, el mismo se acopla al antígeno presente en la perla de poliestireno, al cual se unirá específicamente, formándose así un complejo inmunológico antígeno-anticuerpo. Este complejo inmunológico posteriormente es enfrentado a un segundo anticuerpo, el cual tiene un conjugado enzimático incluido. Este segundo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de carnero dirigido contra la IgG humana, reconociendo y acoplándose al anticuerpo anti-VHC. El conjugado enzimático es una peroxidasa de rábano picante. Para revelar la existencia de la reacción

inmunológica, se agrega un sustrato cromogénico de la enzima, representado por la solución OPD (O-Fenilenediamina) que contiene peróxido de hidrógeno, desarrollándose un color amarillo-naranja en proporción directa a la cantidad de anticuerpo anti-VHC unido al antígeno C-100-3 adsorbido en la perla.

Finalmente, la reacción inmunológica es analizada espectrofotométricamente. La concentración del anticuerpo presente en la muestra es directamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado. Las muestras cuya densidad óptica revelaron reactividad, fueron evaluadas nuevamente, mediante igual metodología para finalmente determinar aquellas verdaderamente positivas<sup>8, 12</sup>.

## RESULTADOS

Anticuerpos anti-VHC, fueron detectados en 6 sueros (1.2%) de los 500 donantes voluntarios de Banco de Sangre, perteneciendo todos ellos a la Unidad de Banco de Sangre del Hospital de Clínicas Caracas (Tabla 1). No se de-

tectó la presencia de anticuerpos anti-VHC entre los donantes del Hospital Clínico Universitario y del Hospital "Jesús Yerena" de Lídice. El análisis retrospectivo no reveló diferencia de clase socioeconómica entre los donantes estudiados de cada Hospital. En el Hospital de Clínicas Caracas se determinó el anticore a todos los donantes voluntarios resultando positivos 41 (13%) de ellos. Sólo un donante con anticore positivo, fue también positivo para anticuerpos anti-VHC; por lo tanto 1 (16.6%) de los donantes positivos para anti-VHC resultó positivo para anticore (Tabla 1). La Tabla 2 compara la prevalencia de anticuerpos anti-VHC en donantes voluntarios venezolanos con los resultados reportados en otros países.

Cuando se realizó la pesquisa inmunodiagnóstica de anticuerpos anti-VHC entre los 6 pacientes seleccionados, se evidenció que 2 pacientes (33.3%) con diagnóstico de hepatitis crónica no A no B, eran positivos para anticuerpos anti-VHC, ambos pacientes tenían el diagnóstico de hepatitis crónica activa (HCA) por biopsia hepática, antecedentes de intervenciones quirúrgicas, y uno de ellos antece-

TABLA 1  
PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-VHC EN DONANTES VOLUNTARIOS DE BANCO DE SANGRE

	N° Muestras	Anticuerpos Anti-VHC	Anticore	Anticuerpos * Anti-VHC + Anticore
Hospital de Clínicas Caracas	315	6 (1.9%)	41 (13%)	(0.31%)
Hospital Clínico Universitario	145	0	—	—
Hospital Jesús Yerena Lídice	40	0	0	0
Total	500	6 (1.2%)	—	—

% = Porcentaje de muestras positivas.

De 6 muestras positivas para anticuerpos anti-VHC 1 (16.6%) resultó positiva para anticore.

TABLA 2

## PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-VHC EN DONANTES VOLUNTARIOS DE BANCO DE SANGRE A NIVEL MUNDIAL

Países	N° Muestras	Anticuerpos Anti-VHC
Alemania	3.123	13 (0.42%)
Dinamarca	1.204	5 (0.42%)
España	4.132	91 (2.20%)
Estados Unidos	9.998	55 (0.6%)
Francla	25.137	170 (0.68%)
Holanda	5.150	37 (0.7%)
Hungría	629	11 (1.73%)
Italia	11.117	97 (0.87%)
Sulza	884	3 (0.34%)
Venezuela	500	6 (1.2%)

% = Porcentaje de muestras positivas.

dente comprobado de transfusión previa. Un paciente con diagnóstico de hepatitis aguda no A no B, mostró reactividad para anticuerpos anti-VHC, no teniendo antecedentes de transfusiones previas. Los dos pacientes con diagnóstico de HCA autoinmune resultaron negativos para anticuerpos anti-VHC (Tabla 3). De los

TABLA 3

## PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-VHC EN PESQUISA INMUNODIAGNOSTICA DE HEPATITIS VIRAL

	N° Muestras	Anticuerpos Anti-VHC	Anticore
Hepatitis crónica			
No a No B	6	2 (33.3%)	Negativo
Hepatitis aguda			
No A No B	4	1 (25%)	Negativo
HCA			
Autoinmune	2	0	Negativo
Sueros			
No A No B	32	4 (12.5%)	Negativo
Sueros			
Anticore			
Positivos	16	2 (12.5%)	16 (100%)
Total	60	9 (15%)	

32 sueros de pacientes con el diagnóstico presuntivo de hepatitis viral, quienes resultaron

negativos para el virus A y el virus B. 4 (12.5%) mostraron reactividad para anticuerpos anti-VHC. Se detectó la presencia de anticuerpos anti-VHC en 2 sueros (12.5%) cuyo único marcador serológico positivo era el anticore total (Tabla 3).

## DISCUSION

La hepatitis viral no A no B es usualmente diagnosticada por exclusión de marcadores serológicos, es decir, en ausencia de reactividad para el virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr<sup>7</sup>. La hepatitis no A no B se transmite predominantemente por transfusión de sangre y productos de la misma y representa más del 90% de todos los casos de hepatitis asociada a transfusiones reportadas en Estados Unidos<sup>13</sup>. Veinte a 40% de los casos de hepatitis viral aguda notificada en Europa, Australia y Estados Unidos son clasificados dentro del grupo de Hepatitis no A no B documentándose recientemente la existencia de este tipo de hepatitis aún en ausencia de cualquier exposición parenteral<sup>14</sup>.

En el desarrollo del ensayo para detectar anticuerpos circulantes anti-VHC, el antígeno viral fue sintetizado en una levadura recombinante<sup>5</sup>. Así, el epítipo viral (C-100-3) que es reconocido por el anticuerpo anti-VHC está representado por un polipéptido de 363 aminoácidos, codificado por una región no estructural del genoma viral<sup>8,10</sup>. Este polipéptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica de anticuerpos, especialmente reconocida durante la infección crónica por VHC. Por lo tanto, el ensayo inmunoenzimático utilizado en la presente investigación detecta la presencia de anticuerpos específicos en contra de la proteína C-100-3 representativa de un epítipo viral dominante<sup>5</sup>. Mundialmente, el 0.3 al 2.2% de los donantes voluntarios estudiados al azar resultan reactivos para anticuerpos anti-VHC<sup>10, 15-16</sup>. La prevalencia global que hemos encontrado en forma preliminar en nuestro estudio, resultó hasta 2 veces superior a la descrita para donantes voluntarios de países desarrollados, exceptuando a España, que reporta un 2.2% de prevalencia utilizando otro ensayo inmunoenzimático disponible<sup>10</sup>. La prevalencia de 1.2% es similar a la notificada pa-

ra el antígeno de superficie del virus B por la División de Trnsfusiones y Bancos de Sangre del MSAS venezolano<sup>20</sup>. Esta similitud quizás es indicativa de que el problema del VHC en Venezuela puede ser tan serio o grave como el ya demostrado por nosotros para el VHB<sup>20, 21</sup>.

Por otra parte, el anticore representa un marcador sustitutivo para el descarte de posibles donantes capaces de transmitir no sólo HVB sino Hepatitis no A no B<sup>22, 23</sup>. Los productos sanguíneos que son positivos para anticore se correlacionan hasta 3 veces más con hepatitis post-transfusional no A no B que aquellos productos negativos para anticore<sup>9</sup>. En nuestro estudio, un donante voluntario anticore reactivo resultó también positivo para anticuerpos anti-VHC. Más aún, de 16 sueros anticore persistentemente positivo, 2 de ellos demostraron reactividad para anticuerpos anti-VHC. Por tanto, la coexistencia de ambos marcadores es posible y, desde el punto de vista de pesquisa pretransfusional como inmunodiagnóstica, ambos marcadores no son excluyentes. De hecho, nuestras observaciones respecto a la elevada prevalencia de anticore<sup>24</sup> y de anticuerpos anti-VHC en pacientes hemodializados, incluyendo la coexistencia de ambas infecciones en un mismo enfermo, (datos no mostrados) demuestran el impacto que a nivel de salud pública produce el VHC y otros virus inductores de hepatitis asociada a transfusión, incluyendo el VHB y virus no A no B aún no identificados.

Mundialmente se estima que el 20 al 40% de las hepatitis virales clasifican dentro del grupo no A no B. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC en el grupo de pacientes con infección crónica no A no B es variable, llegando a cifras de hasta un 80%<sup>9, 11</sup>.

Es fundamental señalar que los ensayos actuales para la detección de los anticuerpos anti-VHC, incluyendo el utilizado en nuestro estudio, detectan una respuesta de anticuerpos que puede ser tardía en el transcurso de una hepatitis aguda, correlacionándose mucho más con el curso crónico de la infección por VHC<sup>25, 26</sup>. Una reactividad positiva para estos anticuerpos es también observada en los casos de HVC esporádica, es decir, donde la demostración del patrón parenteral ha resultado negativa<sup>10, 26</sup>, por lo cual se considera que el VHC es responsable de un segmento de Hepa-

titis no A no B asociada y no asociada (esporádica) a transfusión<sup>9</sup>. En nuestro estudio, la detección de anticuerpos anti-VHC confirmó el diagnóstico de Hepatitis no A no B tipo HVC post-transfusional en 1 caso y de HVC esporádica en dos casos. La existencia de HVC en un grupo previamente clasificado como Hepatitis no A no B por exclusión de ambos virus (A y B), fue también confirmada en 4 de 32 sueros. Estos resultados indican que no todos los casos de Hepatitis no A no B representan infección por VHC, al menos comprobable por los ensayos actualmente disponibles, los cuales poseen una sensibilidad aún no definida y reconocen sólo un epitope viral ya caracterizado. Por otra parte, la existencia de otro agente causal de Hepatitis no A no B no es descartable<sup>25</sup>.

Dos casos de HCA autoinmune resultaron repetidamente negativos para anticuerpos anti-VHC utilizando éste ensayo. Mediante otro procedimiento inmunoenzimático desarrollado también a escala mundial otros autores han reportado una alta prevalencia de anticuerpos anti-VHC asociada a hepatitis crónica autoinmune por lo cual ha sido sugerido que el VHC puede ser importante en la patogénesis de esta entidad<sup>15, 27</sup>. Sin embargo, los pacientes con HCA autoinmune se caracterizan por presentar hipergammaglobulinemia de alto dintel en un 90% de los casos<sup>28</sup>. Así, recientemente se demostró una estrecha relación entre los valores de densidad óptica obtenidos mediante este último ensayo y las concentraciones de IgG sérica de estos pacientes, lo que implica que este procedimiento puede estar detectando IgG no específica adherida a la placa la cual actuaría como una fase sólida responsable de falsos positivos<sup>29</sup>. Por tanto, resulta controversial el posible papel inmunopatogénico de los anticuerpos anti-VHC en esta enfermedad autoalérgica, lo que respalda nuestro hallazgo de negatividad en estos 2 casos.

En conclusión, la HVC representa en Venezuela un problema significativo de salud pública que requiere ser controlado en principio, con la inclusión a nivel de la pesquisa pretransfusional de la detección de anticuerpos anti-VHC. Ello no excluye la detección del anticore que identifica un subgrupo de donantes de alto riesgo potencialmente infectados previniendo así la posible transmisión del VHB,

VHC y virus de inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>25, 30, 31</sup>. Además del descarte de la sangre con reactividad para anticuerpos anti-VHC, el donante positivo debe ser evaluado en forma integral para determinar un posible estado de portador crónico del VHC con enfermedad hepática establecida.

#### RECONOCIMIENTO:

Al Dr. José Guevara, Jefe de Hematología y Banco de Sangre, Hospital Universitario de Caracas (HUC). Al personal de Banco de Sangre del HUC y del Hospital "Jesús Yerena". A la Sra. Cecilia Peña por la cuidadosa transcripción del manuscrito.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B anti-positive donors. *Ann Intern Med* 1972; 77:691-9.
- Dienstag JL. Non-A, Non-B hepatitis. 1. Recognition, Epidemiology, and Clinical Features. *Gastroenterology* 1983; 85:439-62.
- Dienstag JL, Feinstone SM, Purcell RH, et al. Non-A, Non-B posttransfusion hepatitis. *Lancet* 1977; 1: 560-2.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292:767-70.
- Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
- He LF, Alling D, Popkin T, et al. Determining the size of Non-A, Non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 1987; 156:636-40.
- Bradley D, McCaustland K, Cook E. Posttransfusion Non-A, Non-B hepatitis in Chimpanzees. *Gastroenterology* 1985; 88:773-9.
- Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of Human Non-A, Non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-64.
- HCV Learning Guide. Abbott Diagnostics Educational Services, 1989.
- Alter H, Alter M., Barbara J, et al. Report of the proceedings. First International Symposium Hepatitis C Virus. September 14-15, 1989, Rome Italia.
- Will the Real Hepatitis G stand up? Editorial, *Lancet* 1989; 2:307-8.
- Yarzabal L, Petralanda I, Arango M. La técnica de ELISA y sus aplicaciones en inmunología clínica. En: Manual de Métodos en Inmunodiagnóstico. Editado por: Contreras CE, Feo Figarella E, Ramírez R, Blanca I. Caracas. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, 1985; 197-216.
- Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, et al. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975; 2:838-41.
- Alter MJ, Gerety RJ, Smallwood LA, et al. Sporadic Non-A, Non-B hepatitis: frequency and epidemiology in an urban U. S. population. *J Infect Dis* 1982; 145:886-93.
- Esteban JL, Esteban R, Viladomiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2:294-6.
- Kuhl P, Serdl S, Strangel W, et al. Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* 1989; 2:324.
- Contreras M, Barbara JAJ. Screening for hepatitis C antibody. *Lancet* 1989; 2:505.
- Janot C, Corouge AM, Maniez M. Antibodies to hepatitis C virus in Italian blood donors. *Lancet* 1989; 2:797.
- Van Der Poel CL, Reesink HW, Lelie PN, et al. Antihepatitis C antibodies and Non-A, Non-B posttransfusion hepatitis in the Netherlands. *Lancet* 1989; 2:297-98.
- Machado Bártoli I. A propósito de políticas nacionales de salud en relación con hepatitis viral. *GEN* 1986; 40:217-222.
- Machado Bártoli I. Virus de hepatitis B. Seroprevalencia e inmunopatogenia. En: *Inmunología Clínica 89*. Compiladores: Bianco NE, Machado IV. Conicit, Fondo Editorial, Caracas 1989; pp: 133-37.
- Stevens C, Aach R, Hollinger B, et al. Hepatitis virus antibody in blood donors and their occurrence of Non-A, Non-B hepatitis in transfusion recipients. *Ann Intern Med* 1984; 101:733-38.
- Koziol D, Holland P, Alling D, et al. Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for Non-A, Non-B hepatitis agents in donated blood. *Ann Intern Med* 1986; 104:488-495.
- Machado IV, Zabaleta M, Marlño V, Toro FI, Bianco NE. Coexpression of pre S1, antipre S2 and HBV-DNA in HBsAg chronic carriers and in persistently high-levels anti-HBc carriers. The 1990 International Symposium on viral hepatitis and liver disease. 1990; N° 189, p 90.
- Alter HJ, Purcell R, Shih J et al. 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* 1989; 321: 1494-500.
- Roggendorf M, and Deinhardt F. Prevalence of anti-HVC in chronic liver disease. Update. Testing in the blood bank, from the education department of Ortho Diagnostic Systems Inc. 1989; Vol 4, N° 1.
- Lenzi M, Ballardini G, Cassani F, et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990; 335:258-59.
- Czaja AJ, Davis GL, Ludwig J, et al. Autoimmune features as determinants of prognosis in steroid-