Infección por el virus de la hepatitis C en pacientes que asisten a la consulta dermatológica en la Universidad del Valle, Cali-Colombia

Hepatitis C-virus infection in patients attending the dermatologic clinic of the Universidad del Valle, Cali-Colombia

Gloria Sanclemente, M.D., M.Sc.¹ Carlos de la Roche, M.D.² Héctor Iván García, M.D., M.Sc.³ Rafael Falabella, M.D.² Recibido: Junio 29 de 2006 Aceptado: Agosto 4 de 2006

RESUMEN

E

L VIRUS de la hepatitis C (VHC) es la principal causa mundial de hepatitis postransfusional. La mayoría de los pacientes infectados son asintomáticos, aunque algunos desarrollan ciertos trastornos

cutáneos. Los trastornos cutáneos asociados podrían variar según el país estudiado de acuerdo con tasas locales de prevalencia viral.

Objetivo

Determinar la frecuencia de infección por el VHC en una población dermatológica local y comparar los resultados de un método inmunoserológico y una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Institución donde se realizó el trabajo de investigación: Sección de Dermatología - Departamento de Medicina Interna - Universidad del Valle, Cali - Colombia.

- 1 Profesora Asociada, Sección de Dermatología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. e-mail: gsanclemente@epm.net.co GRID, Sección de Dermatología, Universidad de Antioquia.
- 2 Profesor, Sección de Dermatología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad del Valle. Cali, Colombia, e-mail: rafalabe@emcali.net.co, delaroche@hotmail.com
- 3 Profesor Asociado, Grupo Académico de Epidemiología Clínica (GRAEPIC), Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín. e-mail: higarcia@quimbaya.udea.edu.co

Gloria Sanclemente MD, MSc. Carrera 20 No. 2 Sur-185, cons. 714. Clínica El Rosario, El Tesoro. Tels: 574 326 9214, 574 212 5921 Fax: 574 353 7058. Email:gsanclemente@epm.net.co Medellín, Colombia

Métodos y resultados

Ciento cincuenta y noventa muestras de sangre de pacientes fueron probadas por reacción en cadena de la polimerasa – *transcriptasa reversa* (RT-PCR) y SERODIA-HCV, respectivamente. La prevalencia global de infección fue del 1.3% (100% de sensibilidad [IC95%:19,8%-100%], 100% de valor predictivo positivo [IC95%:94.8%-100%], 100% de valor predictivo negativo [IC95%:94.8%-100%]).

Conclusiones

El VHC no parece detectarse frecuentemente en los pacientes dermatológicos. Las pruebas de aglutinación de partículas son económicas y apropiadas para el tamizaje del VHC.

Palabras clave: Virus de la hepatitis C, piel, reacción en cadena de la polimerasa.

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is the main cause of world posttransfusional hepatitis. Most infected patients are asymptomatic, although some develop certain skin disorders. Cutaneous markers of HCV have been related to local viral prevalence rates; therefore, associated cutaneous disorders could vary depending on the country studied.

Objective

To determine the frequency of HCV infection in a local dermatologic population, and to compare the use of an immuno-serological method and a serum PCR assay.

Methods and results

One hundred-fifty and ninety patient blood samples were tested by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Serodia-HCV, respectively. Two

patients resulted positive by both techniques giving an overall HCV prevalence of 1.3%. (100% Sensitivity (Cl 95%:19.8%,100%), 100% Specificity (Cl 95%:94.8%, 100%); PPV:100% (Cl 95%:19.8%-100%); NPV:100%(Cl 95%:94.8%-100%). Neither risk factor nor any abnormality in liver function tests was found.

Conclusions

HCV does not seem to frequently coexist in our dermatology patients. Antibody particle agglutination tests are inexpensive assays suitable for HCV screening. Large population studies are needed in order to determine real local prevalences of HCV infection and also to determine the specificity and sensitivity of sero-immunological assays compared to PCR techniques. The latter will enable identification of HCV positive patients which is worth regarding their high risk for developing hepatocellular carcinoma.

Keywords: Hepatitis C virus, skin, polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) es la principal causa de hepatitis postransfusional en el mundo¹ y la mayoría de las infecciones por él ocurren en adultos jóvenes con comportamientos de alto riesgo. La forma más eficiente de transmisión del VHC es mediante la exposición percutánea continua, tal como en el abuso de drogas intravenosas o en las transfusiones sanguíneas; sin embargo, la alta prevalencia de infección persistente con el VHC crea un reservorio enorme de personas infectantes, lo que podría explicar que el 40% de los pacientes con hepatitis C activa no tengan factores de riesgo conocidos.² En Colombia se conoce poco de la prevalencia y del comportamiento de la infección por VHC,3 aunque con base en estudios de Centroamérica, donde la prevalencia de VHC está por debajo de 1.5%, se ha estimado que estaría entre 0.8-1% en el país. 4 Un estudio en Cali reportó una frecuencia de 0.74% de anticuerpos contra el VHC en donantes voluntarios de sangre.⁵ Los principales factores de riesgo en Colombia incluyen las transfusiones sanguíneas y las intervenciones quirúrgicas.6

La historia natural de los pacientes infectados con el VHC aún no es clara. La infección tiene un largo período de latencia y 70-80% de los casos desarrollan hepatitis

crónica, pero es usual que haya formas asintomáticas de la enfermedad con pruebas de función hepática normales.⁷

La infección hepática crónica por el virus de la hepatitis C se ha identificado como un factor de riesgo importante para desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC), que es el quinto cáncer en orden de frecuencia en el mundo (80% de los casos ocurren en países en desarrollo).⁸

Las proteínas HCV core y N53 han sido asociadas con el CHC; sin embargo, estas observaciones se basan en estudios en ratones transgénicos y líneas celulares, respectivamente, 9.10 por lo que todavía no se dispone de un método para predecir en seres humanos cuáles casos desarrollarán cáncer hepático.

La mayoría de los pacientes infectados por el VHC no tienen enfermedad sistémica aparente; sin embargo, algunos de ellos desarrollan trastornos cutáneos como crioglobulinemia mixta, liquen plano o porfiria cutánea tarda, y aunque ningún signo cutáneo es específico para diagnóstico de la infección, hasta el 17% de los pacientes positivos pueden presentar manifestaciones dermatológicas.11 Los marcadores cutáneos de infección por VHC han sido relacionados con sus tasas de prevalencia en diferentes áreas del mundo y se ha sugerido que la frecuencia de los trastornos cutáneos relacionados con él podría variar según el país que se estudie. 12 Esto es relevante no solo para el paciente, debido a la posibilidad de tener una enfermedad hepática crónica o fatal, sino también para el dermatólogo por el riesgo aumentado de transmisión.

La técnica más sensible de la que se dispone para diagnosticar la infección por VCH es la RT-PCR, que detecta números bajos de copias del virus (límite de detección: 102-103 copias)¹³ en el suero, lo que permite detectar pacientes con bajos niveles de anticuerpos, al igual que individuos asintomáticos infectados. Su uso está limitado por los altos costos y porque requiere laboratorios con alto desarrollo tecnológico, lo que podría explicar parcialmente las dificultades para identificar los grupos potenciales de alto riesgo en países subdesarrollados y conducir, eventualmente, a una diseminación incontrolada del VHC.

Por lo anterior, los objetivos de nuestro estudio fueron: 1) determinar la frecuencia de infección por el VHC en una población dermatológica de un hospital universitario de referencia; y 2) comparar la eficiencia diagnóstica del método inmunoserológico SERODIA-HCV® con el RT-PCR usado como estándar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo del estudio fue aprobado previamente por el comité de ética de la Universidad del Valle, y se obtuvo consentimiento informado de cada paciente incluido en él. Los pacientes estudiados fueron individuos que acudieron consecutivamente a la clínica dermatológica de la universidad entre enero y marzo de 1998. Debido al alto costo de los estudios solo se incluyeron 150 pacientes para las pruebas modulares. Se excluyeron los menores de 18 años y quienes tenían un diagnóstico previo de infección por VIH.

En cada caso se obtuvo muestra de sangre y se indagó por factores de riesgo conocidos para infección por el VHC (transfusión de sangre, abuso de drogas intravenosas o comportamiento sexual de alto riesgo); también se hizo tamización para enfermedad hepática mediante pruebas básicas tales como: aminotransferasas (ALT, AST), bilirrubinas y fosfatasa alcalina, así como pruebas para descartar infección por el virus de la hepatitis B.

Las muestras se obtuvieron en tubos Vacutainer® sin anticoagulante, después de lo cual se centrifugó la sangre a 12.000 g y se conservó el suero a -70° C en crioviales. El ARN se extrajo mediante un agente caotrópico y se precipitó en alcohol de acuerdo con las instrucciones del estuche RT-PCR Amplicor® (Roche, Francia). Brevemente, un equivalente de 5:1 de suero fue amplificado en una mezcla máster que contenía la ADN polimerasa Thermus termophilus (rTth), un cebador 5` 3` marcado con biotina (KY80,5'GCAGAAAG CGTCTAGCCATGGCGT) y KY78 (5'-biotinil-CTCGCAAG-CACCCTATCAGGCAGT), sales tampón, UNG, dATP, dCTP, dGTP y dUTP. La amplificación de ADN se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer® 2400 con los siguientes ciclos: 2 minutos a 50°C para actividad óptima de UNG, seguidos por 30 minutos de incubación a 60°C para la etapa de la transcriptasa reversa, 40 ciclos de PCR (2 ciclos de 95 °C por 15 s y 60°C por 20 s y 38 ciclos de 90°C por 15 y 60 °C por 20 s) y una extensión final de 4 minutos a 60°C.

El producto de PCR se detectó usando una sonda de fase sólida específica para el VHC, que fue aplicada a platos de micropozos. El producto de PCR marcado con biotina fue desnaturalizado químicamente para formar hebras sencillas, hibridizado a los micropozos y detectado con un sistema de avidita peroxidasa con un lector de ELISA Dynatech MR5000 (Dynatech Laboratories EE.UU.). Las densidades ópticas mayores de 0.6 a A450 se consideraron positivas para infección por el VHC. Todas las técnicas de PCR se llevaron a cabo en el CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas), en Cali, Colombia.

Para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica inmunoserológica SERODIA-HCV® (Fujirebio Inc., Tokio, Japón) en comparación con la PCR, se escogieron al azar y sin conocer los resultados de ésta, 90 de las 150 muestras de suero estudiadas y se las probó por el ensayo inmunoserológico SERODIA-HCV®. Esta es una prueba diagnóstica de aglutinación de partículas *in vitro* para la detección de anticuerpos contra el VHC, que se fabrica usando partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos recombinantes y que se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de los resultados positivos y negativos se calcularon según la metodología descrita por Sackett y cols.¹⁴

RESULTADOS

Se evaluaron 111 mujeres (74%) y 39 hombres (26%) cuyas edades estaban entre 18 y 86 años (promedio de 45). Todos ellos pertenecían a los niveles educativo y socioeconómico bajo (88%) y medio (12%) (cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Aspectos demográficos de los pacientes

Característica	Número	%	
Rango de edad (promedio) en años	18 - 86	45	
Mujeres	111	74	
Hombres	39	26	
Nivel socio-económico: Bajo Medio	132 18	88 12	

Cuadro 2. Distribución por edad y prevalencia de VHC

Edad	Número	%	Prevalencia de HVC
18 – 45	83	55	0
46 – 59	25	17	0
> 60	42	28	4.8
Total	150	100	1.3

Se hicieron 37 diagnósticos dermatológicos en 148 pacientes; los dos restantes estaban sanos a la luz del examen clínico. Cuando el diagnóstico clínico no era claro se hizo biopsia de piel para confirmar la sospecha clínica. En el Cuadro 3 se presentan los diagnósticos y el número de casos de cada uno de ellos.

Dos pacientes, mujeres, resultaron positivas en el RT-PCR Amplicor®, lo que da una prevalencia global de 1.3% de infección por el VHC. Sus respectivos diagnósticos clínicos fueron queratosis seborreica y úlcera venosa.

Cuadro 3. Distribución según diagnóstico dermatológico

Diagnóstico	Número	%
Tumores de la piel *	40	26.7
Cáncer diferente de melanoma	15	10
Úlceras en las piernas	14	9.3
Vitiligo	111	7.3
Enfermedades cutáneas del colágeno **	9	6
Eczema no atópico	8	5.3
Otras enfermedades de la piel ***	8	5.3
Acné ^{***}	7	4.7
Reacciones a drogas	. 5	3.3
Enfermedades cutáneas virales	4	2.7
Infecciones micóticas	4	2.7
Melasma	4	2.7
Psoriasis	4	2.7
Trastornos de la queratinización	3	2
Infecciones bacterianas	3	2
Liquen plano	3	2
Alopecia areata	2	1.3
Enfermedades ampollosas autoinmunes	2	1.3
Dermatitis seborreica	1	0.7
Infestaciones	1	0.7
Otras enfermedades cutáneas	8	5.3
Personas sanas	2	1.3
Total	150	100%

^{*} Queloides, queratosis seborreica, nevus compuestos, intradérmicos y de la unión, queratosis actínica, cuerno cutáneo, acrocordon, melanoma, lipoma, metástasis de cáncer del la glándula mamaria, granuloma piógeno, tricoepitelioma, nevus de Jadassohn, siringoma, dermatofibroma

^{**} Morfea, lupus discoide, esclerodermia y enfermedad mixta del colágeno.

^{***} Liquen escleroatrófico, eritrodermia, dermatosis facticia, elastosis actínica, prúrigo, eritema nodoso, pitiriasis rosada.

^{****} Acné vulgar y rosácea

Cuando se analizaron las 90 muestras estudiadas por ambas técnicas (PCR y SERODIA-HCV®) hubo alto acuerdo de los resultados: las dos pacientes fueron positivas en ambas pruebas (sensibilidad de 100% [IC95%:19.8%-100%], especificidad 100% [IC95%: 94.8%-100%], valor predictivo positivo 100% [IC95%: 19.8%-100%], valor predictivo negativo 100% [IC95%: 94.8%-100%]).

No se identificaron factores de riesgo para infección por el VHC en ninguna de las dos pacientes positivas y sus pruebas de función hepática fueron normales.

DISCUSIÓN

Ningún signo cutáneo es específico para diagnosticar infección por el VHC y hasta el 17% de los pacientes positivos para este virus pueden presentar manifestaciones dermatológicas;^{7,15} las más frecuentes incluyen: crioglobulinemia mixta,¹⁶ liquen plano,^{17,18} porfiria cutánea tarda, psoriasis,¹⁹ y eritema necrolítico acral.^{20,21}

Al carecer de una manifestación cutánea o extra-cutánea especifica, el diagnóstico serológico de la infección por el VHC se basa en pruebas de ELISA de segunda generación; sin embargo, el 20-30% de los pacientes son negativos con esta técnica debido a niveles indetectables de anticuerpos. Por el contrario, algunos informes describen falsos positivos repetidos con los inmunoensayos enzimáticos de tercera generación (EIA-3).²²

El anti-VHC es positivo en más del 90% de los pacientes con infección crónica por VHC y usualmente requiere confirmación por *immunobloting* recombinante (RIBA). No obstante, el RIBA es difícil de interpretar porque 25-90% de los pacientes positivos para anticuerpos pueden ser negativos al estudiarlos con esta técnica.^{23,24} Se afirma que las pruebas inmunológicas son indicadores de exposición previa al virus pero no marcadores de infección activa. Además, en casos de infección aguda con el VHC algunos pacientes no desarrollan anticuerpos, lo que limita aun más el papel diagnóstico de las pruebas inmunoserológicas.²⁵

La RT-PCR, que en la actualidad es la prueba disponible más sensible, puede usarse como marcador de infección activa, ya que posibilita la detección de la viremia antes de la producción de anticuerpos^{26,27} y permite detectar la infección en pacientes inmunosuprimidos con producción limitada de anticuerpos. Por su alta sensibilidad diagnóstica es usada para la tamización habitual de VHC en donadores de sangre,

pero su uso amplio está limitado por sus elevados costos y por el bajo desarrollo tecnológico y pocos recursos de los servicios de salud en los países en desarrollo.

En este estudio usamos la RT-PCR como herramienta diagnóstica para confirmar la infección activa, asintomática o crónica por el VHC y para excluir cualquier resultado falso positivo o falso negativo por los métodos inmunoserológicos.

El 55% de nuestros pacientes eran menores de 45 años y ninguno estaba infectado por el VHC, lo que es similar a una región de Japón donde el 45% de los individuos positivos eran mayores de 41 años,28 pero contrasta con los resultados de la Tercera Encuesta Nacional de Salud v Nutricional de los Estados Unidos (Third National Health and Nutritional Examination Survey - NHANES III), en la cual 65% y 74%, respectivamente, de las personas positivas para anticuerpos y RNA-HCV tenían entre 30 y 49 años.29 Fue interesante que nuestras dos pacientes positivas tuvieran más de 60 años. Esto podría explicarse por simple azar y/o por la clase de población estudiada (en Colombia aún no se han llevado a cabo estudios de prevalencia del VHC y, por lo tanto, no se dispone de datos epidemiológicos); más hipotéticamente, podría corresponder a diferencias locales en el patrón de transmisión viral. Ambos casos positivos en nuestro estudio ocurrieron en mujeres, pero a este hecho no se le puede atribuir ninguna significación dado que la clínica atiende, con mayor frecuencia, a mujeres.

De acuerdo con el número de muestras analizadas en nuestro estudio, la prueba SERODIA-HCV® fue tan buena como el RT-PCR Amplicor® para detectar pacientes con infección por el VHC; sin embargo, ello podría explicarse por el pequeño tamaño de la muestra.

Aunque con los resultados de este estudio se subestima la necesidad de tamizar a los pacientes de dermatología para el VHC, hay que intentar cualquier esfuerzo para identificar a los pacientes infectados, ya que ninguna prueba de función hepática ni ningún signo clínico son útiles para detectarla. Más aún, puesto que un gran número de pacientes no tienen un factor de riesgo identificable, la identificación y el tratamiento de las personas infectadas no solo podrían limitar la transmisión viral sino que también podría ofrecérseles, al menos, una disminución en la progresión a cáncer.

Es interesante que varios de los pacientes de este estudio tuvieran enfermedades de la piel de las incluidas en la lista de manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis C.7,18 Ellas fueron: liquen plano (2%), psoriasis (2,7%) y

vitiligo (7,3%). Sin embargo, aunque la suma de pacientes con estas entidades era del 12%, ninguno de ellos resultó positivo para infección por el VHC. Esto podría explicarse por el limitado número de pacientes o por un patrón local diferente de enfermedades dermatológicas asociadas al VHC.

Si se tiene en cuenta que nuestras dos pacientes positivas tenían enfermedades cutáneas comunes, posiblemente no relacionadas con el VHC, y que no presentaban síntomas ni anormalidades de laboratorio, debiera evaluarse más la justificación de tamizar para el VHC a los pacientes dermatológicos. Pruebas seroinmunológicas de bajo costo tales como SERODIA-HCV® podrían ser una herramienta útil en el diagnóstico y control de la diseminación del VHC en países en desarrollo; sin embargo, no se puede perder de vista que el 20-30% de los pacientes podrían resultar negativos con cualquier prueba seroinmunológica, a pesar de estar infectados.²¹

En conclusión, el VHC no tuvo una frecuencia elevada en nuestra población de pacientes dermatológicos que asistieron a la consulta de un hospital de referencia de tercer nivel de atención, y las dos pacientes que resultaron positivas para él tenían lesiones cutáneas probablemente no relacionadas con la infección viral. Las pruebas seroinmunológicas como SERODIA-HCV® podrían usarse en países en desarrollo para tamizar a la población para el VHC. Se requieren más estudios en otros grupos, preferiblemente no institucionales, no sólo para determinar la prevalencia poblacional de la infección por el VHC, sino también para evaluar el comportamiento diagnóstico de los ensayos seroinmunológicos comparados con técnicas de PCR en personas sanas y enfermas. Lo anterior posibilitará la identificación de los pacientes positivos para el VHC, lo cual está justificado por su alto riesgo para desarrollar carcinoma hepatocelular.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Juan Carlos Restrepo, M.D., Ph.D. y a María Cristina Navas, M.Sc, Ph.D., por su revisión crítica del manuscrito, y al doctor Abraham Blank, por su ayuda técnica.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

- Alter HJ. Post-transfusional hepatitis in the United States. In: Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (ed.). Viral hepatitis and liver disease. Springer-Verlag, Tokyo, Japan 1994; pp:551-553.
- Olynyk JK, Baqcon BR. Recent advances in understanding and management of hepatitis C. Postgrad Med 1995;98:79-92.
- Hoyos A, Vanegas N, Páez E. Epidemiología de la Hepatitis C en Colombia. Acta Med Col 2002;27:209-217.
- De La Hoz F. Epidemiología de la hepatitis C en Latinoamérica y Colombia. Biomédica 2000;20:65-72.
- Cortés A, García M. Prevalencia de marcadores para infecciones transmisibles por transfusión en donantes voluntarios. Col Med 1996;27:3-10.
- Grupo Internacional para el Estudio de las Hepatitis Virales. Hepatitis C: frecuencia de factores de riesgo en Colombia, Cuba, República Dominicana y Venezuela. Rev Col Gastroenterol 1998;13:19-24.
- Degos F. Natural history of hepatitis C virus infection. Dermatology 1996;192:67-69.
- Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. Am J Trop Med Hyg 2000;62:138-141.
- Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, et al. Hepatitis C virus core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. Hepatology 2000;31:1351-1359.
- Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. J Virol 1995;69:3893-3896.
- Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. J Am Acad Dermatol 2001;44:159-179.
- 12. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. Sem Liver Dis 1995;15:5-14.
- Mitsui T, Iwano K, Maudo K, et al. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. Hepatology 1992;16:1109-1114.

- Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine, 2nd edition, Little Brown and company-Boston 1991.
- Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The Germivic. Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatite C. Medicine 2000;79:47-56.
- Lunel F, Musset C, Cacoub P, et al. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. Gastroenterology 1994;106:1291-1300.
- Jubert C, Pawlotsky JM, Pouget F, et al. Lichen planus and hepatitis C virus-related chronic active hepatitis. Arch Dermatol 1994;130:73-76.
- Rebora A, Rongioletti F. Lichen planus and chronic active hepatitis. Acta Derm Veneorl Stockh 1984;64:52-56.
- Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Psoriasis and Hepatitis C. Acta Derm Venereol (Stockh) 1995;75:482-483.
- El Darauti M, Abu El Ella A M. Necrolytic migratory erythema without glucagonoma in patients with liver disease. J Am Acad Dermatol 1995;32:604-609.
- 21. El Daroutil M, Abu El Ella M. Necrolytic acral erythema: ¿a cutaneous marker of viral hepatitis C? Int J Dermatol 1996;35:252-256.
- Tess BH, Levin A, Brubaker G, et al. Seroprevalence of hepatitis C virus in the general population of northwest Tanzania. Am J Trop Med & Hyg 2000;62:138-141.
- Chaudray RK, Andonov A, Mac Lean C. Detection of hepatitis C virus infection with recombinant immunoblot assay and polymerase chain reaction. J Clin Lab Anal 1993;7:164-167.
- 24. Mchutchinson J, Person J, Govindarajan S, et al. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. Hepatology 1992;15:19-25.
- 25. Zeuzem S, Ruster B, Roth WK. Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay (Amplicor

- HCV) for detection of hepatitis C virus. Gastroenterol 1994;32:342-347.
- Puoti M, Zonaro A, Ravagil A, et al. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. Hepatology 1992;16:877-881.
- Young KKY, Resnick R, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse-transcriptase-polymerase chain reaction assay. J Clin Microbiol 1993;31:882-886.
- 28. Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, et al. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: community-acquired infection. The South Kiso Hepatitis Study Group. Gastroenterology 1994;106:1596-1602.
- Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. N Engl J Med 1999;341:556-562.