

Hepatitis viral

Dra. Mónica Suárez G.*

Los estudios realizados hasta el momento permiten identificar a dos virus específicos como los responsables de la mayor parte de las hepatitis agudas observadas en niños y adultos. Estos agentes han sido denominados: a) virus de la hepatitis A o hepatitis infecciosa o de corto período de incubación, y b) virus de la hepatitis B o hepatitis sérica o de largo período de incubación.

Por muchos años la hepatitis A, o infecciosa, se consideró una infección entérica de diseminación a través de la vía fecal-oral y la hepatitis B o sérica, una infección contraída solamente por inoculación parenteral de material contaminado con el virus B. Sin embargo, numerosos estudios han alterado el concepto existente, la hepatitis viral A puede ser contraída por vía parenteral (25, 35) y a su vez la hepatitis B ha sido transmitida tanto experimental (14) como naturalmente a través del contacto directo (19). Todas estas investigaciones crearon conflictos en relación a la clasificación existente hasta ese momento, razón por la cual el Comité Nacional de Investigaciones Hepáticas de la Academia de Ciencias de los EE. UU. (37) ha recomendado referirse a estas enfermedades como: a) Hepatitis viral tipo A (HAV), y b) Hepatitis viral tipo B (HBV).

CURSO CLINICO

Ambos virus producen un cuadro típico, e histopatológicamente igual. La diferenciación clínica es rara vez concluyente, pero existen ciertas características que ayudan a distinguirlas (17, 26).

1. La primera de ellas es el período de incubación: corto, entre 15 y 50 días, para la hepatitis A y largo para la hepatitis B fluctuando entre 45 y 180 días.
2. La forma de iniciación es generalmente aguda y acompañada de fiebre en la hepatitis A, en cambio es más insidiosa en el caso de la hepatitis B, en la cual, el cuadro suele ser más severo, de curso más prolongado y asociado con mayor frecuencia a fenómenos sistémicos como ser artritis, artralgias, anemias, etc.; también se observa que lleva más frecuentemente a enfermedades crónicas del hígado (hepatitis crónica, cirrosis).
3. La ruta principal de infección es diferente en ambos: fecal-oral para hepatitis A, parenteral en el caso de la hepatitis B.
4. Algunos índices de laboratorio, tales como: nivel de inmunoglobulina M y duración de transaminasas, también pueden servir de ayuda en el diagnóstico diferencial.
5. Pero lo que ha tenido mayor importancia fue el descubrimiento del "Antígeno australiano", presente en la hepatitis B, ausente en la hepatitis tipo A (Tabla 1).

*Sección Virología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Sede Santiago Norte.

El curso clínico es extremadamente variable, desde la forma asintomática inaparente o hepatitis anictéricas, a ictéricas hasta llegar a hepatitis fulminante y muerte. La inmensa mayoría de pacientes con hepatitis tipo A ó B se recuperan totalmente; sin embargo, parece existir una mayor incidencia de morbilidad, curso prolongado de la enfermedad y mayor tasa de mortalidad en pacientes con hepatitis B. La persistencia del antígeno superficial, o antígeno australiano, en la hepatitis B está altamente correlacionado con el desarrollo de alguna forma de enfermedad hepática crónica.

EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL

Se ha observado un progresivo aumento en la notificación de nuevos casos de hepatitis. En los EE. UU. se informaron 50.000 casos en el año 1969 y 68.000 casos en 1971 (26); estas cifras obviamente son inferiores a las reales, ya que frente a un curso benigno de la enfermedad no se acude a medios asistenciales. El informe de casos de hepatitis B ha

aumentado en las edades de 15 a 29 años, posiblemente debido al uso de drogas (10, 24, 38).

Hepatitis Viral Tipo A

Generalmente los brotes epidémicos se presentan en grupos familiares, colonias de verano, colegios, etc. En estos casos el principal medio de infección es la vía fecal-oral, siendo las epidemias una consecuencia de la contaminación de agua de bebida, leche, comida, etc. (35). También la infección puede ser transmitida a través de jeringas o agujas contaminadas y vía sanguínea.

Ostras y almejas obtenidas de aguas contaminadas han sido también causa de brotes epidémicos (27, 34). Otra fuente de contaminación son los chimpancés, ocurriendo casos de hepatitis en veterinarios y personas que tienen mayor contacto con dichos animales; la determinación del antígeno B en estos pacientes ha dado siempre resultados negativos.

Tabla N° 1

CARACTERISTICAS DE LAS HEPATITIS VIRALES

	<i>Hepatitis viral tipo A</i>	<i>Hepatitis viral tipo B</i>
1. Período de incubación	15-50 días	45-180 días
2. Tipo de iniciación	aguda	insidiosa
3. Grupo de mayor riesgo	niño, adulto, joven	todas las edades
4. Vía de infección	predominantemente fecal-oral	predominantemente parenteral
5. Presencia del virus/antígeno:		
a) sangre	días	meses-años
b) deposiciones	semanas-meses	presente
c) orina		
6. Signos de laboratorio:		
a) duración de transaminasa elevadas	1-3 semanas	1-6 meses
b) nivel de IgM	significativamente alta	normal-ligeramente alta
c) antígeno superficial B	—	+
7. Terapia		
a) administración de gammaglobulina	previene o modifica el cuadro	previene o modifica siempre que sea inmune específica para Hep-B y de suficiente potencia.

Este virus no presenta características estacionales ni predilección por un determinado grupo de edad, aunque claramente existen grupos de más alto riesgo como son los drogadictos y las personas sometidas frecuentemente a transfusiones. Los casos de hepatitis tipo B aparecen en forma esporádica, frecuentemente asociados a transfusión de sangre contaminada, obtenida generalmente de un portador sano del antígeno B (14). En algunos casos, también se han observado casos de hepatitis B, sin antecedente alguno de exposición parenteral y con evidencias que sugieren contagio por contacto directo.

En cuanto a las medidas de control, frente a la hepatitis tipo A son de vital importancia las medidas sanitarias que prevengan la contaminación, evitando manipuladores de alimentos que sean portadores del virus. La gammaglobulina confiere una protección pasiva al ser inyectada intramuscularmente durante el período de incubación y hasta 6 días antes de la aparición de los síntomas (32). Se recomienda una dosis de 0.02 a 0.04 ml/Kg. para prevención o modificación de la enfermedad (40).

En relación a la hepatitis B, las medidas de control se basan en eliminar como donadores a personas que han tenido hepatitis; dado que la ausencia de historia clínica de hepatitis no descarta la posibilidad que la persona sea un portador, es esencial que cada banco de sangre realice un examen previo al donador con el fin de determinar si es o no portador del antígeno de la hepatitis B. Con respecto a la gammaglobulina y su acción en la hepatitis B, ensayos de hemaglutinación pasiva han revelado que la mayoría de las gammaglobulinas preparadas contienen muy bajas cantidades de anticuerpos B (29). Aunque existen ensayos preliminares que sugieren la eficacia de preparaciones de gammaglobulina hiperinmune (21, 33), es aún demasiado precoz asegurar que ésta sea efectiva en la prevención o modificación de la hepatitis B.

El Consejo Nacional de Investigaciones Hepáticas de los EE. UU. (37) da las siguientes recomendaciones en relación con la hepatitis B:

1. En todo donador de debe hacer el estudio para antígeno superficial B.
2. Cualquier persona en la que se detecte la presencia de antígeno superficial B en el suero, debe ser informada y repetirse el estudio. Si se comprueba la presencia del antígeno, se le debe reexaminar para saber si es portador de enfermedad hepática y realizarse además un seguimiento para determinar si el antígeno persiste.
3. Los pacientes con hepatitis B deben ser considerados infecciosos y por ello tomar todas las medidas en relación con materiales contaminantes que provengan de ellos, a saber, sangre y secreciones.
4. La gammaglobulina corriente no ha demostrado valor alguno en el tratamiento de portadores del antígeno de la hepatitis B y no debe ser usada con ese propósito; se recomienda no usarla, tampoco, como medio profiláctico en los contactos.
5. Se debe intensificar los esfuerzos para informar todos los casos de hepatitis que se presentan.

La hepatitis viral tipo B ha sido la más estudiada, teniéndose actualmente una buena información. Los descubrimientos comienzan en 1961, año en el cual Allison y Blumberg inician una investigación sistemática de sueros de pacientes sometidos a transfusiones, utilizando el método de doble difusión en agar gel. Luego de numerosos estudios en 1963, Blumberg y col (5) descubren el entonces conocido como "antígeno australiano", nombre que se le dio por haber sido aislado de la sangre de un aborigen australiano. En 1966 se asocia este antígeno con la hepatitis B, comenzando desde ese momento a acumularse cada vez mayor número de pruebas sobre esta asociación, la cual actualmente está firmemente establecida y permite distinguir ambos tipos de hepatitis; más del 90% de pacientes con hepatitis tipo B, tienen antígeno superficial B, demostrable por alguno de los métodos serológicos actualmente utili-

zados, variando la sensibilidad según el método. Este antígeno se encuentra con mayor frecuencia durante el período de incubación y fase temprana de la infección aguda (primeras 2 ó 3 semanas); usualmente no se detecta más adelante. La persistencia del antígeno después de la tercera semana sugiere la posibilidad que el paciente pueda transformarse en portador crónico y por ello, debe realizarse determinación de antígeno superficial cada 15 días hasta probar en forma fehaciente la antigenemia crónica (23).

Hepatitis A: el tamaño exacto del virus se desconoce, pero es capaz de atravesar filtros de 100 nm.; resistente al calor (56°C por 30 min), ácido y agentes desinfectantes. Su infectividad puede preservarse por años a -20°C. No parece poseer lípidos esenciales, ya que permanece infectivo luego del tratamiento con éter. Es destruido por calor húmedo (121°C por 20 min.) o calor seco (180°C por 1 hora). (17)

Hepatitis B. El virus de la hepatitis B, pasa a través de filtros de 50 nm; es estable a temperaturas de -20°C ó inferiores por más de 20 años; es resistente al éter; su infectividad se pierde por calentamiento a 60°C por 10 horas ó en el autoclave: 1 min. a 121°C; la antigenicidad se mantiene por un año a temperatura ambiente, ó por más de 15 años a -20°C (17).

Estudios de microscopía electrónica del antígeno de la hepatitis B (9, 19), inicialmente llamado antígeno australiano, han revelado que está presente en tres estructuras diferentes, las cuales pueden ser agregadas con el anticuerpo específico, lo que indica que comparten el antígeno de superficie común. Estos tres elementos son: a) partículas esféricas de 22 nm. de diámetro, que son las más numerosas; b) partículas mayores, semejantes a virus de 40 a 45 nm. de diámetro, que poseen un núcleo central de más o menos 28 nm. con una envoltura interna de 2 nm., un espacio de 4 nm, el que separa la estructura interna de la envoltura externa que tiene más o menos 1 nm. de espesor; c) se encuentran, también formas tubulares con diámetros de aproximadamente 20 nm. y dife-

rentes largos. Preparaciones purificadas del antígeno de la hepatitis B, permitieron demostrar que posee dos determinantes antigénicos: 1) determinante grupo específico, denominado "a", y 2) determinantes tipo específico, que son dos pares de determinantes mutuamente excluyentes "dy" y "wr".

Diferentes trabajos realizados han demostrado la presencia de antígeno no sólo en la sangre, sino que también en saliva, orina y deposiciones (18); aún no se sabe si la presencia del antígeno en éstos se correlaciona con infectividad; pero hasta que no se realicen mayores estudios, tanto orina, saliva, como deposiciones de estos pacientes, deben ser consideradas contaminantes.

Continuando las investigaciones de sueros de pacientes con hepatitis viral tipo B, Dane y col. (9), en el año 1970 detectaron la presencia en estos sueros de partículas de 42 nm. de diámetro que denominaron "partículas Dane", las cuales se transformaron desde ese momento en el candidato principal del virus causal de la hepatitis B. La inmunoelectromicroscopía (1) demostró que anticuerpos contra el antígeno B producían agregación de las partículas Dane.

En estudios posteriores, realizados por Almeida y col. (2), se logró romper la partícula Dane y separar el núcleo interno, pudiendo detectar en el suero de un paciente con hepatitis B, en el cual no existían anticuerpos contra el antígeno superficial, la presencia, a través de inmunoelectromicroscopía de un anticuerpo que aglutinaba los componentes centrales de la partícula Dane y que se conoce actualmente como "anticuerpo antinuclear de la partícula Dane". Con este nuevo descubrimiento, se modifica la nomenclatura y se establece, que existen dos antígenos de la hepatitis B y los correspondientes anticuerpos: 1) antígeno superficial de la hepatitis B, que corresponde al primitivo antígeno australiano, que está presente en la superficie de las partículas Dane, en las formas tubulares y esféricas y 2) antígeno central de la hepatitis B, presente en el núcleo central de las partículas Dane.

Prosiguiendo la investigación de éstas par-

tículas, se logró detectar en el núcleo de células hepáticas infectadas, partículas que semejaban la parte central de las partículas Dane (41); estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-antígeno central, señalaban que primariamente se producía fluorescencia en el núcleo del hepatocito; en cambio, utilizando anticuerpos contra el antígeno superficial se producía fluorescencia citoplasmática. Basada en estas observaciones, actualmente se cree que el componente central es producido en el núcleo de las células hepáticas desde donde se libera al citoplasma, siendo recubierto por las envolturas producidas a nivel citoplasmático y que llevan el antígeno superficial, de esta forma se ensamblaría la partícula Dane; las formas esféricas y tubulares corresponderían a material que conforma la envoltura, el cual se produciría en exceso y se liberaría en forma no ensamblada al torrente sanguíneo (14).

Posteriores confirmaciones a esta teoría las encontramos en los estudios de Kaplan y col. (20), quienes encontraron en preparaciones purificadas de núcleos centrales de partículas Dane, una DNA polimerasa (30), enzima capaz de sintetizar DNA virus específico; esta polimerasa no fue detectada en preparaciones puras de partículas esféricas de 22 nm., ni en las formas tubulares (13). En concordancia con el estudio anterior, Krugman y col. (22), detectaron la presencia de esta DNA polimerasa en el suero de pacientes con hepatitis y observaron que ésta enzima se detecta con posterioridad a la aparición del antígeno superficial, y previo al alza de las enzimas hepáticas, persistiendo por días o semanas en casos agudos y por meses o años en portadores crónicos.

Hoofnagle y col. (15) han estudiado el molde de aparición y persistencia del anticuerpo contra el antígeno central de la hepatitis B, el que tendría las siguientes características: a) se detecta 3 a 4 meses, luego de la exposición al virus; b) se presenta durante el período de antigenemia; c) es previo a la aparición de anticuerpos contra el antígeno superficial de la hepatitis B; d) numerosos estudios sugieren que su título declina

luego de varios años, y e) se le ha detectado repetidamente en el suero de pacientes portadores crónicos del antígeno de la hepatitis B.

Experimentos realizados por Robinson y col. (31) demostraron la presencia de una cadena pequeña de DNA circular doble, en preparaciones purificadas de núcleos de partículas Dane. La presencia de DNA en las partículas Dane, es consistente con la hipótesis de que esta partícula representa el virión de la hepatitis B. El aspecto morfológico de la partícula y la presencia de tan pequeña cadena de DNA, cuyo PM es aproximadamente 1.6×10^6 daltones, indican que esta partícula no pertenece a ninguno de los grupos virales conocidos. La cadena de DNA descrita es menor que la de cualquiera de los virus actualmente conocidos, y por lo tanto su información genética sería muy limitada. Existen 3 funciones virales que ya han sido identificadas en la partícula Dane, cada una de las cuales estaría asociada con una o más proteínas distintas, codificadas por el virus, a saber: a) antígeno superficial; b) antígeno central, y c) DNA polimerasa. Lo anterior, más los hallazgos de diversos laboratorios que han analizado las subunidades estructurales del antígeno superficial purificado, (8, 13, 16) determinando que posee entre 5 y 9 cadenas polipeptídicas, cuyos pesos moleculares varían entre 19.000 y 120.000, permiten pensar que es necesario que el virus posea una mayor información genética que la disponible en el DNA aislado. Esto ha sugerido la posibilidad que el DNA aislado provenga de un virus defectivo; si así fuera, debería ser posible encontrar partículas infectivas que posean un DNA mayor, las cuales quizás por encontrarse en escaso número no han sido detectadas en los experimentos realizados. (11)

El aparentemente insoluble y frustrante problema de crecer el virus de la hepatitis en cultivo de tejidos constituye hasta ahora un gran obstáculo. El uso de cultivo de órgano de hígado de embrión humano, con la técnica desarrollada por Baines, Taylor y Zuckerman, ha dado resultados preliminares que sugieren

que tales preparaciones pueden ser útiles en el cultivo del agente asociado a la hepatitis B. Partículas morfológicamente idénticas a los tres tipos estructurales encontrados en el suero de pacientes con hepatitis B han sido observados en el sobrenadante de cultivos infectados. Estos hallazgos preliminares de microscopía electrónica pueden corresponder solamente a la presencia del antígeno del inoculum original.

Brighton, Taylor y Zuckerman en 1971 (6) inocularon cultivos primarios de células hepáticas con suero poseedor de antígeno hepático, demostrándose compromiso progresivo de las células hepáticas; utilizando anticuerpo específico, conjugando con isotiocianato de fluoresceína, pudieron observar fluorescencia en el citoplasma a los 5 días de cultivo, en la región perinuclear a los 7 días y finalmente en el núcleo a los 11 días; cambios similares fueron observados en cultivos primarios de hepatocitos de embrión humano inoculados con el primer pasaje del sobrenadante. No hubo evidencias de efecto citopático.

Carver y Seto en 1971 (7) también describieron un ensayo no citopático; utilizando células WJ 38, expuestas a suero que posea antígeno superficial de la hepatitis B, encontraron que las células se hacen resistentes a la infección por virus Newcastle después de 5 a 12 días, fenómeno que se detectó a través de la técnica de hemadsorción.

En 1973, Panouse-Perrin y col (8) presentan un estudio realizado en cultivos primarios de células hepáticas humanas, inoculadas con suero antígeno positivo. Se controló la evolución por microscopía electrónica y ensayos inmunológicos. En cada caso, se observaron dos etapas claras en la replicación del virus B: 10 a 20 días postinoculación de las células se observó proliferación de formas icosaédricas llenas (25 a 27 nm) o vacías (20 nm); en esta etapa no se detectó el antígeno B superficial. En pasajes posteriores se detuvo la formación de estructuras icosaédricas, pudiendo observarse la aparición de estructuras organizadas, semejantes a partículas Dane y formas esféricas y tubulares; se detectó la presencia de antígeno superficial B, pero sólo

a través del método de radioinmunoensayo que es la técnica de máxima sensibilidad conocida actualmente. Los cultivos controles permanecieron sin alteración.

Mientras se ha obtenido un enorme progreso en relación a los conocimientos de la hepatitis B, las investigaciones con respecto a la Hepatitis A, permanecen estacionarias, debido principalmente a la ausencia de un marcador antigénico como el que existe para la Hepatitis B. En 1970, Ferris y col (11) detectaron la presencia de una partícula semejante a un virus en extractos fecales de pacientes con hepatitis viral tipo A, las cuales eran diferentes a las partículas Dane de la hepatitis viral tipo B. Recientemente Ferris y col, (12) utilizando inmunoelectromicroscopía, describieron la presencia de partículas semejantes a un virus, de 27 nm de diámetro y de características diferentes a las observadas en hepatitis virales tipo B, en deposiciones de pacientes con hepatitis aguda tipo A. De confirmarse estos hallazgos, se desencadenarán investigaciones masivas en relación a la hepatitis viral tipo A.

Mis agradecimientos a la Dra. Carmen Grado Díaz, por su valiosa cooperación.

REFERENCIAS

1. *Almeyda, D.J.* 1971. *Postgrad. Med. J.* 47: 484-487.
2. *Almeyda, J.D.; Rubinstein, D.; Stott E.J.* 1971. *Lancet* 2: 1225-1227.
3. *Almeyda, J.D.; Waterson, A.P.* 1969. *Lancet* 2: 983-986.
4. *Alter, H.J.; Holland, P.V.; Purcell, R.H.* 1974. *Jama.* 229: 293-294.
5. *Blumberg, B.S.; Sutnick, A.I.; London, W.I.; Milman, I.* 1971. *Perspect Virol.* 7: 223-240.
6. *Brighton, W.D.; Taylor, P.E.; Zuckerman, A.J.* 1971. *Nature New Biology.* 232: 51-58.
7. *Caver, D.H.; Seto, D.S.* 1971. *Science N.Y.* 172: 1265-1267.
8. *Chairez, R.; Hollinger, F.B.; Brunschwig, J.P.; Dreesman, G.R.* 1975. *J. Virol.* 15: 182-190.
9. *Dane, D.S.; Cameron, C.H.; Briggs, M.* 1970. *Lancet.* 1: 695-698.
10. *Disnakes, W.E.; Karchmer, A.W.; Johnson, R.F.; Dougherty, W.J.* 1968. *Jama.* 206: 1948-1052.
11. *Ferris, A.A.* 1970. *Lancet.* 2: 243-244.

12. Ferristone, J.M.; Kapikian, A.Z.; Purcell, R.H. 1973. *Science*. 182: 1026-1028.
13. Gerin, J.L. 1972. In G. N. Vyas, H.A. Perkins and Schmidt (ed) *Hepatitis and blood transfusion*. Grum and Stratton, New York, p. 205-219.
14. Havens, W.P. Jr.; Paul, J.R. 1965. Horsfall FL, Tnm I (ed) *Viral and Rickettsial infectious of man*. Philadelphia JB, Lippincott, ps. 965-993.
15. Hoofnagle, J.H.; Gerety, R.J.; Barker, L.F. 1973. *Lancet*. 2: 869-873.
16. Howard, C.R.; Zuckerman, A.J. 1974. *Intervirolology*. 4: 31-44.
17. Hollinger, F.B. 1974. "Hepatitis viruses" *Manual of Clinical Microbiology* Chapter. 90: 819-833. Lennette, E.H.; Spanling, E.H. and Truant. I.D. (ed) *American Society for Microbiology*, Washington D.C.
18. Irwin, G.R.; Allen, A.M.; Bancraft, W.H.; Karwacki, J.J.; Brown, H.L.; Pinkerton, R.H.; Willhight, M.; Top, F.H. Jr. 1975. *Infection and Immunity*. 11: 142: 142-145.
19. Koff, R.S.; Isselbacher, K.J. 1968 *New Engl J. of Med*. 278: 1371-1380.
20. Kaplan, P.M.; Greenman, R.L.; Gerin, J.L.; Purcell, R.H.; Robinson, W.S. 1973. *J. of Virol*. 12: 995-1005.
21. Krugman, S.; Gillis, J.P.; Hammond, J. 1971. *J. Amer. Med. Ass.* 218: 1655-1670.
22. Krugman, S.; Hoofnagle, J.H.; Gerety, R.J.; Kaplan, P.M.; Ferin, J.L. 1974. *New Engl. J. of Med*. 290: 1331-1335.
23. Kofman, S.; Holmes, A.W. 1974. *Abbott Laboratories*, North Chicago-Illinois.
24. Lowria, D.B.; Henle, T. *Rose J.* 1967. *Ann Intern. Med.* 67: 1-22.
25. Murray, R. 1955 *Bull N.Y. Acad. Med.* 31: 341-358.
26. Melnick, J.L.; Hollinger, F.B.: In H. Popper and F. Schaffner (ed) *Progress in liver diseases*, vol. 4 grune and Atratton Inc. New York.
27. Melnick, J.L. 1957. F.W. Hartman (ed) *Hepatitis Frontiers*, Boston, Little, Brown, ps. 211-225.
28. Panouse-Perrin, J.; Rackman, F.; Couraouce-Panty, A.M.; Dupuy, J.M. 1973. "Culture of hepatitis B. virus on a human cell line of hepatic origin, preliminary results".
29. Prince, A.M.; Szmuness, W.; Woods, K.R.; Grady, G.F. 1971. *New Engl. J. of Med.* 285: 933-938.
30. Robinson, W.S.; Greenman, R.L. 1974. *J. of Virol*. 13: 1231-1236.
31. Robinson, W.S.; Clayton, D.A.; Greenman, R.L. 1974. *J. of Virol*. 14: 384-391.
32. Stokes, J. Jr. 1962. *Amer. J. Med.* 32: 729-733.
33. Soulier, J.P.; Blatiriz, C.H.; Couraouce, A.M.; Benamon, D.; Amonch P., Drouet, T. 1972. *Amer. J. Dis. Child.* 123: 429-434.
34. Taylor, F.B.; Eagen, J.H.; Smith, H.F.D. Jr.; Coene, R.F. 1966. *Amer. J. Publ. Health.* 56: 2093-2105.
35. Ward, R., and S. Krugman. 1962. *Prog. Med. Virol.* 4: 87-118.
36. Zuckerman, A.J. 1970. *Vox Sag.* 19: 304-310.
37. Committe on viral hepatitis, National Council. 1972. *Morbidity Mortality weekly Rep.* 21: 1-2.
38. Hepatitis surveillance II. 1970. *Center for Disease Control, Rep.* 32: 9-14.
39. Hepatitis surveillance II. 1971. *Center for Disease Control, Rep.* 34: 8-10-14.
40. *Public Health service advisory.* 1969. *Morb Mort weekly, Rep.* 18: 6-8.