

HEPATİT C VİRUSU (HCV) ENFEKSİYONU TANISINDA KULLANILAN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ •

Meral Gültekin*, İnci Süleymanlar**, Aslı Baykal***, Gülşen Yakupoğlu****, Fahri Işıtan**, Levent Ündar*****, Gültekin Süleymanlar****

ÖZET

Sunulan çalışmada, HCV enfeksiyonu tanısında kullanılan çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi amaçlandı. 17 Non-A Non-B Hepatit (NANBH) olgusu, 73 hemodiyaliz hastası ve 80 kan donöründe HCV Spot test, EIA ile anti-HCV varlığı araştırıldı; doğrulayıcı yöntem olarak Lia Tek III ve HCV Blot 3.0 immunoblot testler kullanılarak duyarlılık ve özgüllükleri saptandı. HCV Spot test ve EIA'nın duyarlılıkları sırası ile % 98.1, % 98.1 ; özgüllükleri % 89.8 ve % 86.4 idi. 170 örneğin 164'ünde (% 96.5) her iki test ile aynı sonuç alındı. Cihaza gereksinim duyulmadan kolay ve hızlı bir şekilde uygulanan HCV Spot test tarama testi olarak kullanılabilir güvenlidir. EIA ile yalnızca olumlu sonuç alınan örneklerin % 68.8'inin COI (Cut Off Index) değeri 5'in altında idi. Immunoblot testlerde reaksiyon en sıklıkla kor antijenine karşı saptandı. Kronik (kr.) hepatit gelişmiş hemodiyaliz hastalarında Non-Strüktürel (NS) 5 Ab pozitiflik oranı (% 52.6) ; kronik hepatite ilişkin herhangi bir bulgusu olmayan hastalarda saptandı (% 13.6) anlamlı derecede fazla idi (p = 0,019). NS5 Ab reaktivitesi hepatit gelişiminin prognostik bir göstergesi olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler : HCV enfeksiyonu; HCV Spot test; immunoblot test, kan donörleri; hemodiyaliz hastaları, NANBH; NS5 antikoru.

SUMMARY

EVALUATION OF THE VARIOUS ASSAYS IN THE DIAGNOSIS OF HCV INFECTION

In the present study, we aimed to evaluate the diagnostic performance of the assays. We tested serum samples from 17 NANBH, 73 hemodialysis patients and 80 blood donors for anti-HCV by using HCV Spot Assay and EIA. We evaluated the performance of the screening tests by comparing the results with immunoblot tests (Lia Tek III and HCV Blot 3.0) as confirmatory assay. The sensitivity and specificity were 98.1% and 89.8%, for HCV Spot Assay and 98.1% and 86.4%, for EIA, respectively. Results of the spot assay and EIA agreed very well for 164 of 170 (96.5%) samples tested. HCV Spot Assay is simple and quick to perform and can be used as a screening test without any equipment. Of the samples with false-positive EIA results, 68.8% had weak EIA reactivity (COI<5). The core antigen was the most reactive antigen in the immunoblot tests. The antibodies to NS5 region of HCV genome were found to be detected more frequently in the hemodialysis patients with chronic hepatitis than the patients without any evidence of liver dysfunction (52.6% and 13.6%, respectively, p=0,019). The NS5 Ab reactivity can be a prognostic marker of developing liver damage.

GİRİŞ

Viral hepatit alfabetini hızla okumakta olduğumuz günümüzden geriye baktığımızda, bu alanda özellikle son yıllarda ilgi çekici ve hızlı gelişmeler olduğunu görüyoruz (1). 1940'lı yıllarda enfeksiyöz ve serum hepatitleri şeklinde gruplandırılan vi-

ral hepatit olguları, Hepatit A Virus (HAV) ve Hepatit B Virus'unun (HBV) gösterilmesi, serolojik testlerin geliştirilmesi sonucunda etyolojik olarak tanımlanmaya başlanmış, ancak kısa bir süre sonra HAV ve HBV serolojik göstergeleri ile açıklanamayan transfüzyon hepatiti olgularının varlığı dikkat çekerek, etken(ler) NANBH virusları olarak

• Bu araştırmanın bir bölümü XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur (7-10 Mayıs 1996, Antalya)

* Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD

** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı

*** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya Ünitesi

**** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı

***** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi

adlandırılmıştır (2,3,4). Kloroforma duyarlı, parenteral NANBH virusu, HCV olarak taksonomide yerini almış ve genomunun özellikleri belirlenmiştir (5).

HCV'nin klonlanma çalışmaları sırasında elde edilen c100-3 antijeni kullanılarak yapılan antikor aramaya yönelik araştırmalar özellikle hemodiyaliz hastaları olmak üzere çeşitli risk gruplarında HCV enfeksiyonunun önemini ortaya çıkarmıştır (6,7,8). Ancak, I.kuşak ELISA anti-HCV testleri yeterli duyarlılık ve özgüllükte olmadığından (9), c22, c33-c antijenlerini de içeren II.kuşak ve genomun nonstrüktürel (NS) 5 bölgesine ait proteinlerini de içeren III.kuşak ELISA testleri geliştirilmiştir (10,11). HCV genomunun strüktürel ve NS antijenlerine karşı oluşmuş antikorları nitrosellülöz şeritler üzerinde belirleme esasına dayanan immunoblot yöntemleri, doğrulayıcı antikor saptama testleri olarak uygulanmaya başlanmıştır (12,13).

Sunulan araştırmada; kan donörlerinde, hemodiyaliz hastalarında ve NANBH olgularında anti-HCV araştırılmasında kullanılan Spot test ve ELISA yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin saptanması ; iki immunoblot testi ile saptanan reaksiyonların karşılaştırılması ve klinik veriler ışığı altında HCV tanısına yönelik testlerin tartışılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmada toplam 170 serum örneği çalışıldı. Bunlardan 73'ü Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Nefroloji Bilim Dalı tarafından izlenen hemodiyaliz hastalarından elde edildi. 17 örnek, Haziran 1994 - Ocak 1996 tarihleri arasında saptanan ve -70°C'de saklanan NANBH olgularına ait serumlardı. Sağlıklı kontrol grubu olarak da Kan Bankası'na başvuran 80 kişinin serumları çalışıldı.

Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Tüm serum örneklerinde HCV Spot test ve EIA yöntemleri ile anti-HCV varlığı araştırılarak, doğrulayıcı yöntem olarak iki immunoblot test kullanıldı.

HCV Spot test (Genelabs Diagnostics, Singapore) : HCV genomunun strüktürel ve NS bölgelerine ait rekombinant antijenler membrana tespit edilmiş olup, serumda anti-HCV varlığı, cihaza gereksinim duyulmadan yapılan, 6-7 dakika süren bir dizi işlem sonucunda, enzimatik reaksiyonla kırmızı bir nokta şeklinde görünür hale getirilmektedir. Yalancı negatifliği önlemek amacı ile membranda anti-human IgG içeren bir bölge de bulunmaktadır. Bu

nedenle, pozitif sonuç iki kırmızı nokta şeklinde belirlemekte; sadece anti-human IgG noktasında saptanan kırmızı renk negatif olarak değerlendirilmektedir.

UBI HCV EIA 4.0 (Organon Teknika) : HCV genomunun kor, NS3, NS4 ve NS5 bölgelerine ait sentetik peptidlerin antijen olarak kullanıldığı ELISA yöntemidir. Çalışma, Tek Time otomatize ELISA cihazı ile yapıp, sonuçlar COI (test serumunun optik dansitesi/cutt off değeri) olarak ifade edildi.

HCV Blot 3.0 (Genelabs Diagnostics, Singapore) : Üzerinde rekombinant kor, NS3-1, NS3-2, NS4 ve NS5 proteinlerin yer aldığı, nitrosellülöz şerit; serum, konjugat ve substrat ile muamele edilerek, kontrollere göre bantların reaktivitesi değerlendirildi. İki veya daha fazla antijene 1+ veya üzerinde reaksiyon saptanması pozitif ; tek antijene karşı saptanan reaktivite ise "indeterminate" olarak yorumlandı.

Lia Tek HCV III (Organon Teknika) : Nitrosellülöz şerit üzerinde; sentetik C1 (kor), C2 (kor), E2/NS1, NS4, NS5 ve rekombinant NS3 antijenlerinin yer aldığı bir "line immunoassay"dir. Reaksiyon saptanan bant sayısı en azından 2 ve reaksiyon 1 + veya üzerinde ise, ya da 2 + veya daha reaktif tek bant saptanmış ise sonuç pozitif olarak değerlendirildi. Tek bantta 1+ reaktivite, "indeterminate" kabul edildi.

BULGULAR

Anti-HCV varlığı araştırılan toplam 170 serum örneğinin 67'sinde (% 39.4) EIA; 63'ünde (% 37.1) Spot test ile pozitiflik saptandı. Altı örnekte her iki test ile farklı sonuç alındı. Bu serumlarda immunoblot test sonucu negatif idi. Spot test ve EIA arasında % 96.5 oranında uyum olduğu gözlemlendi (Tablo 1).

Anti-HCV tarama testlerinin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesinde immunoblot yöntem sonuçları referans olarak kullanıldı. Testlerden herhangi biri ile pozitif bulunan örnekler ve testlerden biri ile pozitif diğeri ile indeterminate saptanan örnekler sonuç değerlendirmede pozitif olarak ele alındı (Tablo 2).

Kan donörlerinde HCV Spot test ve EIA ile seropozitiflik saptanan 2 örnekten biri immunoblot yöntemi ile doğrulandı (Tablo 3).

Onyeddi NANBH olgusunun 10'unda (% 58.8) her iki tarama testi ile de anti-HCV saptandı ve tümü doğrulama testi ile olumlu bulundu. Hemodiyali-

Tablo 1. HCV Spot test ve EIA sonuçlarının karşılaştırılması.

E I A	Spot Test	
	Negatif	Pozitif
n (%)	n (%)	n (%)
Negatif		
103 (60.6)	102 (99.0)	1 (1.0)
Zayıf pozitif (COI < 5)		
10 (5.9)	2 (20.0)	8 (80.0)
Kuvvetli pozitif (COI ≥ 5)		
57 (33.5)	3 (45.3)	54 (94.7)
Toplam		
170 (100.0)	107 (62.9)	63 (37.1)

Tablo 2. İmmunoblot test sonuçları

Test sonucu	Lia Tek III	HCV BLot 3.0	Lia Tek III ve/veya HCV Blot 3.0
Negatif	121	120	118
İndeterminate	1	4	3
Pozitif	48	46	49

Tablo 3. Kan donörlerinde HCV spot test, EIA ve immu-
noblott test sonuçları (n= 80)

İmmunoblot	n	Spot test*/EIA**	
		Negatif/Negatif	Pozitif/Pozitif
Negatif	79	78/78	1/1
İndeterminate	0	0/0	0/0
Pozitif	1	0/0	1/1
Toplam	80	78/78	2/2

* Duyarlılık: % 100.0; özgüllük: % 98.7

** Duyarlılık: % 100.0; özgüllük: % 98.7

liz hastalarında ise Spot test ile olumlu örneklerin % 78.4'ü ; EIA ile olumlu örneklerin % 72.7'si doğrulandı. İmmunoblot yöntem ile reaktivite gösteren ancak tarama testlerinde anti-HCV saptanamayan olguda kronik hepatit mevcuttu. EIA ile pozitiflik saptanan hasta serumlarının % 23.1'i yalancı negatif idi (Tablo 4).

Tüm olgular dikkate alındığında; her iki tarama testinin duyarlılığı % 98.1 ; özgüllüğü Spot test için % 89.8 ; EIA için % 86.4 idi.

EIA aktivitesi zayıf olan 14 serumun 11'i (% 78.6) immunoblot testler ile negatif bulundu. Buna karşın COI'i 5 ve üzerinde olan örneklerin % 90.6'sında anti-HCV varlığı doğrulandı.

Tablo 4. Hastalarda HCV spot test, ELISA ve immunoblot test sonuçları (N: 90)

İmmunoblot	n	Spot test*/EIA**	
		Negatif/Negatif	Pozitif/Pozitif
Negatif	39	28/24	11/15
İndeterminate	3	0/0	3/3
Pozitif	48	1/1	47/47
Toplam	90	29/25	61/65

* Duyarlılık: % 98.0; özgüllük: % 71.8

** Duyarlılık: % 98.0; özgüllük: % 61.5

Tablo 5. EIA sonuçlarının COI değerleri ve immunoblot sonuçları (n= 170)

EIA n	Negatif (n)	İmmunoblot	
		İndeterminate (n)	Pozitif (n)
Negatif	102	0	1
Zayıf pozitif (COI <5) (14)	11	3	0
Kuvvetli pozitif (COI ≥5) (53)	5	0	48
Toplam (170)	118	3	49

Yalancı pozitif EIA örneklerinin % 68.8'inin EIA aktivitesi zayıftı (COI<5) (Tablo 5).

İmmunoblot testlerde saptanan reaktif bantların sayısal dağılımında testler arasında fark gözlenmedi. En sıklıkla saptananlar kor antikoru idi (Tablo 6). İki farklı immunoblot yönteminde genomun aynı antijenlerine karşı farklı yanıt alınan serum örneklerinin olması dikkat çekici idi.

Tablo 7'deki veriler sadece hemodiyaliz hastalarına aittir, çünkü NANBH olgularında kronik hepatite yönelik değerlendirmeler tamamlanamamıştır.

Tablo 6. İmmunoblot testlerde saptanan reaktif bantlar

Testler	Kor			E2/NS1		NS3		NS4		NS5	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Lia Tek III	51	41	80.4	25	49.0	32	67.7	28	54.9	19	37.3
HCV Blot 3.0	49	40	81.6			38	77.6	30	61.2	17	34.7

Tablo 7. Hemodiyaliz hastalarında immunoblot yönteminde saptanan reaktif bantların dağılımı

Kronik Hepatit Bulguları	Kor			NS3-1		NS3-2		NS4		NS5	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Var	19	14	73.7	17	89.5	11	57.9	12	63.2	10	52.6
Yok	22	17	77.3	18	81.8	14	63.6	14	63.6	3	13.6
Toplam	41	31	75.6	35	85.4	25	61.0	26	63.4	13	31.7

Hemodiyaliz hastalarının 9'u karaciğer biyopsisi, 10'u klinik ve laboratuvar izlemi ile olmak üzere toplam 19'u kronik hepatit tanısı almış olup; bu grupta NS5 Ab aktivitesinin (% 52.6), hepatit ile ilişkili olabilecek herhangi bir bulgusu olmayanlara göre (% 13.6) fazla olduğu gözlenmiştir. (Chi Square test; p=0,019) (Tablo 7).

TARTIŞMA

HCV enfeksiyonu dünyanın her yerinde görülebilen; kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma etyolojisinde önemli rolü olan ciddi bir enfeksiyondur (14,15). Tanıda ilk aşama tarama testlerinin uygulanması olup, bu amaçla anti-HCV EIA testleri kullanılmaktadır. Araştırmamızda, bu alanda kullanılabilecek yeni bir test olan HCV Spot test, EIA ile karşılaştırılmış ve yüksek bir oranda (% 96.5) uyum saptanmıştır (Tablo 1). Farklı yanıt alınan altı örneğin tümü immunoblot yöntemi ile negatif bulunmuştur.

Constantine ve ark (16) da benzer sonuçlar almışlar ve özellikle küçük laboratuvarlarda ELISA cihazının bulunamama olasılığından dolayı, HCV Spot testin kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Yüzdoksaniki örnekte yapılan bir araştırmada HCV Spot testin duyarlılığı % 97.6 ; özgüllüğü % 92.6 bulunmuştur (17). Bizim bulgularımız da (% 98.1 ; % 89.8) benzer değerlerdedir. Hasta grubunda özgüllüğün (% 71.8), kontrol grubuna (% 98.7) göre düşük olmasının nedeni hemodiyaliz hastalarının sayısının fazlalığıdır (Tablo 3 ve 4). Duyarlılığının yüksek olması, cihaza gereksinim göstermeyişi, ol-

dukça kolay ve kısa sürede uygulanabilir olması nedeniyle Spot test, anti-HCV tarama testi olarak her laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilir. Ancak özellikle risk grubu olmayan kişilerde daha geniş çapta araştırmalar yapılarak "yalancı negatif" oranları belirlenmelidir. Bizim araştırma grubumuzda sadece bir hastada, immunoblot yöntemle saptanan anti-HCV Spot test ile gösterilememiştir (Tablo 4).

HCV genomunun strüktürel ve NS antijenlerinin ilavesi EIA testlerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü artırmıştır (18). Ancak düşük optik dansite (OD) değeri yalancı pozitif anti-HCV lehinedir. COI'nin 5'in üzerinde olması "gerçek HCV enfeksiyonu" göstergesi olarak bildirilmiştir (19).

Giulivi ve ark (20), 20186 kan donörünü EIA yöntemi ile taramışlar ve COI değeri 2'nin üzerinde olanların % 91'inin alanine aminotransferase (ALT) düzeylerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek absorban değerine sahip EIA ile anti-HCV pozitif serumların "gerçek seropozitif" olma olasılığı fazladır (21,22) ancak, hastalığın akut döneminde ve bağışık sistemi baskılanmış olanlarda yüksek düzeyde antikor saptanamayabileceği unutulmamalıdır (23). Bizim serimizde COI \geq 5 olan 53 EIA pozitif örneğin % 90.6'sı immunoblot yöntemi ile doğrulanmıştır (Tablo 5). Zayıf EIA reaktivitesi olan 14 serumun 3'ü immunoblot yöntemi ile indeterminate olarak yorumlanmıştır. "Anti-HCV değerlendirmesinde EIA absorban değerleri dikkate alınmalıdır" (24) yorumuna katılıyoruz. Söz konusu serumlarda % 92.6 - 100 oranında HCV-RNA varlığı gösterilmiştir (18).

Anti-HCV aramaya yönelik testler ile alınan so-

nuçlar OD düzeyleri yönünden farklılıklar gösterebilmektedir (25). Kullanılan antijenlerin sentetik veya rekombinant olması, antijenik kombinasyonların farklılığı (26,27,28), ayrıca HCV izolatları arasında gözlenen sekans değişiklikleri test sonucunu etkilemektedir (29). Genotip 1b ile enfekte kan donörlerinde 5-1-1 ve c100-3 seropozitiflik oranı, genotip 2a ile enfekte olanlardan daha fazla bulunmuştur (30). Farklı antijenlere karşı oluşan antikörlerin biyolojik ve klinik önemi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Araştırmamızda, her iki immunoblot yöntemi karşılaştırıldığında Lia Tek III ile alınan pozitif sonuç sayısının fazla olduğu ve aynı serum örneğinde sözkonusu testlerde farklı antikör bantlarının saptanabildiği dikkatimizi çekmiştir (Tablo 2 ve 6). Tek bantta 2+ reaksiyonun Lia Tek III ile olumlu olarak yorumlanması bu test ile saptanan pozitifliğin daha fazla olmasının nedenini açıklayabilir. Chaudhary ve ark (31) da aynı nedenden dolayı, RIBA ve Matrix ile yaptıkları karşılaştırmada Lia Tek III ile daha az sayıda indeterminate sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

HCV genomunun NS5 bölgesine ait antijenik yapıların serolojik testlere eklenmesinin test duyarlılığını arttırdığını bildiren yayınlar olduğu gibi (32,33), bu ilavenin duyarlılığa pek etkisinin olmadığını, serokonversiyonun erken saptanabilmesinin NS3 antijeni ile ilgili olduğunu belirten araştırmalar da vardır (34,35). Araştırma grubumuzda, immunoblot yöntemlerde en az reaksiyon veren antijen NS5'tir (Tablo 6). Buna karşın, hemodiyaliz hastaları ; kronik hepatit gelişenler ve hepatite ilişkin herhangi bir bulgusu olmayanlar şeklinde gruplandırıldığında, kronik hepatit olgularında NS5 reaktivitesinin diğer hastalardan anlamlı derecede fazla olduğu saptanmıştır (p = 0.019) (Tablo 7). NS5 bölgesi (NS5 b) RNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesi içermektedir, bu nedenle viral replikasyonda önemli bir görevi vardır (36). Tsutsumi ve ark (37), kronik C hepatitli olguların hepatositlerinde, siroz ve kronik aktif hepatitte daha da fazla olmak üzere (% 52 ve % 86), % 56 oranında NS5 antijen pozitifliği saptamışlardır. NS5 antikör yanıtının genotiplerle olan ilişkisi incelenerek, kronik hepatit gelişiminin diagnostik bir göstergesi olabileceği şeklindeki gözlemimizin daha geniş hasta gruplarında araştırılmasının uygun olacağı düşüncesindeyiz.

HCV enfeksiyonu tanısına yönelik testlerin artmasına paralel olarak, bu alandaki bilgilerimiz çoğalmıştır ancak, yanıt alınması gereken sorular da giderek artmaktadır. Her bir C viral hepatiti olgusu,

klinik - laboratuvar işbirliği ile değerlendirilmeli ve uygulanan testlerin sonuçları çeşitli faktörler gözönünde bulundurularak yorumlanmalıdır.

Teşekkür: Bu araştırmaya kit - malzeme teminindeki desteğinden dolayı KAYAMED A.Ş.'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kılıçturgay K : Türkiye'de viral hepatitler (genel durum). "K.Kılıçturgay (ed), Viral Hepatit'94, 1.Baskı" Kitabında, s .1, 1994, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
2. Purcell RH : The discovery of the hepatitis viruses. Gastroenterology, 1993, 104 : 955 - 963.
3. Prince AM, Brotman B, Grady GF, et al : Long-incubation posttransfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. Lancet, 1974, 2 : 241-246.
4. Dienstag JL : Non-A, non-B hepatitis I.Recognition, epidemiology, and clinical features. Gastroenterology, 1983, 85: 439-462.
5. Yenen OŞ : Hepatit C virusu (HCV) molekül özellikleri ve serolojik tanı, "K.Kılıçturgay (ed), Viral Hepatit'94, 1.Baskı" Kitabında, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul; 1994, s: 133.
6. Alter MJ, Sampliner RE : Hepatitis C and miles to go before we sleep. N Eng J Med, 1989, 321-1538.
7. Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, et al : Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. Lancet, 1989, 2 : 294-297.
8. Pont J, Neuwald C, Salzner G : Antibody prevalence of paraterally transmitted viruses (HIV-1, HTLV-1, HBV, HCV) in Austrian intra-venous drug users. Infection, 1991, 19 : 427-428.
9. Alter HJ : New kit on the block : evaluation of second generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. Hepatology, 1992, 15 : 350-353.
10. Baath L, Widell A, Nordenfelt E : A comparison between one first generation and three second generation anti-HCV ELISAs : an investigation in high and low risk subjects in correlation with recombinant immunoblot assay and polymerase chain reaction. J Virol Methods, 1992, 40 : 287-296.
11. Courouce AM, Le-Marré N, Girault A, et al : Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis : comparison of second and third generation anti-HCV assays. Transfusion, 1994, 34: 790-795.
12. Buffet C, Charnaux N, Laurent P, et al : Enhanced detection of antibodies to hepatitis C virus by use of a third-generation recombinant immunoblot assay. J Med Virol, 1994, 43: 259-261.
13. Dussaix E, Charnoux L, Laurent-Puig P, et al : Analysis of sera indeterminate by Ortho-HCV RIBA-2 by using three confirmatory assays for anti-hepatitis C virus. J Clin Microbiol, 1994, 32: 2071-2075.
14. Sherlock S : Viral hepatitis. Lancet, 1992, 339: 802.
15. Liang TJ, Jeffers LJ, Reddy KR, et al : Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. Hepatology, 1993, 18: 1326-1333.
16. Constantine NT, Holm-Hansen C, Skaug N, et al : Successful use of two rapid HCV assays in a high prevalence Romanian population. J Clin Lab Anal, 1994, 8: 332-334.
17. Poovorowan Y, Theamboonlers A, Chumdermpadetsuk

- S, et al : Comparative results in detection of HCV antibodies by using a rapid HCV test, ELISA and immunoblot. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1994, 25: 647-649.
18. Lavanchy A, Mayerat C, Morel B, et al : Evaluation of third-generation assays for detection of anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies and comparison with presence of HCV RNA in blood donors reactive to c100-3 antigen. *J Clin Microb*, 1994, 32: 2272-2275.
 19. Zhang HY, Kuramoto IK, Mamish D, et al : Hepatitis C virus in blood samples from volunteer donors. *J Clin Microb*, 1993, 31: 606-609.
 20. Giulivi A, Aye MT, Gray E, et al : Anti-hepatitis C virus (HCV) screening at a Canadian Red Cross center : significance of a positive c100 HCV enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion*, 1992, 32: 309-311.
 21. Lin HH, Hsu HY, Chang MH, et al : Correlation between ELISA and recombinant immunoblot assay in serum samples positive for anti-HCV. *J Formos Med Assoc*, 1992, 91: 729-730.
 22. Bryan JP, Sjogren MH, Malone JL, et al : Recombinant immunoblot assays for hepatitis C in human immunodeficiency virus type-1 infected US Navy personnel. *J Infect Dis*, 1993, 167: 715-719.
 23. Pillot J, Rioche M, Lazizi Y : ELISA in serodiagnosis of HCV infection. *FEMS-Microbiol Rev*, 1994, 14: 221-227.
 24. Frost EH : Investigation of sera reactive to hepatitis C virus by second-generation Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 163-164.
 25. Nakagiri I, Ichihara K, Ohmoto K, et al : Analysis of discordant test results among five second-generation assays for anti-hepatitis C virus antibodies also tested by polymerase chain reaction-RNA assay and other laboratory and clinical tests for hepatitis. *J Clin Microbiol*, 1993, 2974-2980.
 26. Gabriel FG, Teo CG : Peptide based enzyme immunoassays for detecting hepatitis C antibodies in sera of people at high risk. *J Clin Pathol*, 1994, 47: 357-359.
 27. Brown D, Powell L, Morris A, et al : Improved diagnosis of chronic hepatitis C virus infection by detection of antibody to multiple epitopes: confirmation by antibody to synthetic oligopeptides. *J Med Virol*, 1992, 38: 167-171.
 28. Kim BS, Park YM : Prevalence of hepatitis C virus related to liver diseases in Korea. *Gastroenterol Jpn*, 1993, 28: 17-22.
 29. McOmish F, Chan S-W, Dow BC, et al : Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors investigation of type specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion*, 1993, 33: 7-13.
 30. Ichimura H, Tamura I, Kurimura O, et al : Hepatitis C virus genotypes, reactivity to recombinant immunoblot assay 2 antigens and liver disease. *J Med Virol*, 1994, 43: 212-215.
 31. Chaudhary RK, Jacobsen H : Performance of third-generation confirmatory tests for detection of antibody to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 2606-2608.
 32. Taliani G, Badulato MC, Lecce R, et al : Isolate antibody to hepatitis C virus core antigen (c22) by RIBA-2 : correlation with HCV-RNA and anti-NS5. *Arch Virol Suppl*, 1993, 8 : 219-228.
 33. Dow BC, Follet EAC, Jordan T, et al : Testing of blood donations for hepatitis C virus. *Lancet*, 1994, 343: 477-478.
 34. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, et al : Evaluation of third generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox-Sang*, 1994, 66: 122-129.
 35. Goffin E, Pirson Y, Cornu C, et al : Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet*, 1994, 343: 854.
 36. Houghton M, Weiner A, Han J, et al : Molecular biology of the hepatitis C viruses : Implications for diagnosis development and control of viral disease. *Hepatology*, 1991, 14: 381-388.
 37. Tsutsumi M, Urashima S, Takada A, et al : Detection of antigens related to hepatitis C virus RNA encoding the NS5 region in the livers of patients with chronic type C hepatitis. *Hepatology*, 1994, 19: 265-272.