

# HCV İnfeksiyonunun Serolojik Tanısında Çeşitli ELISA ve RIBA Tekniklerinin Değeri ve PCR Yöntemi ile HCV-RNA'sı Araştırması

Selim Badur<sup>1</sup>, Ali Ağaçfidan<sup>1</sup>, Salih Türkoğlu<sup>1</sup>, Fatma Dedeoğlu<sup>1</sup>, Sabahattin Kaymakoglu<sup>2</sup>, Atilla Ökten<sup>2</sup>, Enver Tali Çetin<sup>1</sup>

**Özet:** HCV infeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılan birinci jenerasyon ELISA testlerinin, yeterince özgül sonuçlar vermediği savunulmaktadır. Son yıllarda geliştirilen ve özellikle c22-kor proteini de taşıyan ikinci jenerasyon testlerin ise daha uygun sonuçlar verdiği ileri sürülmektedir. Bu çalışmada 24 örnekte, çeşitli özelliklere sahip ELISA ve RIBA testleri ile anti-HCV araştırması sonuçları tartışılmış; elde edilen pozitifliklerin özgüllüğü ise aynı örneklerin HCV-RNA açısından PCR tekniği ile incelenmesi ile kontrol edilmiştir. Sonuçta ikinci jenerasyon ELISA ve bazı sentetik antijen kullanılan ELISA kitleri ile elde edilen sonuçların PCR testi ile doğrulandığı; ayrıca beklenenin aksine, RIBA testinin yeterince duyarlı olmadığı ve konfirmasyon testi olarak ele alınmayacağı saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** HCV, serolojik tanı, RIBA, PCR.

**Summary:** Value of different ELISA and RIBA tests in serodiagnosis of HCV infection and detection of HCV-RNA by PCR. In serodiagnosis of HCV infection, first generation ELISA tests do not seem to be specific enough. It is now believed that 2nd generation tests which particularly include a core-protein c22, give much more reliable results. In this study, results of various ELISA and RIBA tests detecting anti-HCV in 24 samples were compared and discussed; the specificity of positive results were checked by PCR technique detecting HCV-RNA in the samples. Results showed that 2nd generation ELISA and other ELISA tests which use synthetic antigens, are highly specific as confirmed by PCR; unexpectedly, the RIBA test was not found to be sensitive enough and it cannot be used as a confirmation test.

**Key Words:** HCV, serodiagnosis, RIBA, PCR.

## Giriş

Transfüzyon sonrası ortaya çıkan non-A, non-B hepatitlerinin büyük kısmında etken olduğu belirlenen hepatit C virusunun (HCV) genomuna ait nükleotid dizilerinin belirlenmesi sonucu, anti-HCV antikorlarını araştırmak amacıyla ilk ELISA testi geliştirilmiştir (1). Kullanıma giren birinci jenerasyon testlerde mayalarda hazırlanan c100-3 antijeni ile, bakterilerden elde edilen 5-1-1 antijenlerinden yararlanılmıştır. Virusun yapısal olmayan proteinlerine ait (NS4 bölgesi) bu iki rekombinan antijen kullanılarak gerçekleştirilen ilk ELISA çalışmaları, çeşitli risk gruplarının belirlenmesi-

ni sağlamış; ancak otoimmün kronik aktif hepatit (2,3), hepatoselüler karsinom (4), paraproteinemi (5), romatoid artrit (6) gibi patolojilerin yanı sıra, alkolikler gibi bazı gruplarda (7) yalancı pozitifliklere sıklıkla rastlandığı da saptanmıştır. Bu durumda araştırmacılar daha özgül sonuçların elde edilmesi için ikinci jenerasyon ELISA testlerini geliştirmişler ve yapısal epitop olan c22-3 ile, yapısal olmayan c33-c

bölgelerine ait ilave antijenleri de içeren yeni testler kullanıma girmiştir. Öte yandan anti-HCV antikorlarının araştırılmasında ELISA testlerine paralel olarak, benzer antijenleri nitroselüloz şeritler üzerinde taşıyan birinci ve ikinci jenerasyon RIBA testleri de geliştirilmiştir (8).

Ancak her ne kadar yeni geliştirilen testlerin yeterince duyarlı olacakları kabul ediliyor ise de, bu yöntemler ile elde

Tablo 1 . Birinci ve İkinci PCR Testinde Kullanılan Primer'ların Sekansları

Dış:	Primer	Polarite	Sekans (5' - 3')	Nükleotid Yeri	Ürün
	1 CH	Anti-Sans	-GAT.GCA.CGG.TCT.ACG.AGA.CCTC-	332-311	} 288 bp
	2 CH	Sans	-AAC.TAC.TGT.CTT.CAC.GCA.GAA-	44-64	
İç:	1 TS	Anti-Sans	-GCG-ACC.CAA.CAC.TAC.TCGCT-	263-243	} 187 bp
	4 CH	Sans	-ATG.GCG.TTA.GTA.TGA.GTC-	76-93	

edilen sonuçların özgüllüğü konusunda tartışmalar hâlâ sürmektedir. Konuya açıklık getirmek amacıyla, bu çalışmada birinci jenerasyon ELISA testi ile pozitif sonuç alınan toplam 24 örnek farklı özelliklerde antijenler içeren ELISA ve RIBA testleri ile incelenmiş; ayrıca elde edilen pozitifliklerin özgüllüğünü göstermek amacıyla, tanıda referans yöntem olarak kabul edilen polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction-PCR) tekniği ile HCV-RNA'sı araştırılmıştır.

## Yöntemler

**Örnekler ve Uygulanan Rutin Testler:** Çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları

(1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul.

(2) İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul.

**Tablo 2 . Birinci Jenerasyon Rekombinan ELISA (Abbott) Testi ile Pozitif Sonuç Alınan Kriptojenik Hepatit ve Siroz Olgularına Ait Örneklerin (n=24) Çeşitli Testler Kullanılarak Anti-HCV Antikorları Yönünden İnceleme Sonuçları**

Örnek No.	İkinci Jenerasyon ELISA (Rekombinan, Abbott) (Cut-off: 0.390)	Sentetik Antijen Kullanılan ELISA (Organon) (Cut-off: 0.516)	Sentetik Antijen Kullanılan ELISA (UBI) (Cut-off: 0.315)	İkinci Jenerasyon RIBA (Chiron)	"Nested" PCR
1	+ (1.601)	- (0.272)	+ (1.718)	?*	+
2	+ (2)	- (0.192)	+ (2)	?	+
3	+ (2)	- (0.153)	+ (2)	+	+
4	+ (1.287)	- (0.468)	+ (1.622)	++	+
5	+ (1.980)	+ (1.266)	+ (2)	?	+
6	+ (1.888)	- (0.468)	+ (2)	?	+
7	+ (2)	- (0.414)	+ (2)	+++	+
8	+ (1.397)	- (0.130)	+ (1.216)	+	+
9	+ (2)	- (0.235)	+ (1.371)	+	+
10	+ (2)	- (0.166)	+ (1.873)	++	+
11	+ (2)	- (0.167)	+ (2)	+	+
12	+ (2)	+ (0.809)	+ (2)	+++	+
13	+ (2)	+ (1.251)	+ (1.481)	+++	+
14	+ (1.789)	+ (1.639)	+ (1.860)	+	+
15	+ (0.662)	- (0.247)	+ (1.312)	-	+
16	+ (2)	+ (1.549)	+ (2)	+	+
17	+ (2)	- (0.454)	+ (1.918)	+	+
18	+ (2)	+ (1.285)	+ (2)	+	+
19	- (0.290)	- (0.153)	- (0.212)	-	-
20	+ (1.227)	- (0.313)	+ (1.317)	+	+
21	+ (2)	+ (1.781)	+ (2)	+	+
22	+ (2)	+ (0.948)	+ (2)	+++	+
23	+ (1.784)	- (0.187)	+ (1.818)	+	+
24	+ (1.621)	- (0.283)	+ (1.363)	+	+

\* Şüpheli RIBA sonucu (tek bir antijen bandı ile reaksiyon)

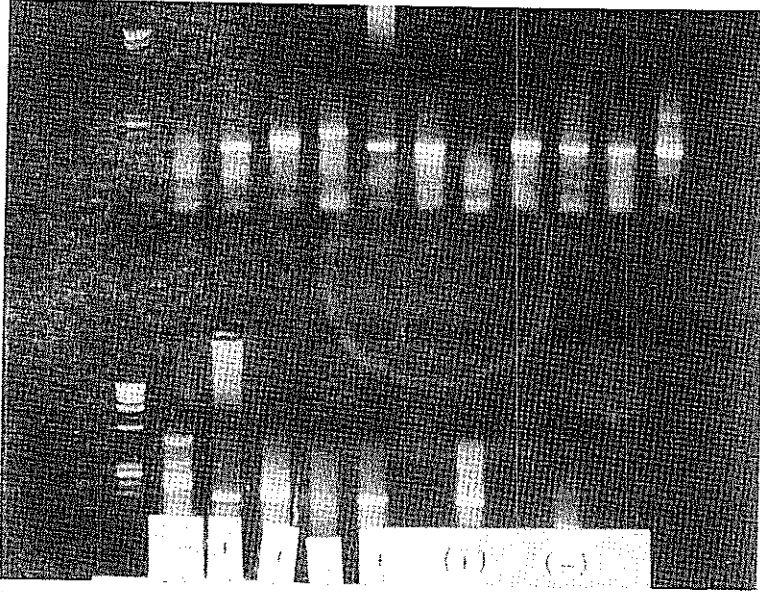
Anabilim Dalı Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı'nda kriptojenik hepatit ve karaciğer sirozu tanısı konulan (HBV ile ilgili tüm serolojik göstergeleri negatif bulunan) ve birinci jenerasyon ELISA testi ile anti-HCV antikorları saptanan toplam 24 hastaya ait serum örnekleri incelenmiştir. Kontrol grubu olarak HBV'na bağlı kronik hepatit ve siroz olguları (n= 10) deneye alınmıştır. İncelemeler gerçekleştirilene dek -20°C'de saklanan serumlara:

a) Birinci jenerasyon ELISA (rekombinan c1000-3 antijeni içeren Abbott-HCV-EIA); b) ikinci jenerasyon ELISA (rekombinan c22-3, c33-c antijenlerini içeren Abbott-HCV-EIA); c) sentetik HCV peptidlerinin kullanıldığı ELISA (sentetik c22-3 antijeni içeren Organon-Hepanostica-C); d) sentetik HCV peptidlerinin kullanıldığı ELISA (sentetik c22-3, c100-3, c33-c antijenlerini içeren UBI-United Biomedical-HCV-EIA); e) ikinci jenerasyon RIBA (rekombinan 5-1-1, c100-3, c33-c, c22-3 antijenlerini içeren Chiron-RIBA); f) "nested-PCR" testleri uygulanmıştır.

ELISA ve RIBA uygulamaları, kitlerin çalışma kurallarına uyularak gerçekleştirilmiştir; ELISA sonuçları, pozitif ve negatif kontrollerin uygun dalga boyundaki absorbans değerleri

(OD) üzerinden hesaplanan "sınır-değer" (cut-off) dikkate alınarak elde edilmiştir. RIBA sonuçları ise, pozitif kontrol ile elde edilen görüntü kriter alınarak değerlendirilmiştir.

**RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Eldesi:** PCR uygulaması için her şeyden önce, Garson ve arkadaşları (9)'nın yöntemine göre örneklerden RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla 100 µl serum, hacminin iki misli miktarında ve 200 µg/ml oranında proteinaz K içeren ekstraksiyon tampunu ile 50°C'de bir saat muamele edilmiştir (ekstraksiyon tampunu: 50 mM Tris HCl, pH 7.5; 5mM EDTA, % 0.25 SDS ve 150 mM NaCl içerir). Daha sonra üç kez fenol-kloroform ekstraksiyonu ile ayrıştırılan RNA'lar, soğuk etanol (-20°C) ile çöktürülmüş ve RNazdan arındırılması için dietilpirokarbonat ile muamele edilmiş 10 µl distile suda çözülmüştür. Elde edilen RNA'lar, 70°C'de bekletilerek denatüre edilmiş ve 37°C'de bir saat süreyle revers transkriptaz enzimi (250 ünite murine Moloney leukemia virus reverse transcriptase-Pharmacia), 10mM d.NTP (Pharmacia) ve 20 pmol "1 CH" oligonükleotidi içeren cDNA tampunu (250 mM Tris HCl; 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT) ile inkübe edile-



Resim 1. HCV-PCR sonuçları. 2., 3., ve 5. örnekler pozitif; 1. ve 4. örnekler negatif sonuç vermiştir.

rek cDNA elde edilmiştir (formülü Tablo 1'de gösterilen 1 CH oligonükleotidi, antisans-dış bölge "primer"dir).

**PCR Deneyi:** Elde edilen cDNA, 95°C'de beş dakika bekletilerek inaktive edilmiş ve buz içinde tutulmuştur. HCV-cDNA'sının amplifikasyonu için, PCR tüpleri içindeki 5 µl cDNA, toplam hacmi 100 µl olacak şekilde PCR reaktifleri ile karıştırılmıştır (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 8; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 pM miktarında her iki dış oligonükleotid-1CH ve 2 CH-; 2 ünite Taq-DNA polimeraz enzimi-Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT). Daha sonra karışım üzerine 100 µl vazelin konularak derhal PCR işlemine geçilmiştir (PCR cihazı: Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT). İlk uygulamada her biri 42°C ve 94°C'lerde birer, 72°C'de ikişer dakikalık toplam 35 sikluluk çoğaltma işlemi yapılmış; bu ilk bölümün sonunda elde edilen reaksiyon ürününden 3 µl alınmış ve yeni tüplerde, aynı işlem, ancak bu kez 1 TS-4CH oligonükleotid çifti kullanılarak ve 25 siklus halinde yinelenmiştir (nested-PCR). Kullanılan "primer"ların formülleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Sonuçlar, 10 µl'lık PCR ürünlerinin, etidiyum bromür içeren % 2'lik agaroz jelinde gerçekleştirilen yatay elektroforezi takiben (150 V/30 dak) UV ışınları altında, pozitif-negatif kontroller ve lambda/Phi X markörleri ile karşılaştırılarak incelenmiş; nitroselüloza aktarılan ve 187 bp'lik bölgede yer alan bandların özgülüğü, işaretli HCV problemleri kullanılarak gerçekleştirilen hibridizasyon tekniği ile kontrol edilmiştir. Prob olarak genomun 129-158 bölgesindeki nükleotidleri içeren oligonükleotid parçaları kullanılmış ve işaretleme 10 pmol P<sup>32</sup>'ye bağlı gamma-ATP aracılığı (6000 Ci/mmol) ile, T4 polinükleotid kinaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 1 ve 2).

### Sonuçlar

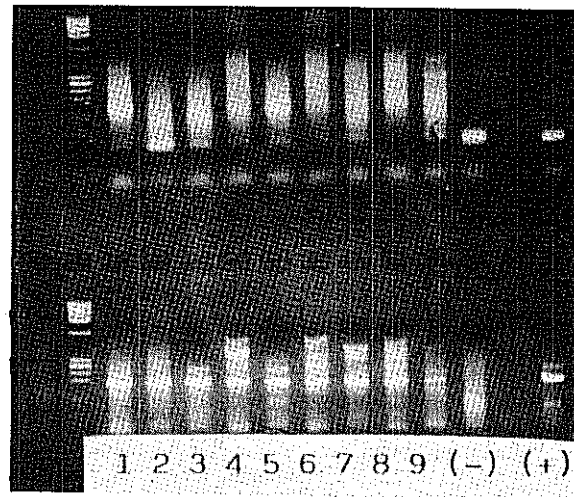
Çalışmaya alınan ve birinci jenerasyon ELISA testi (Abbott) ile anti-HCV antikorları araştırması pozitif sonuç veren 24 serum örneğinden 23'ü rekombinan antijen kullanılan

ikinci jenerasyon ELISA testi (Abbott) ve sentetik antijen kullanılan test ile (UBI), pozitif sonuç vermiştir. Yine sentetik antijen esasına dayanan bir diğer ELISA testinde (Organon) ise örneklerin sadece sekizinde (% 33.3) antikorların varlığı gösterilmiştir. Aynı serum örnekleri RIBA testi (ikinci jenerasyon-Chiron) ile incelendiğinde ikisi negatif, dördü belirsiz, 18'i ise pozitif sonuç vermiştir; bu test ile alınan pozitiflik oranları, kontrol bandlarındaki renklemenin şiddeti ile kıyaslanarak değerlendirildiğinde; 18 pozitifliğin 12'si "+", ikisi "++", dördü ise "+++" şeklinde sınıflandırılmıştır. Ancak bizim bulgularımız, pozitif örneklerin ELISA absorbans değerleri ile, RIBA'nın pozitiflik oranları arasında net bir paralellik bulunmadığını göstermektedir. Gerçek ve yalancı pozitifliklerin ayırımında en güvenilir yöntem olduğu kabul edilen PCR tekniği ile yapılan incelemede ise, birinci jenerasyon ELISA ile pozitif sonuç veren, ancak kullanılan diğer testler ile negatif sonuç alınan 19 numaralı örnek dışında tüm serumlarda HCV-RNA'sının varlığı gösterilmiştir. Tüm bulgular, Tablo 2'de özetlenmiştir.

Kontrol grubu olarak alınan ve HBV'na bağlı kronik hepatit ve siroz olgularına ait 10 serum örneğinin hiçbirinde, kullanılan testler ile pozitifliğe rastlanmamıştır.

### İrdeleme

HCV infeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılmakta olan birinci jenerasyon ELISA kitlerinin çeşitli gruplarda yalancı pozitifliğe neden olduğunun anlaşılmasını takiben, genomun yapısal bölgesine ait antijenleri de içeren ikinci jenerasyon testler kullanıma girmiştir. Bu gelişmeye paralel olarak, farklı antijenleri ayrı ayrı nitroselüloz şeritler üzerinde taşıyan RIBA testi ve nihayet en duyarlı teknik olarak değerlendirilen PCR yöntemi geliştirilmiştir. Birinci jenerasyon ELISA yöntemi ile elde edilen pozitif sonuçların özgülüğünü araştırmak amacıyla yaptığımız bu çalışmada,



Resim 2. Aynı örneklere ait, PCR (üst bölüm) ve "nested PCR" (alt bölüm) bulguları.

örneklerden sadece bir tanesinin (örnek no.19) gerçek pozitifliği yansıtmadığı anlaşılmaktadır. Biri dışında tüm örneklerde elde edilen pozitifliğin doğrulanmış olması ise, kullandığımız birinci jenerasyon testin uygunluğundan çok, incelemeye alınan hasta grubunun özelliklerinden kaynaklanmaktadır; nitekim kriptojenik hepatit ve siroz tanısı konulan ve büyük bir olasılıkla gerçekten HCV ile enfekte olan kişiler yerine, otoimmün hepatit tanısı konulan veya alkolikler gibi gruplarda birinci jenerasyon ELISA testlerinin durumunun ele alınması daha uygun olacaktır.

Farklı özellikteki ELISA kitleri kıyaslandığında, özellikle sentetik antijen (c22-3 antijeni, tek başına) kullanılan bir ELISA kitinin (Organon) yeterince duyarlı olmadığı anlaşılmaktadır. Buna karşılık ikinci jenerasyon rekombinan ELISA testi (Abbott) ve üç farklı sentetik antijeni içeren ELISA kitleri (UBI) ile alınan sonuçlar oldukça tatminkardır. Öte yandan, bir dönem doğrulama testi olarak önerilen RIBA tekniği ile, diğer yöntemler ile pozitif sonuç veren bir serum (no.15) "negatif"; dört örnek ise (no.1,2,5 ve 6) "şüpheli" sonuç vermiştir. Bu durumda, RIBA yöntemi ile doğrulanamayan anti-HCV pozitifliklerinin her zaman "yalancı ELISA pozitifliği" olarak nitelendirilmesinin doğru olamayacağı görülmektedir. Nitekim Bellobuono ve arkadaşları (10) "şüpheli" RIBA sonucu veren serumların transfüzyonunu takiben, alıcılarda ortaya çıkan posttransfüzyonel C hepatiti olgularının varlığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda PCR tekniği referans yöntem olarak kullanılmıştır. Bu yöntemin uygulanışında, seçilecek sentetik oligonükleotidlerin ("primer"ların) önemi büyüktür. HCV varyantlarının varlığı ve çeşitli özellikleri bilindiğinden, deneyde kullanılacak "primer"ların, suştan suşa değişkenlik göstermeyen yapısal bölgeye ait olmaları gerekir (11). Ayrıca HCV-RNA'sı araştırmalarında, tek bir amplifikasyon işlemi ile elde edilecek PCR bandlarının (289 bp'lik) net ve belirgin olmayışı, 187 bp'lik bandlar ile kesin sonuç veren ve "nested-PCR" şeklinde tanımlanan iki aşamalı amplifikasyon işlemi gerekli kılınmaktadır (9,12) (Resim 2). Ancak PCR tekniği ile yapılan bir incelemede HCV infeksiyonlarında kesintili viremi olgusu üzerinde durularak, HCV-RNA'sının saptanmasında, örnek alınımında zaman zamanın önemi vurgulanmış ve HCV-RNA'sının serumda zaman zaman belirip kaybolduğu gösterilmiştir (13).

Elde ettiğimiz bulgular, ikinci jenerasyon ELISA testlerinin özgüllük açısından oldukça tatminkar olduğunu; ayrıca geliştirilen bu kitlerin, RIBA tekniğine oranla daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Bu çalışmanın bir diğer ilginç özelliği, erişebildiğimiz kaynaklar açısından, ülkemizde ilk kez PCR tekniğinin bir infeksiyon hastalığının tanısında kullanımınıdır. Henüz evrensel stardardizasyon sorunu çözümlenmiş olan bu teknik, direkt ve immünolojik esasa dayanmayan bir tanı yöntemidir. Uygulaması basit olan PCR tekniğinde karşılaşılan en büyük sorun kontaminasyondur; özellikle bizim laboratuvarımız gibi çeşitli hepatit virüsleri ile yoğun biçimde çalışılan bölümlerde, aerosol tipinde kontaminasyon olasılığı çok yüksektir ve en gelişmiş araştırma merkezleri bile bu soruna henüz kesin çözümler getirememişlerdir (her aşama için ayrı pipetlerin kullanımı; her işlemin ayrı odalarda yapılması; deney öncesi, PCR tamponu ve oligonükleotidleri içeren karışımın 10 dakika UV ışığında bekletilmesi... gibi). Bu durumda her PCR testi için çok

sayıda kontrolün deneyde kullanımı zorunludur. Örneğin, bu çalışmanın yapılması sırasında, her PCR ve "nested-PCR" aşamasında, deney serisine normal insan serumu ve HBV ile enfekte hastaların serumlarından ekstre edilen RNA örnekleri eklenmiş; söz konusu "negatif kontrol"lerde herhangi bir kontaminasyonun bulunmaması, deneyin "geçerli" kabul edilmesi için önkoşul olarak ele alınmıştır.

#### Teşekkür

Çalışmada kullanılan "primer"ları sağladığımız ve PCR uygulamasında bilgi birikimlerine başvurduğumuz Paris-Pasteur Enstitüsü Mikroorganizma İmmünolojisi Servisi Şefi Prof. J. Pillot ve başta Dr. Yamina Lazizi olmak üzere tüm servis çalışanlarına teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
2. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result? *Lancet* 1990; 335: 754-7.
3. Schvarcz R, von Sydow M, Weiland O. Autoimmune chronic active hepatitis: changing reactivity for antibodies to hepatitis C virus after immunosuppressive treatment. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25: 1175-80.
4. Colombo M, Kuo G, Choo QL. Prevalance of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 1: 1006-8.
5. Boudart D, Lucas JC, Mullet JY, Le Carrer D, Planchon B, Harousseau JL. False-positive hepatitis C virus antibody tests in paraproteinaemia. *Lancet* 1990; 336: 36-7.
6. Theilmann L, Blazek M, Goeser T, Gmelin K, Kommerell B, Fiehn W. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; 335: 1346.
7. Poynard T, Aubert A, Lazizi Y, Naveau S, Bedossa P, Dubreuil P, Pillot J, Chaput JC. Is HCV infection a cause of cirrhosis among drinkers. In: Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 681-3.
8. Van der Poel CL, Cuyper HTM, Reesink HW, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337: 317-9.
9. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JAJ, Contreras M, Aloysius S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by nested polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 1419-29.
10. Bellobuono A, Mozzi F, Petrini G, Zanella A, Sirchia G. Infectivity of blood that is immunoblot intermediate reactive on hepatitis C virus antibody testing. *Lancet* 1990; 336: 309.
11. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-8.
12. Cristiano K, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Feinstone SM. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non-A, non-B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Hepatology* 1991; 14: 51-5.
13. Garson JA, Tuke PW, Makris M, et al. Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis-C-virus contaminated factor VIII concentrates. *Lancet* 1990; 336: 1022-5.