

HCV İnfeksiyonlarının Serolojik Tanısında Birinci Jenerasyon ELISA ve "Recombinant Immunoblot Assay" (RIBA) Testleri ile Elde Edilen Bulguların Karşılaştırılması

Selim Badur¹, Ali Ağaçfidan¹, Gülden Yılmaz¹, Salih Türkoğlu¹, Atilla Ökten², Enver Tali Çetin¹, Sabahattin Kaymakoglu²

Özet: Parenteral yoldan bulaşan non-A, non-B hepatitinin etkeni olduğu bilinen HCV'ye bağlı infeksiyonların serolojik tanısında, ELISA testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar bu yöntem ile saptanan seropozitifliğin özgüllüğü konusunda bazı kuşku uyandırmıştır. Günümüzde ELISA ile anti-HCV antikorları saptanan serumlardaki gerçek pozitifliğin araştırılması amacıyla RIBA tekniğine başvurulmaktadır. Bu çalışmada, ELISA-pozitif 43 kriptojenik hepatit/siroz, sekiz donör, dört asemptomatik HBV taşıyıcısı ve bir AIDS olgusuna ait toplam 56 serum örneği, RIBA tekniği ile incelenmiş ve sonuçta ELISA testinde belirlenen, özellikle kuvvetli pozitifliklerin tamamının RIBA ile doğrulandığı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: HCV, ELISA, RIBA, Serolojik tanı

Summary: Comparison of a first generation ELISA and recombinant immunoblot assay (RIBA) results in serodiagnosis of HCV infections. ELISA is now widely used for serologic identification of infections due to HCV, the causative agent of the parenteral form of non-A, non-B hepatitis. However, seropositivity detected by this method has raised some doubts regarding test specificity. As an assay with high specificity, "recombinant immunoblot assay" (RIBA) is used for confirmation of ELISA-positive sera for HCV. In this study 56 ELISA-positive sera from 43 cryptogenic hepatitis/cirrhosis cases, eight donors, four asymptomatic HBV carriers and one AIDS case were examined by RIBA method. The results obtained show that the RIBA method confirms especially all the ELISA strong positivity for anti-HCV antibodies.

Key Words: HCV, ELISA, RIBA, Serodiagnosis

Giriş

Bugün için kaç adet oldukları kesin olarak bilinmeyen non-A, non-B hepatiti (NANBH) etkenleri konusunda en somut gelişmeler, başlıca bulaşma şeklinin parenteral yoldan olduğu halen kabul edilen hepatit C virusu (HCV) konusunda kaydedilmiştir. Her ne kadar HCV'nun izolasyon çalışmalarında olumlu sonuçlar alınmamış ise de, ilk kez bir virusun antijeni moleküller biyoloji teknikleri ile hazırlanabilmiş ve sonuçta spesifik antikorların araştırılmasında kullanılmak üzere bir ELISA testi geliştirilmiştir (1). ELISA kitlerinin üretilmesini takiben çeşitli risk grupları, donörler ve posttransfüzyonel NANBH (PT-NANBH) olgularında anti-HCV antikorlarının incelenmesine geçilmiş ve özellikle kronik PT-NANBH olgularında % 80'lere varan sero-pozitiflik saptanmıştır (2-9). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise donör grubunda, Ankara'da % 0.8 (10), İstanbul'da % 0.3 (11) oranında anti-HCV antikorları belirlenmiş; risk gruplarından politransfüze hastalarda % 4.6 - % 11.4 (10,11); NANBH tanısı konan olgularda % 63 (10); kronik karaciğer hastalarında % 76 (12); damar içi uyuşturucu kullananlarda % 57.1 (11); kriptojenik hepatit ve siroz olgularında % 33.6-36.8 (11,13) ve hemodiyaliz hastalarında % 30.7-34.7 (11,13) oranlarında seropozitiflik saptanmıştır.

Günümüzde tüm dünyada anti-HCV antikorlarının araştırılması amacıyla kullanılan birinci jenerasyon ELISA uygulamalarında, virusun yapısal olmayan proteinler bölgesine ait rekombinant C100-3 polipeptidi antijen olarak kullanılmaktadır. Bu antijenin hazırlanması amacıyla, virus genomunun 363 baz çiftlik bölgesini içerir C100 kolonu süperoksid dismutazını (SOD) kodlayan gen ile füzyona sokulmuş ve hazırlanan rekombinant ürün, mayalarda çoğaltılarak büyük miktarlarda elde edilmiştir (1). İlk çalışmalarda elde edilen ELISA sonuçları, C100-3 antijeni kullanılarak saptanan anti-HCV antikorlarının çeşitli özelliklerini

de ortaya koymuştur. Her şeyden önce, bu antikorların konvalesan dönemin göstergesi olan nötralizan antikorlar olmadıkları saptanmış (14); ayrıca kullanılan birinci jenerasyon kitler ile saptanan serokonversiyonun geç ortaya çıktığı; ve buna bağlı olarak akut HCV infeksiyonlarının tanısında bu testin yetersizliği anlaşılmıştır (15,16). Bu durum, akut olgularda yeterli antijenik uyarı olmasına karşılık kronik olgularda yineleyen uyarılar sonucu ortaya çıkan yeterli antikor sentezine bağlanabileceği gibi; tamamen kullanılan antijenin özelliklerinden de kaynaklanabilir (17,18).

Öte yandan, yine ilk ELISA çalışmalarının sonuçları bazı gruplarda yalancı pozitifliğin söz konusu olabileceğini düşündürmüş ve bu durumun çeşitli nedenleri üzerinde durulmuştur (19-24).

Olası yalancı pozitifliğin araştırılması amacıyla ELISA tekniğine ilave olarak, kullanımında yarar görülen ikinci yöntem "recombinant immunoblot assay" (RIBA) tekniğidir. Elde edilen pozitif ELISA sonuçlarının RIBA sonuçları ile ne oranda uyum gösterdiklerini; ve RIBA'nın doğrulama testi olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Yöntemler

Çalışmada ELISA testi ile anti-HCV antikorları saptanan toplam 56 serum örneği incelenmiştir. Örneklerden 43'ü, tanıları İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı'nda konulan kriptojenik hepatit ve siroz olgularına; dördü asemptomatik hepatit B virusu (HBV) taşıyıcısına aittir; bunların dışında sekiz donör ve bir AIDS'li hasta, serum örneği incelenen diğer olguları oluşturmuştur. Örneklerin tümünde anti-HCV incelemesi ELISA testi ile iki kez pozitif sonuç vermiş (Ortho HCV ELISA Test System, Ortho Diagnostic Systems) ve RIBA uygulamasına kadar, serumlar -20°C'de muhafaza edilmiştir. ELISA uygulaması, kilerin çalışma kurallarına uyularak gerçekleştirilmiş; sonuçlar, pozitif ve negatif kontrollerin 490 nm'deki absorbans değerleri (O.D.) üzerinden hesaplanan "sınır değeri" (cut-off) dikkate alınarak elde edilmiştir.

RIBA Testi (Chiron RIBA HCV Test System, Chiron Corpo-

(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

ration) HCV antikorlarının araştırılmasında, ELISA yöntemine ilave olarak kullanımı önerilen bir tekniktir. Yöntemde, C100-3 antijeninin yanısıra yine virusun yapısal olmayan bölgesine ait olan ve *Escherichia coli* bakterilerinde hazırlanan bir diğer polipeptid, 5-1-1 antijeni ve SOD antijeni kullanılmaktadır. Üretim koşulları nedeniyle C100-3 ve 5-1-1 antijenlerinin her biri, belirli oranlarda SOD'a ait bölgeler de içerdiklerinden, RIBA testinde, ayrı olarak tek başına yer alan SOD antijeni, deneyde alınacak pozitif sonucun SOD'dan kaynaklanıp kaynaklanmadığını gösterecektir. Sonuçta RIBA testinde toplam üç antijen (rekombinan C100-3 ve 5-1-1 ile SOD) ayrı ayrı, nitroselüloz şeritler üzerinde yer alırlar; ayrıca iki farklı düzeydeki insan IgG'leri şeritlerde kontrol olarak bulunur. Böylece HIV serolojisinde konfirmasyon testi olarak kullanılan Western-blot (WB) şeritlerinin görüntüsünü andırır biçimde, RIBA testi ile C100-3, 5-1-1 ve SOD antijenlerinin her birine karşı antikorların varlığını göstermek; ayrıca deney içi kontrolü sağlamak amacıyla, insan IgG'leri ile konjügenin çalışıp çalışmadığını denetlemek mümkün olmaktadır.

Belirli antijenleri taşıyan nitroselüloz şeritler, deneyin ilk aşamasında incelenecek serum ile inkübe edilir; yıkama işlemini takiben, keçi de hazırlanmış ve peroksidaz işaretli anti-insan IgG'leri ilavesiyle her antijene karşı antikorların varlığı araştırılır. Deneyin son aşamasında ortama ilave edilen substrat (4-kloro-1-naftol/ H_2O_2) antikor varlığında renklenmekte; belirginleşen mavi-siyah bantlar şerit üzerindeki antijenler ile reaksiyon veren spesifik antikorların varlığını göstermektedir. Sonuçların değerlendirilmesinde şerit üzerindeki düşük ve yüksek düzeylerdeki IgG bantlarında meydana gelecek renklenmenin şiddeti, üç antijen bantındaki renklenme ile kıyaslanmakta; düşük IgG bölgesindeki renklenme oranı sınır değeri olarak alınarak (+1) deney tamamlanmaktadır (Resim 1).

İncelenen serumun "pozitif" olarak kabul edilmesi için, her iki polipeptid antijenine (C100-3 ve 5-1-1) karşı en az +1 düzeyinde renklenmenin saptanması gereklidir. Antijen bantlarından sadece birinde oluşacak renklenme; veya bu antijenlerin yanısıra SOD bölgesindeki renklenme, sonucun "şüpheli" olarak tanımlanmasını gerektirmektedir. Farklı sonuçların alındığı bazı RIBA bantlarına ait bulgular Resim 2'de görülmektedir.

Sonuçlar

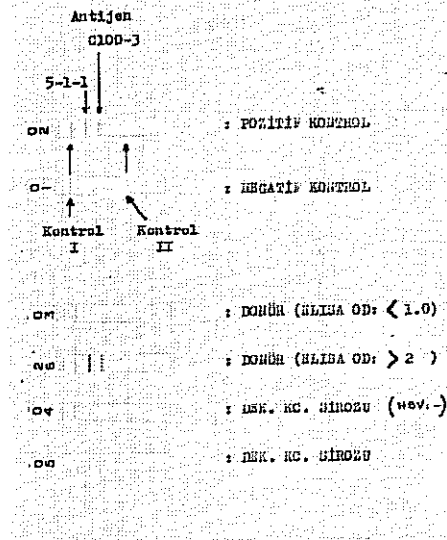
Örneklerin birinci grubunu oluşturan, kriptonjenik hepatit/siroz hastalarına ait serumların (toplam 43 olgu) 20'sinde, ELISA absorbans değerleri düşük titrede pozitif sonuç vermiştir ($O.D < 1$); bu örneklerden 11'i (% 55) RIBA testi ile negatif sonuç vermiş; altısı (% 30) "şüpheli", üçü (% 15) ise pozitif bulunmuştur. Aynı tip olgulardan, ELISA absorbans değerleri 1-2 oranında bulunan beş örnekten biri ELISA ile negatif, üçü pozitif, biri ise şüpheli sonuç vermiştir; ELISA değerleri kuvvetli pozitif bulunan 18 örneğin ise, 15'inde (% 83.3) RIBA pozitif, üçünde (% 16.7) "şüpheli" sonuç alınmış; RIBA negatif örneğe rastlanmamıştır.

Donörler arasında ELISA absorbans değeri düşük dört olgunun tümü, RIBA testinde negatif sonuç vermiş; ELISA değeri 1-2 oranında bulunan bir serum ile, ELISA değeri kuvvetli pozitif ($O.D > 2$) kuvvetli bulunan üç örneğin tamamı RIBA'da pozitif olarak değerlendirilmiştir.

ELISA absorbans değeri düşük bulunan iki asemptomatik HBV taşıyıcısında RIBA testi negatif sonuç vermiş; aynı kesimden ELISA sonucu 1-2 arasında saptanan bir olgu, RIBA'da şüpheli; ELISA sonucu kuvvetli pozitif sonuç veren bir diğer olgu ise RIBA'da pozitif bulunmuştur.

Anti-HIV antikorları pozitif bulunan bir AIDS olgusunun, HCV serolojisi ELISA ile düşük titrede pozitif sonuç vermiş ve bu örneğin RIBA testi de pozitif bulunmuştur.

Dört grupta değerlendirilen toplam 56 olgunun anti-HCV

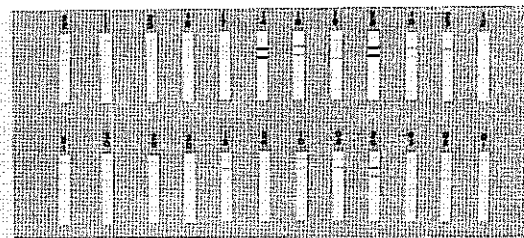


Resim 1. Pozitif ve negatif örnekler ile elde edilen RIBA sonuçları Pozitif kontrol şeriti üzerinde, sırasıyla: Kuvvetli IgG (Kontrol I), 5-1-1, C100-3, SOD (çok hafif, zor farkedilen bir bant) ve hafif IgG (Kontrol II) bantları görülmektedir.

ELISA ve RIBA bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir.

İrdeleme

HCV infeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılmakta olan birinci jenerasyon ELISA kitlerinin çeşitli gruplarda yalnızca pozitif sonuçlara neden olduğu bilinmektedir. Örneğin Schwarcz ve arkadaşları (22) otoimmün kronik aktif hepatit olguların % 33'ünde anti-HCV antikorlarını saptamışlar; ancak immüno-supresif tedaviyi takiben olguların hemen tamamında seropozitivitenin kaybolduğunu bildirerek, oligoklonal immunoglobulin sentezinin yalnızca pozitif ELISA sonuçlarına yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Ikeda ve



Resim 2. Çalışmada, ELISA negatif ve farklı düzeylerde pozitif sonuç veren örnekler ile elde edilen sonuçlar görülmektedir.

Tablo 1. ELISA ile Anti-HCV İncelemesi Pozitif Bulunan Örneklerde RIBA Sonuçları

Grup	Sayı	ELISA O.D.*	RIBA		
			(-)	(?)	(+)
1. Kriptojenik hepatit/siroz (n=43)	20	<1	11	6	3
	5	1-2	1	1	3
	18	>2	-	3	15
2. Donör (n=8)	4	<1	4	-	-
	1	1-2	-	-	1
	3	>2	-	-	3
3. Asemptomatik HBV enfeksiyonu (n=4)	2	<1	2	-	-
	1	1-2	-	1	-
	1	>2	-	-	1
4. HIV enfeksiyonu geçiren (n=1)	1	<1	-	-	1

* 490 nm'de absorbanans değeri

arkadaşları (26), C100-3/SOD şeklindeki füzyon polipeptidinin antijen olarak kullanımının, özellikle anti-SOD antikorları saptadıkları otoimmün hepatitlerdeki yalnızca anti-HCV pozitifliğinin nedeni olduğunu savunmuşlardır. Ayrıca romatoid faktörün (23); hipergamaglobulineminin (27); geçirilmiş Flavivirus ve pestivirus enfeksiyonlarına bağlı çapraz reaksiyonların (25); incelenen serumdaki anti-maya antikorlarının (20,28); kronik karaciğer hastalarında rastlanan non-spesifik düşük aviditeye sahip antikorların (29) ve bazı otoantikorların (19,21) HCV serolojisinde yalnızca ELISA pozitifliğine yol açıkları çeşitli araştırmacılar tarafından savunulmuştur. Öte yandan ELISA-pozitif kanların sadece % 17-25 oranında HCV enfeksiyonu bulaşımına yol açması, yalnızca pozitiflik oranının yüksek olduğunun bir diğer göstergesidir (24,28). Bu durumda HCV serolojisinde ELISA testine ilave olarak daha spesifik bir tekniğin kullanımı gündeme gelmiş ve en azından "pozitif ELISA" sonuçlarının kontrolü gereği doğmuştur. Bu amaçla çeşitli araştırmacı gruplar, ELISA kitlelerindeki antijenlerden farklı sentetik peptitlerin kullanıldığı ELISA sistemlerini ya da nötralizasyon esasına dayanan teknikleri doğrulama testi olarak önermişlerdir (20,30,31). Ancak bugün için ELISA'ya ilave test olarak ticari boyutlarda üretilen tek yöntem RIBA'dır. Bu tekniğin tanıdaki değeri ve bir konfirmasyon yöntemi olarak ele alınıp alınmayacağı ise tartışma konusudur.

Weiner ve arkadaşları (32) ELISA ile anti-HCV antikorları saptadıkları donör kanlarını RIBA ile incelemişler ve ELISA bulgularının absorbanans değerleri ile RIBA pozitifliği arasında bir ilişki kurmuşlardır; bu araştırmacılar düşük titrede ELISA pozitifliği saptanan 14 örneğin 12'sinde RIBA testinin negatif sonuç verdiğini belirterek yüksek titredeki ELISA pozitifliğinin gerçek seropozitifliğin göstergesi olduğunu savunmuşlardır. Aynı araştırmacılar ELISA- ve RIBA-pozitif örneklerin % 70'inde; buna karşılık ELISA-pozitif, RIBA-negatif örneklerin sadece % 4'ünde HCV-RNA'sını göstermişler ve her iki serolojik tanı tekniğinin bir arada pozitif sonuç vermesinin spesifik bir bulgu olduğunu belirtmişlerdir. Düşük titredeki ELISA pozitifliğinin RIBA ile doğrulanmadığı, Fransa'da yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir (20). Bu çalışmalarda düşük titredeki ELISA pozitifliğinin, yalnızca pozitiflik olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. Biz de çalışmamızda,

kriptojenik hepatit/siroz grubunda gözlenen düşük titredeki ELISA pozitifliğinin sadece % 15'inin RIBA ile kesin pozitif sonuç verdiğini; donörler ve asemptomatik HBV taşıyıcılarında ise, yine düşük absorbanans değeri gösteren olguların tümünün "negatif" RIBA sonucu verdiklerini saptadık.

Buna karşılık, incelediğimiz kriptojenik hepatit/siroz olgularında ELISA absorbanans değeri >2 olan 18 örneğin 15'i (% 83.3) RIBA tekniği ile pozitif bulunmuştur. Bu bulguların aksine ABD'de yapılan bir çalışmada, ELISA değerleri ile RIBA Sonuçları arasında bir ilişki olmadığı da savunulmuştur (33).

Acaba HCV serolojisinde yalnızca ELISA pozitifliği, sadece düşük absorbanans değerli bulgular ile mi kısıtlıdır? Bazı çalışmalarda bu konudaki kuşkuvarın dile getiren araştırmalar, kuvvetli pozitif ELISA sonuçlarının da yalnızca pozitiflik olabileceğini öne sürmüşlerdir (25). Çalışmamızda, ELISA absorbanans değeri >2 olan üç kriptojenik hepatit/siroz olgusunun, RIBA testi ile "şüpheli" sonuç vermeleri bu kuşkuvarı doğrulamaktadır.

ELISA ve RIBA tekniklerinin birlikte kullanıldığı bazı çalışmalarda, HIV enfeksiyonlarının serolojik tanısında ELISA'nın durumuna benzer şekilde, HCV enfeksiyonlarında da ELISA pozitifliğinin, incelenen risk grubuna göre özgülük farkı gösterdiği ileri sürülmektedir. Örneğin hemofil hastaları gibi risk gruplarında, ELISA ile saptanan seropozitifliğin % 92'si RIBA ile de gösterilirken (34); bu oran donör kesimi gibi düşük risk grubunda % 19'lara düşmektedir (33,35).

Bazı araştırmacılar ELISA ile aynı antijenleri kullanan RIBA testinin bir konfirmasyon yöntemi olarak ele alınmayacağını belirttiktedirler (36). RIBA tekniğinin, HCV serolojisine belli oranda bir özgülük getirdiği söylenebilir; örneğin bazı araştırmacıların savunduğu şekilde ELISA pozitifliğinin anti-SOD varlığından kaynaklanıp kaynaklanmadığı RIBA ile gösterilmektedir. Ancak Fusconi ve arkadaşları (37) ELISA pozitif olgularının hiçbirinde RIBA ile SOD bandında pozitiflik gözlemediklerini belirtmişlerdir. Biz de izlediğimiz 56 olgunun hiçbirinde, anti-SOD antikorlarının göstergesi olan bulgulara rastlamadık.

İnceleme olanağı bulduğumuz bir AIDS olgusunda, ELISA testi ile düşük titrede saptadığımız anti-HCV antikorlarının ne oranda gerçek seropozitifliği yansıttığını araştırdık; HIV enfeksiyonlarında sık rastlanan hipergamaglobulineminin HCV serolojisinde yalnızca pozitiflik nedenlerinden biri olduğu daha önce gösterilmiş idi; ancak bu olguda, RIBA testi ile kesin pozitif bulguları elde etmemiz (C100-3 ve 5-1-1 bantlarında kuvvetli renklenme), incelediğimiz hastanın HCV ile enfekte olduğunu, ancak güçsüzleşen immün sistemi nedeniyle anti-HCV antikor miktarının düşük olduğunu ve ELISA testinde reaksiyonun kuvvetli olmadığını düşündürmektedir.

RIBA'nın değeri konusunda yapılan bazı çalışmalarda, bu yöntemin en azından infektivite için bir gösterge olabileceği ileri sürülmektedir. Ebeling ve arkadaşları (38) tümü ELISA pozitif donör kanı kullanan alıcıları takip etmişler; bunlar arasında PT-NANBH gelişen olguların donörlerinde RIBA testini pozitif bularak, RIBA pozitifliği ile infektivite arasında bir ilişki olduğunu savunmuşlardır. Benzer sonuçlar Van der Poel ve arkadaşları (39) çalışmalarında da bildirilmiştir. Bu arada, polipeptid antijenlerinden sadece birinde pozitiflik saptanan ve bu nedenle "şüpheli" RIBA sonucu olarak değerlendirilen olguların durumu tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Bu tabloyu gösteren donör kanlarının alıcılarını izleyen bir çalışmada, sadece C100-3 bantında pozitiflik gösteren donör kanlarının da alıcılarda belirli oranda da olsa serokonversiyona yol açabildiği kanıtlanmıştır (40).

Bugün için HCV enfeksiyonlarının serolojik tanısında RIBA testinin değeri tartışma konusudur; RIBA'nın konfirmasyon testi olarak ele alınabilmesi için, şeritler üzerinde özellikle virüsün yapısal proteinlerine ait antijenler yer almalıdır. Nitekim, ikinci jenerasyon ELISA testlerinin (C100-3 ve 5-1-1 antijenlerine ilave

olarak, C33C ve C22- yapısal kor proteini -antijenlerini içeriyor) gündeme gelmesinden sonra, ikinci jenerasyon RIBA testleri de geliştirilmektedir (41). Nitekim, "4-RIBA" şeklinde tanımlanan ikinci jenerasyon RIBA testi ile elde edilen ilk bulgular, deney sonuçlarının PCR testi ile uyum gösterdiğini; bu test ile pozitif sonuç veren donör kanlarını kullanan alıcılarda PT-NANBH gelişirken, negatif bulunanlarda bu tablonun oluşmadığı bildirilmiştir (42).

Kor bölgesine ait yeni rekombinan antijenleri içeren ikinci jenerasyon testlerinin kullanımı ile deneylerin hem duyarlık, hem de özgüllük açısından oldukça yeterli düzeye geleceklere sanılmaktadır. Ayrıca bu testler ile serokonversiyonun daha erken saptanabilmesi söz konusu olacak; sonuçta akut HCV infeksiyonlarının serolojik tanısı da gündeme gelecektir.

Çalışmamızda, ELISA ile anti-HCV antikorları saptanmış olan 56 olgunun, RIBA sonuçlarına baktığımızda:

(a) ELISA'da, absorbans değerleri (O.D.) yüksek bulunan olguların büyük bölümünün RIBA ile de pozitif bulunduğu saptanmış; (b) bazı yayınlarda bildirilen aksine, ELISA'da yalnızca pozitiflik nedenlerinden biri olabileceği öne sürülen anti-SOD antikorlarına, hiçbir örnekte rastlanmadığı (RIBA ile) gösterilmiş; (c) HIV ile infekte bir olguda, hafif ELISA pozitifliğinin RIBA testinde kesin pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir.

Kaynaklar

- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a C. DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
- Bruix J, Barrera JM, Calvet X, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989; 1: 1004-6.
- Colombo M, Kuo G, Choo QL, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 1: 1006-8.
- Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2: 294-7.
- Hopf U, Möller B, Küther D, et al. Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *J Hepatol* 1990; 10: 69-76.
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4.
- Roggendorf M, Deinhardt F, Raschofer R, et al. Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet* 1989; 2: 324-5.
- Schlipkötter U, Roggendorf M, Ernst G, et al. Hepatitis C virus antibody in haemodialysis patients. *Lancet* 1990; 335: 1409.
- Schramm W, Roggendorf M, Rommel F, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus (HCV) in haemophiliacs. *Blut* 1989; 59: 390-2.
- Balık İ, Onul M, Kandilci S, Tekeli E, Tunçbilek S. Çeşitli gruplarda hepatit C virus antikorlarının prevalansı, *Türk Klin Gastroenterohepatol* 1990; 1: 55-8.
- Yenen OŞ, Badur S. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in blood donors and risk groups in Istanbul, Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 93-4.
- Uzunaliçoğlu Ö, Dönderici Ö, Çetinkaya H, Karayalçın S, Sipahi N. Kronik karaciğer hastalığında hepatit C virus antikorları prevalansı. *Gastroenteroloji* 1990; 1: 15-7.
- Badur S. Hepatit C virusu infeksiyonlarının serolojik tanısı. *Klimik Derg* 1990; 3: 58-62.
- Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335: 1-3.
- Mosley JW, Aach RD, Hollinger FB, et al. Non-A, non-B hepatitis and antibody to hepatitis C virus. *JAMA* 1990; 263: 77-8.
- Stevens CE, Taylor PE, Pindyck J, et al. Epidemiology of hepatitis C virus: a preliminary study in volunteer blood donors. *JAMA* 1990; 263: 49-52.
- Alter HJ. Discovery of the Non-A, non-B hepatitis virus: the end of the beginning or the beginning of the end. *Transf Med Rev* 1989; 3: 77-8.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-1500.
- Aceti A, Taliuni G, De Bac C, Sebastiani A. Anti-HCV false positivity in malaria. *Lancet* 1990; 336: 1442-3.
- Lazizi Y, Dubreuil P, Poynard T, Pillot J. Fausses reactions positives dans la detection des anticorps anti-virus C. *Presse Med (In Press)*.
- 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.
- Schvartz R, Weiland O, von Sydow M. False positive reactivity for antibodies against hepatitis C virus in patients with autoimmune chronic active hepatitis? *Scand J Infect Dis* 1990; 22: 377-8.
- Theilmann L, Blazek M, Goeser T, Gmelin K, Kommerell B, Fiehn W. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; 335: 1346.
- Van der Poel CL, Reesink HW, Schaasberg W, et al. Infectivity of blood sero positive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet* 1990; 335: 558-60.
- Wong DC, Diwan AR, Rosen L, et al. Non-specificity of anti-HCV test for seroepidemiological analysis. *Lancet* 1990; 336: 750-5.
- Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Kurokawa K. Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis, and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335: 1345-6.
- Dussaix E, Maggiore G, De Giacomo C, Mondelli M, Martres P, Alvarez F. Autoimmune hepatitis in children and hepatitis C virus testing. *Lancet* 1990; 335: 1160-1.
- Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 1419-22.
- Gray JJ, Wreghitt TG, Friend PJ, Wight DGD, Sundaresan V, Calne RY. Differentiation between specific and non-specific hepatitis C antibodies in chronic liver disease. *Lancet* 1990; 335: 609-10.
- Dawson GJ, Lesniewski RR, Stewart JL, et al. Detection of antibodies to hepatitis C virus in U.S. blood donors. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 551-6.
- Mimms L, Vallari D, Ducharme L, Holland P, Kuramoto JK, Zeldis J. Specificity of anti-HCV ELISA assessed by reactivity to three immunodominant HCV regions. *Lancet* 1990; 336: 1590-1.
- Weiner AJ, Truett MA, Rosenblatt J, et al. HCV testing in low-risk population. *Lancet* 1990; 336: 695.
- Menitove JE, Richards WA, Destree M. Early US experience with anti-HCV kit in blood donors. *Lancet* 1990; 336: 244-5.
- Colombo M, Rumi MG, Mannucci PM. Specificity of hepatitis C antibody ELISA in patients with haemophilia. *Lancet* 1990; 335: 1345.
- Skidmore S. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C antibody. *Lancet* 1990; 335: 1346.
- Kühnl P, Seidl S, Tanel W, Beyer J, Sibrowski W, Flik J. Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* 1989; 2: 324.
- Fusconi M, Lenzi M, Ballardini G, et al. Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1990; 336: 823.
- Ebeling F, Naukkarinen R, Leikola J. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as predictor of infectivity. *Lancet* 1990; 335: 982-3.
- Van der Poel CL, Reesink HW, Lelie PN. Anti-HCV and transaminase testing of donors blood. *Lancet* 1990; 336: 187.
- 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.
- Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Boyer N, et al. Second generation (RIBA) test in diagnosis of chronic hepatitis C. *Lancet* 1991; 337: 551-2.
- Van der Poel CL, Cuypers HJM, Reesink HW, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337: 317-8.