

Virologische Labordiagnostik der Hepatitis C

Laboratory diagnosis of hepatitis C

Annemarie Berger*

Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland

Zusammenfassung

Die 1990 eingeführten ersten kommerziellen HCV-Antikörper-Screening Tests wurden im Laufe der Jahre bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität erheblich verbessert. Inzwischen sind auch standardisierte Verfahren zum qualitativen und quantitativen HCV-RNA-Nachweis verfügbar, die Dank der Einführung eines internationalen Standards miteinander vergleichbar sind. Aber auch mittels Antigen-ELISA ist es möglich, die im Patientenblut zirkulierende Virusmenge zu quantifizieren. Einer der Hauptübertragungswege – Bluttransfusion und Blutprodukte – der HCV-Infektion wurde durch die Verbesserung der virologischen Diagnostik nahezu eliminiert. Inzwischen sind i. v.-Drogenabhängige die Hauptrisikogruppe für eine HCV-Infektion. Bislang nur zu Forschungszwecken etablierte Methoden zur Messung der zellulären Immunität oder auch die Messung neutralisierender Antikörper könnten zum Beispiel im Rahmen einer Impfstoffentwicklung an Bedeutung gewinnen.

Schlüsselwörter: Antigen; Antikörper; bDNA; Hepatitis C-Virus (HCV); Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT); RT-PCR.

Abstract

In recent years, commercial HCV antibody screening assays, which were first launched in 1990, have been significantly improved in terms of sensitivity and specificity. Standardized methods for the qualitative and quantitative detection of HCV-RNA are now available and show, due to the introduction of an international standard, a good comparability. Alternatively, the quantification of circulating amounts of viral antigen in the peripheral blood can be performed with a commercially available enzyme immunoassay (EIA). One of the main

routes of transmission of HCV infection – blood transfusion and blood products – has almost been eliminated by significant improvements in laboratory diagnostics. Actually, i. v. drug abusers represent the main risk group for HCV infection. Research-based methods used so far for the measurement of cellular immunity and neutralizing antibodies may play an important role in the development of a HCV vaccine.

Keywords: antibody; antigen; bDNA; hepatitis C-virus (HCV); nucleic acid amplification test (NAT); RT-PCR.

Einführung

Weltweit sind ca. 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) chronisch infiziert. Dies entspricht 3% der Weltbevölkerung. Die höchste Prävalenz ist mit 10% oder mehr in Westafrika, der Mongolei und Ägypten zu finden [1]. In Deutschland gibt es ca. 400.000–500.000 Virusträger dies entspricht ca. 0.4 bis 0.7% der Bevölkerung [2].

Seit der Entdeckung des Hepatitis C-Virus im Jahre 1989 ist die Diagnostik einer Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion ständig erweitert und verbessert worden [3, 4]. Die 1990 eingeführten ersten kommerziellen HCV-Antikörper-Screening Tests wurden im Laufe der Jahre bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität erheblich verbessert. Inzwischen sind auch standardisierte Verfahren zum qualitativen und quantitativen HCV-RNA-Nachweis verfügbar, die Dank der Einführung eines internationalen Standards miteinander vergleichbar sind. Aber auch mittels des kürzlich eingeführten Antigen-ELISA ist es möglich, die im Patientenblut zirkulierende Virusmenge zu quantifizieren. Dank der verbesserten Diagnostik ist die Übertragung durch Blut- und Blutprodukte auf unter 1:1.000.000 gesunken [5]. Die Hauptursache einer frischen HCV-Infektion ist inzwischen der i. v. Drogenabusus mit einer HCV-Prävalenz bei Drogenabhängigen von 70–90% [6].

HCV-Antikörper-Nachweis

Der Nachweis anti-HCV-spezifischer Antikörper in Plasma oder Serum erfolgt mittels Enzym-Immunoassays (EIA). Diese Tests sind inzwischen vollautomatisiert und

*Korrespondenz: Institut für Medizinische Virologie, Paul Ehrlich-Str. 40, 60596 Frankfurt am Main, Deutschland
Tel.: +49 (0)69/6301 4303
Fax: +49 (0)69/6301 6477
E-mail: Annemarie.Berger@em.uni-frankfurt.de

liefern gut reproduzierbare Resultate bei niedrigem Kostenaufwand, so dass sie sehr gut zum Patientenscreening verwendet werden können. Die Antikörpertests der so genannten ersten Generation wiesen nur eine humorale Immunantwort gegen ein rekombinantes HCV-Nicht-Strukturprotein (c100-3) nach, das den NS3- und NS4-Bereich des HCV-Genoms teilweise abdeckte. EIA-Tests der ersten Generation entdeckten nur etwa 65 bis 85% aller HCV-positiven Patienten. In der zweiten Generation wurden ein weiteres Nicht-Struktur-Protein (NS3) und das Core-Protein hinzugefügt. Diese Tests waren wesentlich sensitiver und spezifischer und reduzierten das diagnostische Fenster auf durchschnittlich 10 Wochen verglichen mit den durchschnittlich 16 Wochen der Tests der ersten Generation [7]. Dies führte im Blutspender-Screening zu einer deutlichen Absenkung des Transmissionsrisikos einerseits und einer Reduktion falsch positiver Resultate andererseits. Allerdings ist nach wie vor mit unspezifischen Resultaten zu rechnen, die zum Teil durch rekombinante Immunoblots geklärt werden können. Ausserdem besteht noch immer ein Sensitivitätsproblem beim Screening von Hämodialysepatienten und anderweitig immunsupprimierten Patienten. Auch bei Patienten mit HCV-assoziiierter Kryoglobulinämie gibt es Berichte über falsch negative HCV-Antikörpertests [8]. Die Einführung des NS5-Proteins in die Tests der dritten Generation erbrachte keine wesentliche Verbesserung, da dieses Epitop insbesondere in Kollektiven mit einer niedrigen HCV-Prävalenz zu falsch positiven Resultaten führte [9]. Allerdings wurde die Sensitivität der Tests durch die Rekonfiguration der NS3- und Core-Bestandteile wesentlich verbessert [10].

Diese Antikörpertests der dritten Generation haben das diagnostische Fenster um zwei bis drei Wochen verkürzt und bedürfen aufgrund ihrer hohen Spezifität in der Regel keiner weiteren Zusatztestung. Lediglich niedrig positive Resultate und negative Testergebnisse immunsupprimierter Patienten sollten gegebenenfalls durch weitere Untersuchungen abgesichert werden.

Es sind Zusatztests verfügbar, die in der Regel mit auf Zellulosestreifen gekoppelten rekombinanten HCV-Proteinen arbeiten (Rekombinante Immunoblots, RIBA). Diese Tests erlauben eine Aufschlüsselung der Immunantwort gegenüber verschiedenen HCV-Epitopen. Sie zeichnen sich durch eine höhere Testspezifität bei geringerer Sensitivität aus [11]. Daher ist für diese Tests anstelle von "Bestätigungstest" besser der Begriff "Zusatztest" zu wählen, da zum einen aufgrund des Sensitivitätsunterschiedes nicht jedes Screeningresultat bestätigt werden kann. Zum anderen arbeiten die Immunoblots mit denselben Proteinen wie die Screening Tests, so dass eine unspezifische Antwort gegenüber den verwendeten Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann [12]. Ein "bestätigt" positiver HCV-Antikörpertest bedeutet keine aktive Infektion des Patienten. Es können noch mehrere Jahre nach Ausheilung der Infektion spezifische Antikörper nachweisbar sein. Dies zeigt die Bedeutung

des HCV-RNA-Nachweises für die Diagnose einer aktiven Infektion.

Bei 50 bis 93% der akuten Infektionen gelingt der Nachweis von IgM-Antikörpern, doch auch 50–70% der chronisch infizierten Patienten haben nachweisbare IgM-Antikörper [13]. Die Signifikanz des Nachweises von anti-HCV IgM-Antikörpern ist nach wie vor unklar. Eventuell kommt ihm eine prognostische Relevanz bei der Ermittlung des Mutter-Kind-Transmissionsrisikos zu [14].

Nachweis neutralisierender Antikörper

In Rahmen der Erforschung des Infektionsverlaufs, aber auch der Impfstoffentwicklung und Therapie, wurden Methoden zum Nachweis HCV-neutralisierender Antikörper etabliert. Durch die Herstellung von so genannten HCV-Pseudopartikeln, d. h. nicht-infektiösen Viruspartikeln, die die Hülle von HCV (die HCV-Glycoproteine E1 und E2) tragen, ist es möglich, HCV-Neutralisationstests aufzubauen, die einem Infektionsmodell in der Zellkultur sehr nahe kommen [15]. Zur Zeit wird auf diesem Gebiet sehr intensiv gearbeitet und die Bedeutung der neutralisierenden Antikörper intensiv erforscht. Ob solche Testsysteme auch in der Routinediagnostik an Bedeutung gewinnen, lässt sich derzeit nicht vorhersagen.

Messung der zellulären Immunität

Nur in ca. 20% der akuten HCV-Infektionen kommt es zu einer Ausheilung. Der Rest verläuft chronisch und es besteht im Prinzip keine Chance auf spontane Ausheilung. Neueste Studien zeigen, dass der zellulären Immunantwort des Patienten in diesem Rahmen eine essentielle Bedeutung zukommt. CD4+ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunität, indem sie die Antwort der zytotoxischen CD8+ T-Zellen ankurbeln und aufrechterhalten. Virusspezifische CD8+ T-Zellen sind in der Lage, infizierte Zellen (z. B. auch Hepatozyten) zu erkennen und zu zerstören. Der Übergang von einer akuten in eine chronische HCV-Infektion ist mit einer deutlichen Abnahme der HCV-spezifischen CD4+ T-Zellzahl assoziiert [16].

Die Entwicklung durchflusszytometrischer Bestimmungsverfahren für individuelle Antigen-spezifische T-Lymphozyten schreitet rasant voran. Eines der Hauptprobleme dieser Methoden ist die Verfügbarkeit von Virusantigenen, die die Lymphozyten ausreichend stimulieren können, da z. B. ein Vollvirus aufgrund fehlender Zellkultursysteme nicht zur Verfügung steht. Zur Zeit wird mit rekombinanten Proteinen, Polypeptiden und Tetra- bzw. Pentamer-Komplexen gearbeitet. Auch hier sind die etablierten Testmethoden noch weit davon entfernt, Eingang in die Routinediagnostik zu finden, unter anderem, weil sie bislang schlecht miteinander vergleichbar und schlecht reproduzierbar sind.

Direkte Nachweismethoden

HCV-Antigen-Test

Seit wenigen Jahren ist ein kommerzieller quantitativer HCV-Antigentest verfügbar. Im Testformat der zweiten Generation ist es dank einer vorgeschalteten Säuredissoziation möglich, auch bei gleichzeitig vorhandenen Anti-HCV-Antikörpern das HCV Core-Protein nachzuweisen. Der Antigennachweis korreliert relativ gut mit dem HCV-RNA-Nachweis. Durch den Nachweis auch leerer Viruskapside (inkompletter Viruspartikel) hat der Test eine relativ hohe Sensitivität. Die Nachweisgrenze dieser Tests liegt bei 2 pg/mL, wobei vergleichenden Berechnungen zufolge 1 pg/mL Core-Protein ungefähr 8.000 IU/mL HCV-RNA entsprechen [17, 18].

HCV-RNA-Nachweis

Da die zu detektierende Virusmenge im Blut HCV-infizierter Patienten relativ niedrig sein kann, sind Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NATs) Mittel der Wahl zum Nachweis einer aktiven Infektion. Zum qualitativen Nachweis stehen hier auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Methoden und die Transcriptionsmediated Amplification (TMA) zur Verfügung, die HCV-RNA durch Vermehrung einer Zielsequenz des HCV-Genoms mit einer Sensitivität von ca. 50 IU/ml nachweisen können (Tabelle 1). Ursprünglich bestand auch bei kommerziellen Testformaten eine hohe Variabilität der Testresultate [19, 20], die durch Standardisierung und vor allem durch den Erfahrungszuwachs der Anwender deutlich verbessert werden konnten [7]. Der sensitive qualitative HCV-RNA-Nachweis findet insbesondere im Blutspenderscreening, der Untersuchung von Blutprodukten und bei der Abklärung unklarer serologischer Befunde Anwendung und hat eine signifikante diagnostische Verbesserung erbracht.

Seit 1999 steht ein internationaler Standard zur Verfügung, der die bisher verwendete Bezeichnung Kopie bzw. Genomäquivalent ablöst und die Testresultate insbesondere quantitativer Testmethoden besser miteinander vergleichbar macht [21]. Zur Quantifizierung der viralen RNA stehen u. a. Techniken der Signalamplifikation (bDNA) zur Verfügung (Tabelle 1). Bei diesem Verfahren wird die virale HCV-RNA in einer Mikrotiterplatte über eine spezifische Hybridisierung an Sonden gebunden, die komplementär zur 5'-Non-Coding-Region (5'NCR) und zur Core-Region sind. Die Signalamplifikation erfolgt durch die Hybridisierung der gebundenen RNA über mehrere Stufen mit so genannten verzweigten (branched) Sonden, die mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Die Quantifizierung erfolgt durch eine extern mitgeführte Standardreihe. Diese Methode steht bislang semi-automatisch zur Verfügung. Der manuelle Arbeitsaufwand ist aber insbesondere bei großer Probenzahl relativ gering. NATs basieren auf Amplifikation einer spezifischen Zielsequenz und quantifizieren durch kompeti-

tive bzw. Co-Amplifikation des viralen Genoms mit einem synthetischen internen Standard mit bekannter Kopienzahl. Inzwischen gibt es hier vollautomatische Testformate, die nur noch einen geringen manuellen Testaufwand erfordern [22]. Die Nachweisgrenze des kommerziellen quantitativen HCV Monitor Test Version 2.0 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) liegt bei 600 IU/mL mit einem linearen Messbereich bis 700.000 IU/mL.

Hat bislang die bDNA (Versant HCV RNA 3.0 Assay, Bayer Vital Diagnostika, Leverkusen, Deutschland) durch eine größere Präzision bei etwas geringerer Sensitivität gegenüber der RT-PCR über einen wesentlich größeren Messbereich (615 IU/mL bis 7.700.000 IU/mL) quantitative Resultate liefern können, so werden nun so genannte Real Time (RT)-PCR-Tests, die sich durch einen großen linearen Messbereich bei gleichzeitig hoher Sensitivität auszeichnen, auch in kommerziellem Format eingeführt. Inzwischen werden die kommerziellen Nachweisverfahren hinsichtlich ihrer Tauglichkeit überprüft, verschiedene HCV-Genotypen gleichwertig nachzuweisen, dennoch ist es aufgrund der hohen Variabilität dieser Virusgruppe immer wieder möglich, dass verschiedene Tests genotypabhängig unterschiedliche Resultate liefern können bzw. bestimmte Isolate in dem einen oder anderen Test nicht detektierbar sind.

Die Bedeutung einer quantitativen Viruslastbestimmung ist auch vom Genotyp abhängig. So stellt sich die Frage, ob und wie therapiert wird, bei einer chronischen Infektion mit Genotyp 2 oder 3 zunächst unabhängig von der Virusmenge im Blut, wogegen die Virusmenge bei einer Infektion mit Genotyp 1 eine entscheidende Rolle spielt. Insbesondere kommt hier der Messung im Therapieverlauf eine große Bedeutung zu. Eine Abnahme der Virusmenge um weniger als 2-log_{10} innerhalb von 12 Wochen ist ein relativ sicherer Hinweis auf ein Therapieversagen [23].

HCV-Genotypisierung

Das Hepatitis C-Virus ist eine sehr heterogene Virusgruppe mit bislang sechs verschiedenen Genotypen und zahlreichen Subtypen, die mit unterschiedlicher geographischer Verbreitung genetisch über 30% divergent sein können [24]. Trotz dieser hohen Divergenz sind die verschiedenen HCV-Varianten bezüglich Transmission, Persistenz und Krankheitsverlauf erstaunlich einheitlich. Lediglich im Rahmen der Therapie besteht inzwischen der Konsens, dass der HCV-Genotyp der wichtigste prognostische Faktor ist.

Der Goldstandard zur Genotypisierung ist die direkte Sequenzierung der NS5B- oder E1-Region mit einer Auswertung über einen Sequenzvergleich und phylogenetischer Analyse. Kommerziell verfügbar sind ein auf Sequenzierung der 5'-NCR-Region basierender Test (Trugene HCV 5'NC Genotyping Kit, Bayer) und der so genannte Line-Probe-Assay (Inno-LIPA HCV II, Bayer),

Tabelle 1 Kommerziell verfügbare molekularbiologische HCV RNA-Nachweisverfahren.

Test	Hersteller	Methode	Nachweisgrenze bzw. Messbereich
Cobas Amplicor HCV 2.0	Roche Diagnostics, Basel	Semi-automatische qualitative RT-PCR (manuelle Extraktion)	50 IU/mL
Amplicor HCV Monitor 2.0	Roche Diagnostics, Basel	Semi-automatische quantitative RT-PCR (manuelle Extraktion)	600–700.000 IU/mL
Versant HCV RNA Qualitative assay	Bayer Diagnostics, Leverkusen	Manuelle qualitative TMA	50 IU/mL
Versant HCV RNA 3.0 assay	Bayer Diagnostics, Leverkusen	Semi-automatische bDNA	615–7.700.000 IU/mL
LCx HCV RNA Quantitative Assay	Abbott Diagnostics, Delkenheim	Semi-automatische quantitative RT-PCR (manuelle Extraktion)	25–2.630.000 IU/mL

bei dem Biotin-markierte Amplifikate der 5'-NCR auf mit Genotyp-spezifischen Sonden bestückten Membranstreifen hybridisiert und angefärbt werden. Aber auch in-house Methoden, wie z. B. Verdau von PCR-Amplifikaten mit Restriktionsenzymen und Analyse der Fragmentlängen (RFLP), liefern verlässliche Resultate. Die erwähnten Methoden sind zur Bestimmung einer Vielzahl von HCV-Typen ausreichend, wobei die Bestimmung des Subtyps mit Fehlern behaftet sein kann.

Die serologische Typendifferenzierung durch die Messung von typspezifischen Antikörpern, die gegen die NS4-Region gerichtet sind, hat sich auf dem Markt nicht durchgesetzt. Der darauf beruhende kommerzielle Test (Murex HCV Serotyping 1-6 Assay, Murex Diagnostics, Dartford, UK) liefert in ca. 90% der Fälle bei immunkompetenten Patienten auswertbare Resultate, die zu ca. 95% mit molekularbiologischen Verfahren übereinstimmen [11, 25].

Ausblick

Fünfzehn Jahre nach Entdeckung des HCV stehen zahlreiche Methoden zum Infektionsnachweis und auch zum Monitoring des Infektionsverlaufs zur Verfügung. Durch die ständige Verbesserung der verfügbaren Antikörper-tests gehört inzwischen einer der Hauptübertragungswege der HCV-Infektion – Bluttransfusion und Blutprodukte – der Vergangenheit an. Inzwischen sind i. v.-Drogenabhängige die Hauptrisikogruppe für eine HCV-Infektion. Noch immer bereitet die genetische Vielfalt dieser Virusgruppe Probleme bei der Etablierung und Standardisierung neuer Testmethoden. Die Einführung neuer Therapeutika (z. B. von HCV-Protease-Hemmern) werden auch eine Umstellung der Routinediagnostik, wie z. B. die Etablierung einer genotypischen Resistenztestung, notwendig machen. Auch bislang nur für Forschungszwecke etablierte Methoden zur Messung der humoralen Immunität oder auch die Messung neutralisierender Antikörper könnten beispielsweise im Rahmen einer Impfstoffentwicklung an Bedeutung gewinnen.

References

1. Lavanchy D, McMahon B. Hepatitis C. In: Liang T, Hoofnagle J, editors. San Diego: Academic Press, 2000.
2. Epidemiologisches Bulletin Nr. 37, Robert Koch Institut, 10. September 2004;307–15.
3. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–62.
4. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362–4.
5. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitschutz* 2003;46:712–22.
6. De Ridder M, Dettmer K, Hackenberg B, Leicht A. Hepatitisimpfung auf offenen Drogenszenen. *Dtsch Ärzteblatt* 2004;101:2337–40.
7. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:43S–7S.
8. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993;328:465–70.
9. Pawlotsky JM, Maisonneuve P, Duval J, Dhumeaux D, Noel L. Significance of NS5-“indeterminate” third-generation anti-hepatitis C virus serologic assays. *Transfusion* 1995;35:453–4.
10. Vrieling H, Zaaijer HL, Reesink HW, van der Poel CL, Cuyper HT, Lelie PN. Sensitivity and specificity of three third-generation anti-hepatitis C virus ELISAs. *Vox Sang* 1995;69:14–7.
11. Pawlotsky JM, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, et al. Significance of indeterminate third-generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996;34:80–3.
12. Berger A, Doerr HW, Preiser W, Weber B. Lack of correlation between different hepatitis C virus screening and confirmatory assays. *J Virol Methods* 1996;59:141–6.
13. Quiroga JA, van Binsbergen J, Wang CY, Pardo M, Navas S, Trines C, et al. Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus core antigen: correlations with viral replication, histological activity, and liver disease outcome. *Hepatology* 1995;22:1635–40.

14. Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldo F, Ciana G, Fertz C, Alberico S, et al. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *J Med Virol* 2002;67:137–42.
15. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633–42.
16. Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:391–424.
17. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36:211–8.
18. Schuttler CG, Thomas C, Discher T, Friese G, Lohmeyer J, Schuster R, et al. Variable ratio of hepatitis C virus RNA to viral core antigen in patient sera. *J Clin Microbiol* 2004;42:1977–81.
19. Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993;341:722–4.
20. Damen M, Cuypers HT, Zaaijer HL, Reesink HW, Schaasberg WP, Gerlich WH, et al. International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J Virol Methods* 1996;58:175–85.
21. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999;76:149–58.
22. Stelzl E, Kormann-Klement A, Haas J, Daghofer E, Santner BI, Marth E, et al. Evaluation of an automated sample preparation protocol for quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2002;40:1447–50.
23. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S3–20.
24. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173–88.
25. Prescott LE, Berger A, Pawlotsky JM, Conjeevaram P, Pike I, Simmonds P. Sequence analysis of hepatitis C virus variants producing discrepant results with two different genotyping assays. *J Med Virol* 1997;53:237–44.