

Stellenwert der HCV-Zusatztests im Vergleich zu den Screening Hepatitis-C-Virus EIAs und der HCV-RT-PCR

Diagnostic potential of Hepatitis-C-virus supplementary tests in comparison to screening EIAs and HCV-RF-PCR

Annemarie Berger, B. Weber, H. Rabenau, H. W. Doerr

Zusammenfassung

Als Screening- und Zusatztests für die serologische Diagnose der Hepatitis-C-Virus-Infektion werden eine Vielzahl von kommerziellen Enzymimmunoassays (EIA) bzw. rekombinante Immunoblots angeboten. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Ergebnisse der einzelnen Tests miteinander zu vergleichen und die zusätzliche diagnostische Aussagekraft der Immunoblots im Vergleich zu den anti-HCV EIAs und der HCV-RNA-Amplifizierung mittels PCR zu untersuchen. Die Ergebnisse der Ergänzungstests der 3. Generation korrelierten besser mit der PCR als die Screening-EIAs. Der Gewinn an Sensitivität der Immunoblots der 3. Generation war dabei nicht auf den Einsatz zusätzlicher Proteine aus dem NS5- und/oder E2/NS1-Bereich zurückzuführen. Es wurde eine hohe Korrelation zwischen mittleren Antikörper-Index-Wert im Anti-HCV-EIA, Anzahl der reaktiven Banden im Immunoblot und PCR beobachtet. Aus den Ergebnissen unserer Studie geht hervor, daß sowohl die Screening-EIAs als auch die Immunoblots untereinander z. T. sehr divergierende Resultate zeigen und daß letztere nur wenig zusätzliche Aussagekraft im Vergleich zu den Suchtests und der PCR besitzen.

Anschriften der Autoren:

Institut für Med. Virologie, Zentrum der Hygiene,
Universitätskliniken Frankfurt/Main

Korrespondenz-Adresse:

Annemarie Berger
Institut für Med. Virologie
Zentrum der Hygiene
Paul-Ehrlich-Str. 40
60596 Frankfurt a. M.

Lab. med. 19: 260-264 (1995)

Schlüsselwörter

HCV EIA – RIBA – RT-PCR

Summary

Numerous commercial enzyme immunoassays (EIA) and recombinant immunoblots are available as screening and supplementary assays for the serological diagnosis of hepatitis C virus infection. The aim of the present study was to compare different test kits and to evaluate the supplementary diagnostic potential of immunoblots in comparison with anti-HCV EIAs and HCV RNA amplification. The results of the supplementary tests of the third generation showed the highest agreement with PCR. The improvement of sensitivity of the immunoblots of the third generation was not attributable to the additional proteins of the NS5 or E2/NS1 region. A high correlation was observed between mean antibody index value of the anti-HCV EIA, amount of reactive bands in the immunoblot, and PCR. The results of our study show that screening EIAs and immunoblots show highly divergent results and that the latter are of a poor supplementary diagnostic value compared with screening assays and PCR.

Key words

HCV EIA – RIBA – RT-PCR

Einleitung

Das Hepatitis C Virus ist ein den Flavi- oder Pestiviren verwandtes Virus mit einer positiven Einzelstrang RNA [4]. Die Infektion erfolgt überwiegend parenteral und ist weltweit verbreitet. Die höchste Durchseuchungs-

raten werden bei Hämophilen und IVDA beobachtet [16]. Über 60 % der HCV-Infektionen werden nach einer meist subklinischen oder milden und daher oft unerkannten akuten Infektion chronisch und persistieren über Jahre [7].

Die Labordiagnose einer HCV-Infektion erfolgt hauptsächlich durch den Nachweis von gegen das HCV gerichteten Antikörpern. Hierfür stehen heute eine Reihe von kommerziellen Testsystemen zur Verfügung, die Enzym Immuno Assays (EIA) der 2. und die noch nicht vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassenen EIAs der 3. Generation, in denen verschiedene rekombinante Proteine bzw. synthetische Peptide des HCV eingesetzt werden. Als Zusatztests für eine im EIA wiederholt reaktive Probe werden „rekombinante Immuno Blot Assays“ der 2. und 3. Generation herangezogen.

Obwohl im Vergleich zu den „Screening“-Tests der 1. Generation, die Sensitivität und Spezifität der HCV-EIAs der 2. Generation wesentlich verbessert wurde [2, 3, 8, 10, 12, 15], ist die serologische Diagnose der HCV-Infektion nach wie vor schwierig. HCV-spezifische Antikörper werden frühestens einige Wochen nach Ausbruch einer akuten Hepatitis C gebildet [5]. Bei immunsupprimierten Patienten kann bei einer chronischen HCV-Infektion die Immunantwort und damit die Nachweisbarkeit von spezifischen Antikörpern versagen [13]. Aufgrund der Stammheterogenität von HCV ist zu befürchten, daß mit den aktuellen Tests, welche rekombinante bzw. synthetische Antigene entsprechend dem HCV Genotyp 1 einsetzen, Infektionen mit stark divergierenden Genotypen nicht erfaßt werden [9]. Eine Abgrenzung einer akuten von einer chronischen Infektion ist zur Zeit nicht möglich. Zudem bleibt auch die Frage der biologischen und klinischen Bewertung grenzwertiger Ergebnisse, vor allem der „Bestätigungstests“ offen [1].

Um die diagnostische Aussagefähigkeit aktueller Testsysteme zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Arbeit 45 Serumproben parallel mit einem Anti-HCV EIA der 2. Generation (Abbott, Wiesbaden), Inno-EIA (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgien), RIBA der 2. Generation (Chiron, Emeryville, USA), RIBA der 3. Generation (Chiron, Emeryville, USA) und einem Line-Immuno-Assay (Inno-LIA, Innogenetics, Belgien) untersucht. Gleichzeitig wurden diese Proben mittels RT-PCR auf das Vorkommen von HCV-RNA getestet.

Material und Methoden

Serumpanel

Es wurden Serum- oder Plasmaproben, welche im Anti-HCV-EIA der 2. Generation (Abbott) positive oder grenzwertige Ergebnisse zeigten, mit verschiedenen Enzymimmuno-Assays, Radioimmuno-Blot-Assays, und der RT-PCR untersucht.

Die Gesamtzahl der untersuchten Proben betrug 45. Darunter waren 25 Proben von Kindern mit Verdacht auf eine Hepatitis C, 14 Proben stammten von klinisch gesunden Blutspendern, vier von Nierentransplantierten und bei zwei der Proben handelte es sich um Plasmapools. Von einem Probanden standen mehrere Verlaufsproben unter IFN-alpha Therapie zur Verfügung.

HCV-Antikörpertests

Für den HCV-Antikörpernachweis werden im Abbott Anti-HCV-EIA Antigen beschichtete Polystyrolkugeln eingesetzt. Die in diesem Test verwendeten rekombinanten Antigene stammen aus dem Nicht-Struktur(NS)-3, NS-4- und Core-Bereich. Die Antigenbeschichtung des Inno-EIA, der in einer Mikro-

Core	Env	NS1	NS2	NS3	NS4	NS5
HCV-EIA	c22			33c	c100	
RIBA II	c22			33c	c100	
RIBA III	c22 (p)			33c	c100 (p)	NSS
Inno-EIA	C1 C2	E2		C19b	NS4 a, b	NSS
Inno-LIA	C1 C2	E2		C19b	NS4 a, b	NSS

Abb. 1. Lokalisation der Nukleinsäure-Sequenzen im HCV-Genom, welche für die in den Antikörpertestsystemen verwendeten Antigene kodieren

titerplatte durchgeführt wird, entspricht der des Inno-LIA (Abb. 1).

Der RIBA basiert auf dem Western blot-Prinzip und dient als Ergänzungstest für eine Serum- oder Plasmaprobe, welche wiederholt reaktiv im EIA ist. Im Test der 2. Generation sind die Nitrozellulosestreifen mit insgesamt fünf rekombinanten Antigenen bestückt (5-1-1, c100-3, c33c, c22-3) und humaner Superoxid-dismutase als Kontrollbande. Der RIBA der 3. Generation verwendet 3 rekombinante Antigene das c33c, NS-5 und SOD und 2 synthetische Peptide c22 und c100.

Der Inno-LIA basiert auf dem gleichen Prinzip wie die RIBA-Tests. Die Nitrozellulosestreifen sind mit einem rekombinanten Protein, dem NS3, und mit fünf synthetischen Peptiden aus dem C1+2-, C3+4-, E2/NS1-, NS4- und NS5-Bereich beschichtet. Abbildung 1 zeigt den HCV-Genomaufbau und die Lokalisation

Abkürzungen:

HCV = Hepatitis C Virus

IFN = Interferon

IVDA = intravenös Drogenabhängige

RIBA = rekombinierte Immunoblot Assays

SOD = Superoxiddismutase

der Nukleinsäuresequenzen der einzelnen Antigene im HCV Genom.

Die Testdurchführung und Interpretation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Bei der Beurteilung des Abbott HCV-EIAs wurden Proben, deren Extinktionswerte unter dem berechneten Grenzwert lagen als negativ, solche, die eine Extinktion zwischen 0,8 und 1,199 zeigten, als grenzwertig und Proben die über diesem Wert lagen als reaktiv bezeichnet. Beim Inno-EIA wurde der cut-off anhand der Extinktionswerte der Positiv- und Negativ-Kontrollen berechnet. Proben, welche über diesem Wert lagen, wurden als reaktiv und Proben, deren Extinktionswert unter dem cut-off lagen, wurden als negativ beurteilt.

Die Auswertung der RIBA II- und RIBA III-Teststreifen erfolgte über die Anzahl und Intensität der reaktiven Banden. Das Vorkommen einer isolierten positiven Bande wurde in beiden Tests als grenzwertig beurteilt, erst wenn zwei Banden reagierten galt der Test als positiv.

Die Beurteilung des Inno-LIAs erfolgte im Vergleich zu den auf dem Teststreifen enthaltenen Kontrollen. Hier wurde schon die Reaktion einer einzelnen Bande als positiv bewertet.

HCV-RT-PCR

Für die HCV-PCR wurden 200 µl Serum mit 1 ml Trizol (GIBCO, BRL, Eggenstein) versetzt und die RNA anschließend durch Zugabe von 100 µl Chloroform extrahiert. Um eine Anreicherung zu erzielen, wurde die RNA anschließend mit Isopropanol gefällt, das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl H₂O zurückgelöst.

Die Reserve Transkription (M-MLV Reserve Transkriptase, Perkin Elmer, Langen) erfolgte für 15 min bei 42°C, anschließend wurde die Probe für 5 min aufgekocht, um eine residuelle Reverse Transkriptase-Aktivität zu unterbinden. Die Amplifikation der cDNA wurde mittels Taq DNA Polymerase (Boehringer, Mannheim) mit Primern der 5'-Noncoding Region durchgeführt.

Für die erste PCR wurden die äußeren Primer NOPS 1: 5'-GGC-GAC-ACT-CCA-CCA-TAG-AT-3' und NOPA 1: 5'-TGC-ACG-GTC-TAC-GAG-ACC-TC-3' und für die Nested-PCR die Primer NIPS 1: 5'-ACT-CCC-CTG-TGA-GGA-ACT-A-3' und NIPA 1: 5'-CAC-TGC-CAA-GCA-CCC-TAT-CA-3' eingesetzt. Es wurden 35 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95° C, einer Annealingtemperatur von 56° C und einer Extensionstemperatur von 72° C durchgeführt (Thermocycler bio-med 60/2, Bachhofer, Reutlingen).

Die Nested-PCR wurde bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Die anschließende Detektion des 274 Basen langen Amplifikats erfolgte auf 20 %igen

Polyacrylamidgelen mittels Silbernitratfärbung (Pharmacia, Freiburg).

Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Vergleichsstudie zu den verschiedenen HCV-Antikörpertests sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt. 40 Seren waren positiv im Abbott HCV EIA 2. Generation, die restlichen Proben ergaben ein grenzwertiges Ergebnis. Während in allen Vergleichstests die 5 grenzwertigen Proben negativ waren, ergab sich ein sehr heterogenes Bild was die Auswertung der Abbott HCV EIA positiven Seren in dem Inno-EIA und den Zusatztests betrifft.

Im HCV-Inno-EIA ergaben von den 40 Proben 35 ein positives Ergebnis, die übrigen Seren waren hier eindeutig negativ. Im RIBA II konnten knapp mehr als die Hälfte der 40 Proben (n = 24) „bestätigt“ werden. 9 Seren ergaben im RIBA II ein Bandenprofil, welches als grenzwertig interpretiert wurde. Drei weitere Proben waren im RIBA III positiv, 5 grenzwertig und eine im RIBA II grenzwertige Probe erwies sich als negativ. Der Inno-LIA erzielte, bedingt durch die Interpretationskriterien, die höchste Anzahl positiver Ergebnisse (n = 33), 7 Proben waren negativ.

Abbildung 2 zeigt die Anzahl der reaktiven Banden in den drei verschiedenen Zusatztests. Am häufigsten erwiesen sich die Antigene aus dem putativen „core“-Bereich als reaktiv, je nach Test 31 bzw. 32 der Seren. Im NS3 Bereich waren eindeutig mehr Proben im RIBA III (n = 26) und Inno-LIA reaktiv als im RIBA II (n = 6). Die höchste Anzahl (n = 24) positiver Banden aus dem NS4-Bereich wurde mit dem Inno-LIA beobachtet. Dagegen reagierten im RIBA II und III jeweils nur 14 und 17 Seren mit den NS4-abgeleiteten Antigenen. NS5-spezifische Antikörper waren testbedingt nur mit dem RIBA III und Inno-LIA nachweisbar. Insgesamt waren hier nur 11 (RIBA III) bzw. 9 Seren (Inno-LIA) positiv. Durch den Einsatz sowohl

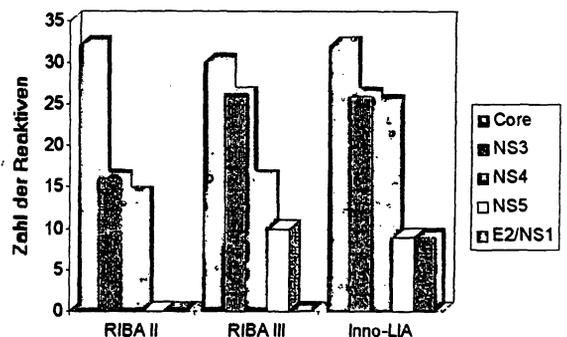


Abb. 2. Anzahl der mit den verschiedenen HCV-Proteinen reaktiven Seren

Tabelle 1. Ergebnisse verschiedener anti-HCV-Screening- und Zusatztests im Vergleich

Reaktivität Anti-HCV EIA/ Vergleichstest	+ (n = 40)		+/- (n = 5)	
	+	+/-	-	-
Inno-EIA	35 (24)	0	5 (0)	5 (0)
RIBA II	24 (19)	9 (5)	7 (1)	5 (0)
RIBA III	27 (21)	5 (2)	8 (1)	5 (0)
Inno-LIA	33 (24)	0	7 (0)	5 (0)
PCR	25	0	15	5

(): Davon in der HCV-RT-PCR positiv

der NS5- (RIBA III und Inno-III) und der E2/NS1-Antigene (Inno-LIA) konnte keine zusätzliche Probe erkannt werden, welche aufgrund ihrer Reaktivität mit den anderen Proteinbanden als grenzwertig bzw. negativ eingestuft wurde.

Von den 40 im Abbott HCV EIA positiven Seren waren 25 in der RT-PCR positiv (Tabelle 1). Die im Abbott-Test grenzwertigen Proben waren in der PCR negativ.

Von den 25 in der PCR positiven Proben waren 17 in allen serologischen Tests eindeutig positiv. Drei der in der PCR positiven Proben zeigten im RIBA II ein grenzwertiges Ergebnis. Eine Probe zeigte im RIBA III und ein weiteres Serum um RIBA II und RIBA III ein grenzwertiges Ergebnis. Diese Proben waren in allen anderen Tests eindeutig positiv.

Zwischen HCV-RNA-Nachweis und dem Abbott HCV EIA Index-Wert sowie der Anzahl der in den Immunoblots reaktiven Banden konnte eine klare Assoziation nachgewiesen werden. Der durchschnittliche HCV EIA Index-Wert der PCR-positiven Proben betrug $4,3 \pm 1,1$ SD. Bei den PCR-negativen Proben wurde ein Wert von $2,4 \pm 1,1$ SD ermittelt. PCR-positive Proben zeigten durchschnittlich 2,5 reaktive Banden im Immunoblot, dagegen wurden bei den HCV-RNA negativen Seren nur 0,9 Banden beobachtet.

Weiterhin wurde eine Abhängigkeit zwischen dem durchschnittlichen EIA-Indexwert und der Anzahl der reaktiven Banden im Immunoblot beobachtet. RIBA II negative Seren zeigten einen durchschnittlichen Index von $1,8 \pm 0,8$ SD. Proben mit einer reaktiven Bande ergaben einen durchschnittlichen Index von

$3,5 \pm 1,3$ SD. Bei zwei reaktiven Banden betrug der Wert $4,1 \pm 1,1$ SD, bei drei $4,2 \pm 1,1$ SD und bei vier reaktiven Banden $5,2 \pm 1,2$ SD.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse von 7 Verlaufsproben eines zwölfjährigen HCV infizierten Hämophilen unter IFN-alpha-Therapie. Im Verlauf der IFN-Behandlung wurde die PCR vorübergehend negativ. Gleichzeitig wurde ein Bandenverlust im NS3-Bereich beobachtet. Dagegen blieb bei den beiden anderen Zusatztests das Bandenmuster unverändert. Der Anti-HCV EIA und Inno-EIA war in allen 7 Proben positiv.

Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, daß die kommerziellen Screening-anti-HCV-EIAs und Zusatztests eine mangelhafte Übereinstimmung zeigen, obwohl größtenteils Antigene aus gleichen Genombereichen eingesetzt werden. Neben den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der HCV-spezifischen Antigene (RIBA II, III vs. Inno-LIA) spielen die eingesetzte Antigen-Konzentration eine entscheidende Rolle. Die Zusatztests der 3. Generation zeigen eindeutig weniger grenzwertige Ergebnisse als die Tests der 2. Generation. Die verbesserte Aussagekraft der Ergebnisse ist nicht auf den Einsatz neuer Antigene aus der NS5 Region (RIBA III und Inno-LIA) und E2/NS1 (Inno-LIA) zurückzuführen (Abb. 2). Eventuell sind verbesserte Herstellungs- und Aufreinigungstechniken der synthetischen bzw. rekombinanten Antigene für den Gewinn an Sensitivität verantwortlich.

Erwartungsgemäß wurde eine hohe Korrelation zwischen mittleren Antikörper-Index-Wert im Anti-HCV-EIA, Anzahl der reaktiven Banden im Immunoblot und PCR beobachtet. Entsprechend den Ergebnissen von Yousuf et al. [17], wurden bei über 76 % der PCR-positiven Patienten 2 oder mehr Banden in den einzelnen Zusatztests nachgewiesen. Die PCR-positiven Proben zeigten durchschnittlich höhere Indexwerte als die negativen Seren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schlipkötter et al. [14] und Doornum et al. [6] wurden Serumproben mit einem

Tabelle 2. Ergebnisse der Bestätigungstests für die anti-HCV-Ak-Bestimmung bei einem Hepatitis-Patienten im Verlauf einer IFN-alpha-Therapie

Datum	RIBA II			RIBA III			Inno-LIA			NS4	NS5	PCR		
	5-1-1	c100-3	c33c	c22-3	c100	c33	22c	NS5	C 1+2				C 3+4	E2/NS1NS3
04.93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
05.93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
07.93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
09.93	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10.93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11.93	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
3.94	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	+	+

Index-Wert > 3 in über 97 % der Fälle mit einem der Zusatztests bestätigt.

Im Verlauf der IFN-Therapie kam es bei einem Hämophilie-Patienten zum Verlust der 5-1-1 und der c33c-Bande während die übrigen Banden zunehmend schwächer im RIBA II reagierten. Dagegen blieb das Bandenspektrum der Tests der 3. Generation (RIBA III und Inno-LIA) unverändert. Die Diskrepanz zwischen Tests der 2. und 3. Generation ist vermutlich auf die bereits erwähnte verbesserte Sensitivität zurückzuführen.

Insgesamt ist die zusätzliche diagnostische Aussagekraft der relativ teuren und arbeitsintensiven Immunoblots sehr limitiert. Zum Teil stimmen die Zusatztests in ihrer Aussage nicht überein, was zu erheblichen Verwirrungen führen kann.

Ein weiteres Problem der serologischen Diagnose der HCV-Infektion ist der Einfluß der genetischen Variabilität von HCV auf den Antikörpernachweis. Die derzeitigen Tests basieren alle auf Antigenen welche vom HCV-Genotyp 1 abgeleitet sind. Seren von Patienten, welche mit den Genotypen 3–6 infiziert sind, zeigen eine geringe Reaktivität mit den Proteinen aus dem NS-3-Bereich [11].

Für die serologische Diagnose der HCV-Infektion sowie für den Screening von Blutspendern sollten die Zusatztests nur eingesetzt werden, wenn ein grenzwertiges Ergebnis im HCV-EIA vorliegt. Wesentlich sinnvoller ist eine Abklärung der Infektiosität über die qualitative PCR bzw. als Verlaufskontrolle unter IFN-Therapie über die HCV-RNA-Quantifizierung.

Literatur

- Alberti A (1991) Diagnosis of hepatitis C: facts and perspective. *J. Hepatol.* (Amsterdam) 12, 279–282
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G (1989) Detection of antibodies to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New Engl J Med* 321, 1494–1500
- Chaudhary RK, MacLean C (1991) Evaluation of first- and second-generation RIBA kits for detection of antibody to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 29, 2329–2330
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* 244, 359–362
- Cuthbert JA (1994) Hepatitis C: Progress and problems. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 505–532
- Doornum CJJ, Hooijkaas C, Cuypers MT, van der Liden MMD, Coutinho RA (1991) Prevalence of hepatitis C virus infection among heterosexuals with multiple partners. *J Med Virol* 35, 22–27
- Esteban JI, Lopez-Talavera JC, Genesca J, Madoz P, Viladomiu L, Muniz E et al. (1991) High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 115, 443–449
- Kleinmann S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeyer G, Nelles M, Lee S, Page E, Wilber J, Palito A (1992) Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 32, 806–813
- Lok ASF, Chien D, Choo QL, Chan TK, Chiu EKW, Cheng IKP, Houghton M, Kuo G (1993) Antibody response to core, envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. *Hepatology* 18, 497–502
- McFarlane IC, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R (1990) Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result. *Lancet* 335, 754–757
- McOmish F, Yap PL, Dow BC et al. (1994) Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 32, 884–892
- Prohaska W, Schroeter E, Kaars-Wiele P, Kleesiek R (1992) Enzyme immunoassays for anti-hepatitis C virus antibodies improved specificity and analytical sensitivity by combination of three different recombinant viral proteins in second generation tests. *Eu J Clin Chem Clin Biochem* 30, 397–404
- Roggenhoff M (1994) Diagnostik der Virushepatitiden A bis E. *Dt. Ärzteztgl* 91, 2036–2046
- Schlipkötter U, Gladziwa U, Cholmakov K, Weise A, Rasshofer R, Lorbeer B, Luz N, Deinhardt F, Roggenhoff M (1992) Prevalence of hepatitis C virus infections in dialysis patients and their contacts using a second generation enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Microbiol Immunol* 181, 173–180
- Theilmann L, Blaze M, Goeser T, Gmelin L, Kommerell B, Fiehn W (1990) False positive anti-hepatitis C virus tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* ii, 1346
- Weber B, Rabenau H, Berger A, Scheuermann EH, Staszewski S, Kreuz W, Scharrer I, Schoeppe W, Doerr HW (1995) Seroprevalence of HCV, HAV, HBV, HDV, HCMV and HIV in high risk groups. *Frankfurt a. M., Germany Zentralbl Bakt* 282, 102–112
- Yousuf M, Nakano Y, Tanaka E, Sodeyama T, Kiyosawa K (1992) persistence of viremia in patients with type-C chronic hepatitis during long-term follow-up. *Scand J Gastroenterol* 27, 812–816