



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ  
Δ/ντής: Σ. Λεβιδιώτου-Στεφάνου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ  
ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C  
ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΤΑΓΓΙΖΟΜΕΝΑ ΑΤΟΜΑ.**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΔΕΣΚΑ  
ΙΑΤΡΟΣ – ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2002



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Γ. Αντωνιάδης**, Ομότιμος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Επιβλέπων

**Θ. Στέφος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Μέλος

**Δ. Στεφάνου**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Μέλος

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- Γ. Αντωνιάδης**, Ομότιμος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Επιβλέπων
- Θ. Στέφος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Μέλος
- Δ. Στεφάνου**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Μέλος
- Δ. Λώλης**, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Μέλος
- Ε. Τσιάνος**, Καθηγητής Παθολογίας, Μέλος
- Σ. Λεβιδιώτου-Στεφάνου**, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Μέλος
- Ν. Δαλκαλίτσης**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Μέλος

*Στην οικογένειά μου*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΙΣΤΟΡΙΑ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΙΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΓΟΜΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ HCV</b> .....	<b>7</b>
<b>ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ</b> .....	<b>14</b>
<b>ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ</b> .....	<b>19</b>
<b>ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΙΝΔΥΝΟ HCV ΛΟΙΜΩΞΗΣ</b> .....	<b>30</b>
<b>ΜΕΤΑΔΟΣΗ</b> .....	<b>32</b>
<b>ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>37</b>
<b>ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ</b> .....	<b>41</b>
1. Ανοσοενζυμικές μέθοδοι .....	41
2. Δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης .....	43
3. PCR-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	44
4. Μέθοδος συνθετικού διακλαδιζόμενου DNA (branched DNA – bDNA) .....	46
5. Ανίχνευση αντιγόνων του HCV .....	47
<b>ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ</b> .....	<b>48</b>
<b>ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b> .....	<b>50</b>

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>55</b>
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>56</b>
<b>ΤΕΧΝΙΚΕΣ</b> .....	<b>58</b>
<b>A. ELISA 2<sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ ΜΕ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΚΑΘΗΛΩΜΕΝΟ ΜΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΠΟΛΥΣΤΕΡΙΝΗΣ</b> .....	<b>58</b>
1. Αρχή της μεθόδου .....	58
2. Υλικό και όργανα .....	59
3. Αντιδραστήρια .....	60
4. Τεχνική εκτέλεσης των προσδιορισμών .....	61
<b>B. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (Abbott supplemental assay)</b> .....	<b>64</b>
1. Αρχή της μεθόδου .....	64
2. Υλικό και όργανα .....	65
3. Αντιδραστήρια .....	65
4. Τεχνική εκτέλεσης των προσδιορισμών .....	66

Γ. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗΣ 2 <sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ (RIBA) .....	67
1. Αρχή της μεθόδου .....	67
2. Υλικό και όργανα .....	68
3. Αντιδραστήρια .....	68
4. Τεχνική εκτέλεσης των προσδιορισμών .....	70
Δ. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗΣ 3 <sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ .....	73
1. Αρχή της μεθόδου .....	73
2. Υλικό και όργανα .....	73
3. Αντιδραστήρια .....	74
4. Τεχνική εκτέλεσης των προσδιορισμών .....	75
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>78</b>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>89</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>101</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>103</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>105</b>

## Πρόλογος

Έχουν περάσει δεκατρία χρόνια από τον Μάιο του 1988, όταν σε συνέντευξη τύπου της εταιρείας Chiron των ΗΠΑ, ανακοινώθηκε ότι ανακαλύφθηκε ο ιός της μη-Α, μη-Β ηπατίτιδας (NANB) και ότι σύντομα θα ήταν διαθέσιμη μέθοδος ορολογικής διάγνωσης (Ezzel C, 1988). Στόχος της συνέντευξης ήταν κυρίως η άνοδος των μετοχών της Εταιρείας στο χρηματιστήριο και λιγότερο η επιστημονική ενημέρωση, παρόλα αυτά όμως τα επιστημονικά δεδομένα ήταν ισχυρά. Ο ιός αυτός ονομάστηκε ιός της ηπατίτιδας C (HCV) και η ανακάλυψή του θεωρήθηκε ως σημαντικότερο επίτευγμα της μοριακής βιολογίας.

Σε σύντομο διάστημα, οι ορολογικές μέθοδοι και οι τεχνικές μοριακής βιολογίας μελετήθηκαν τόσο πολύ, ώστε πλήθος πληροφοριών ήρθαν στο φως της δημοσιότητας, σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης του ιού, τον τροπισμό του, τις κλινικές εκδηλώσεις, την πορεία και τη θεραπεία της νόσου που προκαλεί.

Σήμερα, η ηπατίτιδα C αποτελεί αυξανόμενο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία καθώς υπολογίζεται ότι περίπου 175 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως (μέσος επιπολασμός 1-2%) έχουν προσβληθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C και ότι το 20-30% θα αναπτύξει κίρρωση και 2-5% ανά έτος θα προχωρήσει σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη αναγνώρισης των τρόπων μετάδοσης της λοίμωξης, ο περιορισμός της, καθώς και η εντόπιση των ατόμων που έχουν μολυνθεί και η αποτελεσματική θεραπεία τους.

Η καθιέρωση του υποχρεωτικού ελέγχου των αιμοδοτών για αντισώματα έναντι του ιού της ηπατίτιδας C, ο οποίος εφαρμόζεται και στην Ελλάδα από το 1991, αναμένεται ότι θα συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό της αιματογενούς μετάδοσης του ιού.

Σκοπός αυτής της εργασίας υπήρξε η διαπίστωση αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα πριν από την καθιέρωση του προληπτικού ελέγχου των αιμοδοτών.



Στην εργασία αυτή παρακινήθηκα από τον Καθηγητή κ. Γ. Αντωνιάδη με την προοπτική τα αποτελέσματα να χρησιμοποιηθούν αφ' ενός μεν για τη διαπίστωση του βαθμού και των παραγόντων που συμβάλλουν στην μεταμεταγγισιακή μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας C και αφ' ετέρου να χρησιμεύσουν με τη συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του προληπτικού ελέγχου των αιμοδοτών στον περιορισμό της.

Το τεχνικό μέρος αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Γρηγορίου Αντωνιάδη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές του και την καθοδήγησή του και κυρίως για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου αυτή να ολοκληρωθεί και να εξαχθούν ακριβή και σαφή συμπεράσματα.

Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Θεόδωρο Στέφο, Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας και τον κ. Δημήτρη Στεφάνου, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας, για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ.κ. Δ. Λώλη, Καθηγήτρια Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ε. Τσιάνο, Καθηγητή Παθολογίας, Σ. Λεβιδιώτου-Στεφάνου, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας και Ν. Δαλκαλίτση, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας για το ενδιαφέρον και τις πολύτιμες υποδείξεις τους κατά το τελικό στάδιο αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Ε. Τσιάνο, του οποίου η πολύτιμη εμπειρία πάνω στην Ηπατίτιδα υπήρξε καθοριστική στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την κα Ελευθερία Ζερβού, Διευθύντρια Αιμοδοσίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΠΓΝΙ), την αναπληρώτρια Διευθύντρια ΕΣΥ του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του ΠΠΓΝΙ κα Αγγελική Κωστούλα, και την Επιμελήτρια Β' ΕΣΥ κα Χαρά Μπομπογιάννη, του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του ίδιου Νοσοκομείου, για τις συμβουλές τους οι οποίες ήταν απαραίτητες για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω επίσης τις παρασκευάστριες κ.κ. Τασούλα Δέα και Αγγελική Ιεροδήμου του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου και της Αιμοδοσίας αντίστοιχα, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για τη βοήθειά τους στο τεχνικό μέρος της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον κ. Γ. Παπανικολάου για την εμφάνιση της διδακτορικής μου διατριβής.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΙΣΤΟΡΙΑ

Ο ίκτερος λοιμώδους αιτιολογίας ήταν ήδη γνωστός εδώ και 2.000 χρόνια και αφορούσε κυρίως επιδημίες στο στρατό και σε κλειστούς οικισμούς κατά την διάρκεια πολέμων. Κυρίως οφειλόταν, όπως αργότερα έγινε γνωστό, στην λοίμωξη από τον ιό A, η οποία μεταδιδόταν από μολυσμένα νερά και τροφές.

Η οξεία ηπατίτιδα A αναγνωρίστηκε στις αρχές του 20ου αιώνα ως τροφική λοίμωξη και διαχωρίστηκε οριστικά από την εξ' ομολόγου ορού ηπατίτιδα (ηπατίτιδα B) κατά την διάρκεια του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου. Ο ιός, που ευθύνεται για την ηπατίτιδα A (HAV), περιγράφηκε, αφού διαπιστώθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, από τους Feistone και συν. το 1973. Πολλαπλασιασμός του ιού της ηπατίτιδας A σε κυτταροκαλλιέργειες νεφρών πιθήκων ανακοινώθηκε το 1979 από τους Provost και συν. Οι Lemon και συν. περιέγραψαν ποσοτική ραδιοανοσολογική μέθοδο το 1983. Το γένωμα του ιού κλωνοποιήθηκε από τους Ticehurst και συν. το 1983 και η πρώτη πλήρης σε μήκος νουκλεοτιδική αλληλουχία του ιού, ανακοινώθηκε το 1987 από τους Najarian και συν. και Cohen και συν. Από τις μελέτες προέκυψε ότι η οργάνωση του γονιδιώματος του ιού, ήταν όμοια με εκείνη των ιών Picorna. Ο πρώτος cDNA λοιμογόνος κλώνος του HAV ανακοινώθηκε από τον Cohen και συν. το 1988.

Αιματογενώς μεταδιδόμενη ηπατίτιδα περιγράφηκε στα μέσα του 19ου αιώνα, κατά την χρησιμοποίηση βελονών χωρίς αποστείρωση σε πολλά άτομα κατά την διεξαγωγή εμβολιασμών. Στον 20ο αιώνα έγινε πια φανερό, ότι η ηπατίτιδα οφείλεται σε "παράγοντες" οι οποίοι διέρχονται από τα φίλτρα, τα οποία εχρησιμοποιούντο για την κατακράτηση των βακτηρίων. Οι "παράγοντες" αυτοί είναι πολύ μικρότεροι από τα βακτηρίδια και δεν είναι ορατοί στο κοινό μικροσκόπιο. Επιδημιολογικές και άλλες μελέτες κατά τις δεκαετίες 1940 και 1950 οδήγησαν στον διαχωρισμό της λοιμώδους ηπατίτιδας Α και της εξ'ομολόγου ορού ηπατίτιδας Β (και ίσως C και D).

Ο ιός της ηπατίτιδας Β ανακαλύφθηκε την δεκαετία του 1960. Το αντιγόνο επιφάνειας του ιού Β (HBsAg) ανακαλύφθηκε στον ορό Αυστραλού μετανάστη στα μέσα της δεκαετίας του 1960 και ονομάστηκε αυστραλιανό αντιγόνο. Αργότερα συνδυάστηκε με την οξεία μεταμεταγγισιακή ηπατίτιδα και διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για αντιγόνο αποτελούμενο από μικρά λιπόφιλα κομμάτια του τοιχώματος του ιού χωρίς να περιέχει καθόλου πυρηνοκαψίδιο. Το 1970 ο Dane πέτυχε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο την παρατήρηση του βιρίου του HBV, που ονομάστηκε σωμάτιο Dane (Τσότσος, 1992). Το 1971 οι Almeida και συν. περιέγραψαν το πυρηνοειδές (core), του ιού, το αντιγόνο του πυρηνοειδούς HBcAg και το αντίστοιχο αντίσωμα αντι-HBc (Τσότσος, 1992).

Το 1972 οι Magnus και συν. περιέγραψαν ένα ακόμη αντιγόνο το e καθώς και το αντίστοιχο αντίσωμα (αντι-HBe). Το αντιγόνο e εδράζεται στην περιοχή του πυρήνα (Τσότσος, 1992). Το 1973 αναφέρθηκε η ύπαρξη DNA πολυμεράσης μέσα στο βίριο και ακολούθως επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση και ανάλυση της ακολουθίας των νουκλεοτιδίων του γενώματος του HBV. Διαπιστώθηκε η γενετική οργάνωση του ιού και ο παρόμοιος προς τους ρετροϊούς τρόπος αναπαραγωγής του (Τσότσος, 1992).

Το 1977 ο γαστρεντερολόγος Mario Rizzetto από το Τορίνο της Ιταλίας ανακοίνωσε την ανακάλυψη ενός νέου αντιγόνου σε μερικούς ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β. Το αντιγόνο αυτό ονομάστηκε δ, ανευρέθηκε στην περιοχή του πυρήνα των ηπατοκυττάρων και παρουσίαζε ομοιότητες με το αντιγόνο core της

ηπατίτιδας Β (HBcAg). Πάντα η ύπαρξή του συνδιαζόταν με τον ιο Β (HBV) και οι ασθενείς με αντιγόνο δ, ανέπτυσαν αντισώματα αντι-δ. Το 1980 ο Mario Rizzetto σε συνεργασία με τους John Gerin και Robert Purcell, μόλυναν με το νέο αντιγόνο χιμπατζήδες και προκάλεσαν νόσο σ' αυτούς. Η μόλυνση αφορούσε μόνο εκείνους τους χιμπατζήδες, που είχαν προμολυνθεί με τον HBV. Έτσι αναγνωρίστηκε πια ότι το αντιγόνο δ, αποτελεί έναν καινούριο ιό, τον ιό δ, (HDV). Ο ιός αυτός, αποδείχτηκε ότι χρησιμοποιεί το HBsAg σαν περίβλημα. Αργότερα αναπτύχθηκε ραδιοανοσολογική μέθοδος για την ανίχνευση αντι-D αντισωμάτων, μέσω της οποίας διαπιστώθηκε, ότι ηπατίτιδα από τον ιο δ (HDV) ήταν ευρύτατα διαδεδομένη κυρίως όμως στις μεσογειακές χώρες. Το 1986 κλωνοποιήθηκε το γένωμα του ιού. Ο HDV αποτελείται από κυκλικό DNA.

Η ηπατίτιδα Ε πρωτοεμφανίστηκε στο Νέο Δελχί της Ινδίας το 1955, όπου περιγράφηκαν 29.000 περιπτώσεις ικτερικής ηπατίτιδας, οφειλόμενης σε μόλυνση του πόσιμου νερού της πόλης από κόπρανα. Παρόμοια επιδημική μορφή ιογενούς ηπατίτιδας, παρουσιάστηκε μεταξύ Δεκεμβρίου 1975 και Ιανουαρίου 1976 στο Ahmedabad της Ινδίας, οφειλόμενη επίσης σε υδατική επιμόλυνση (Steevanisan και συν. 1978). Και τα δύο περιστατικά αρχικά αποδόθηκαν στον HAV. Παρόλα αυτά στους ορούς πασχόντων και από τις δυο περιοχές δεν διαπιστώθηκαν ούτε HAV ούτε HBV. Επρόκειτο επομένως για έναν ιο μεταδιδόμενο δια της γαστρεντερικής οδού, ο οποίος δεν συσχετιζετο ορολογικά με τον HAV. Μεγάλες επιδημίες από HEV παρατηρήθηκαν επίσης στο Kirgiz της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ (Khuroo 1980). Μεταξύ 1955 και 1956 περισσότερες από 10.800 περιπτώσεις οξείας ιογενούς ηπατίτιδας αναφέρθηκαν σε νέους και μεσήλικες και περίπου 18% των προσβεβλημένων εγκύων γυναικών απεβίωσαν κατόπιν μόλυνσης με τον HEV. Τα επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα για τα κρούσματα του Kirgiz, ήταν παρόμοια με εκείνα του 1955-1956 της επιδημίας της Ινδίας. Ο HEV είναι σχετικά ασταθής, γι' αυτό μόνο σε λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων κατέστη δυνατή η διαπίστωσή του με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η μερική φυσικοχημική δομή του ιού ανακαλύφθηκε αρχικά από τους Rangoon και Burna (1982) και μετέπειτα από τους Telixita και Mexico (1986).

Στην δεκαετία του 1970 αναγνωρίστηκε μια μορφή μεταμεταγγισιακής ηπατίτιδας, αλλά οι ασθενείς ήταν οροαρνητικοί για τους δείκτες της (ηπατίτιδας Β). Επίσης παρατηρήθηκε ότι η μορφή της μεταμεταγγισιακής μη Α - μη Β ηπατίτιδας (NANB), οδηγούσε αρκετούς ασθενείς σε χρονιότητα. Ο χρόνος επώασης ήταν 7-8 εβδομάδες δηλ. ενδιάμεσος αυτού της Α (3-4 εβδ.) και της Β (12-14 εβδ.). Στο τέλος της δεκαετίας του 1970 μολονότι ο ιός της NANB μεταμεταγγισιακής ηπατίτιδας δεν είχε ακόμη ανακαλυφθεί, εντούτοις επιτεύχθηκε η μετάδοσή του σε χιμπατζήδες (Alter 1989). Η πειραματική μετάδοση έγινε με ενοφθαλμισμό αίματος ασθενών με ηπατίτιδα NANB χαμηλής μολυσματικότητας, που δεν ξεπερνούσε τις  $10^2$ - $10^3$  λοιμώδεις δόσεις χιμπατζή ανά κ.εκ. (CID/ml).

Το 1982 άρχισαν οι πρώτες προσπάθειες της Chiron για κλωνοποίηση του γονιδιώματος του παράγοντα NANB. Ως πηγή ιού NANB χρησιμοποιήθηκε ήπαρ και οροί μολυσμένων χιμπατζήδων, ατιτλοποίητοι όμως από πλευράς μολυσματικότητας (Braddley 1986, Braddley 1991). Οι αρχικές προσπάθειες απέβησαν άκαρπες και η αποτυχία αποδόθηκε στην χρησιμοποίηση ως πηγής ιού, βιολογικού υλικού με χαμηλή περιεκτικότητα σε πυρηνικά οξέα. Έτσι, αποφασίστηκε η δημιουργία μιας δεξαμενής πλάσματος από επιλεγμένους χιμπατζήδες με χρόνια NANB ηπατίτιδα και σχετικά υψηλούς τίτλους NANB μολυσματικότητας, καθορισμένης με πειράματα τιτλοποίησης σε άλλα πειραματόζωα (Χατζηγιάννης 1992). Τελικά δημιουργήθηκε δεξαμενή τριών περίπου λίτρων μολυσμένου πλάσματος πιθήκων με τίτλο NANB μολυσματικότητας περίπου  $10^6$  CID/mL, από το οποίο απομονώθηκε το γονιδίωμα του HCV. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι το 1986 στην προσπάθεια κλωνοποίησης του ιού NANB είχαν εξεταστεί με αρνητικά αποτελέσματα 2.500.000 cDNA κλώνοι πυρηνικών οξέων, που εκχυλίστηκαν από το ήπαρ και μη τιτλοποιημένους ορούς διαφόρων χιμπατζήδων (Choo 1990), και ότι ένα από τους λόγους, που δεν εγκαταλήφθηκε αυτή η προσπάθεια είναι ότι η ίδια μεθοδολογία είχε ακολουθηθεί με επιτυχία στην τυφλή αναζήτηση του RNA του HDV στον ορό μολυσμένων χιμπατζήδων (Χατζηγιάννης, 1992).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι ο παράγων NANB πρέπει να είναι ένας RNA ιός που μοιάζει με φλαβοϊό. Αρχικώς, υιοθετήθηκε η τεχνική του "συν-πλην" γονιδιακού ελέγχου των βιβλιοθηκών των κλωνοποιημένων νουκλεϊκών οξέων με χρησιμοποίηση ανιχνευτικού cDNA από μολυσμένο και μη μολυσμένο ήπαρ και πλάσμα (Choo 1989, Braddley 1991). Από το 1986 ακολουθήθηκε η τεχνική της ανοσοανίχνευσης κλώνων, που εκφράζουν οροειδικά αντιγόνα (Young 1993). Τέλος οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν στην απόδειξη ότι ο ιός που προκαλεί ηπατίτιδα με σωληνωτούς μηχανισμούς στους χιμπατζήδες σχετίζεται με την μεταγγισιακή NANB ηπατίτιδα (Χατζηγιάννης, 1992).

Το Μάιο του 1988 σε συνέντευξη τύπου της Εταιρείας Chiron ανακοινώθηκε ότι ανακαλύφθηκε ο ιός της NA-NB μεταμεταγγισιακής ηπατίτιδας και ότι σύντομα θα ήταν διαθέσιμη μέθοδος ορολογικής διάγνωσης (Cezzel, 1988). Ο νέος ιός ονομάστηκε C (HCV). Ο ιός αυτός δεν διαπιστώθηκε μέχρι σήμερα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και έχει ανιχνευτεί και χαρακτηριστεί αποκλειστικά με μεθόδους μοριακής βιολογίας (Χατζηγιάννης, 1989). Κύριοι συντελεστές της ανακάλυψης ήταν από την Chiron ο Houghton που ηγείτο της ομάδας των μοριακών βιολόγων και από πλευράς C.D.C (Center for Disease Control) των ΗΠΑ ο D. Braddley (Choo 1989).

## **ΙΟΛΟΓΙΑ**

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) είναι ένας RNA ιός, ο οποίος υπάγεται στην οικογένεια Flaviviridae. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 2 γένη (flaviviruses και pestiviruses). Στο γένος flaviviruses έχουν ταξινομηθεί οι ιοί του κίτρινου πυρετού και της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, ενώ στο γένος pestiviruses διάφοροι ιοί που προσβάλλουν ζώα, όπως ο ιός της χολέρας των χοίρων και ο ιός της ιογενούς διάρροιας των βοοειδών (Collet MS et al, 1988). Λίγες αλληλουχίες

νουκλεοειδίων του HCV είναι ομόλογες με αλληλουχίες άλλων γνωστών μελών της ίδιας οικογένειας εκτός από την 5' μη κωδικογραφούσα περιοχή (5' UTR) η οποία εμφανίζει σε αναλογίες 45-50% ομόλογες αλληλουχίες με τις αντίστοιχες περιοχές των ιών που ανήκουν στο γένος pestiviruses (Choo QL et al, 1991· Han JH, et al, 1991· Rice CM et al, 1986). Αυτό δείχνει ότι αυτή η περιοχή μπορεί να είναι σημαντική για τον αναδιπλασιασμό του ιού και ότι ο HCV συγγενεύει στενότερα με τους ιούς του γένους pestivirus από ότι με αυτούς του γένους flaviviruses (Choo QL, et al, 1991· Han JH, et al, 1991). Αντίθετα το υδρόφοβο προφίλ του HCV ομοιάζει περισσότερο με αυτό των φλαβοϊών από ότι αυτό των πεσπιών (Choo QL., et al, 1991). Τελικά ο HCV ταξινομήθηκε σαν ξεχωριστό γένος στην οικογένεια Flaviviridae (Framcki RB, et al, 1991).

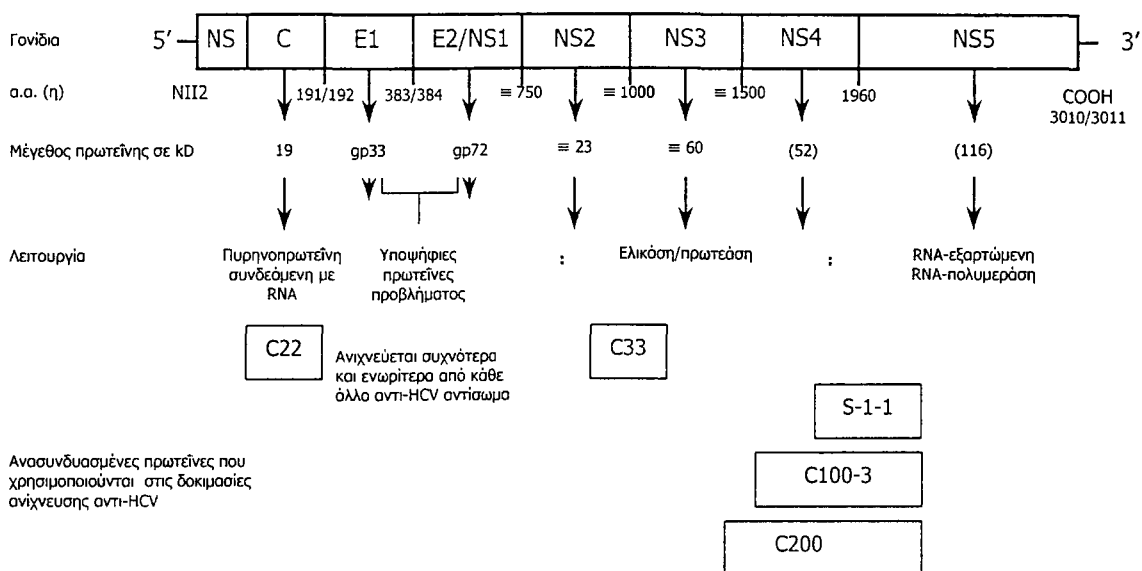
Αν και από τις αρχές του 1970 είχε διατυπωθεί η άποψη ότι ένας τουλάχιστον ή και περισσότεροι ίσως ιοί, ευθύνονται για τις περιπτώσεις της μετά μεταγγίσης κυρίως NANB ηπατίτιδας (Ratzan KP και συν. 1971· Golsjield M και συν. 1972· Grady GF, Bennet AJE, 1972· Mosley JW, 1972· Mosley JW και συν. 1977· Aach RD, Kahn RA, 1980· Alter HJ και συν. 1975· Feistone και συν. 1975· Hollinger FB, Mosley JW και συν. 1981· Hollinger FB και συν. 1980· Tsiquaye και συν. 1979· Yoshizawa H 1981· Braddley W και συν. 1980· Hoognagle JH και συν. 1977· Shimiyu YK 1979), η οριστική ταυτοποίηση του HCV επιτεύχθηκε το 1989 (Choo QL, Kuo G και συν. 1989· Kuo G, Choo QL και συν. 1989· Choo QL, Weiner AJ και συν. 1990· Arima T, Takamizawa A, Mori C, και συν. 1989· Arima T, Nagashima A, Murakawi S και συν. 1989), αφού προηγήθηκε μια δεκαετία εκτεταμένων ερευνητικών προσπαθειών κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν χιμπατζήδες για την πειραματική μετάδοση της νόσου και τεχνικές μοριακής βιολογίας (Bradley BW και συν. 1979· Bradley BW και συν. 1980· Hallelwell RA και συν. 1985· Hollinger FB, Gitnich GL, Aach RD και συν. 1978· Tabor E και συν. 1978· Wyke RJ και συν. 1979).

Το βίριο του HCV είναι σφαιροειδές με διάμετρο 30-60 nm και εμφανίζει εικοσαεδρική συμμετρία (Kaito M και συν. 1994). Φέρει λιποειδικό περίβλημα, το

οποίο χαρακτηρίζεται από δύο επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες E<sub>1</sub> και E<sub>2</sub>, οι οποίες παρουσιάζουν ετερογένεια μεταξύ των στελεχών του ιού που έχουν απομονωθεί σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και υπόκεινται σε συχνές μεταλλάξεις (Weiner AJ και συν. 1991· Hijikata M και συν. 1991· Kato N και συν. 1992).

Ο HCV είναι ευαίσθητος στο χλωροφόρμιο, την φορμαλίνη και τις υψηλές θερμοκρασίες. Αδρανοποιείται στους 100 °C σε 5' λεπτά και στους 60 °C σε 10 ώρες (Gary L και συν. 1992).

## ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΚΑΙ ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ HCV



α.α.(η)= αριθμός αμινοξέων

NC= μη κωδικογραφούσα περιοχή, λίαν συντηρημένη, ιδανική για οδηγούς PCR, C= core (πυρηνοκαψίδιο), E= envelope (περίβλημα)

NS= non-structural (μη δομικές)

**Σχήμα.** Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας C, η οργάνωσή του, οι πρωτεΐνες που παράγονται, η λειτουργία τους και τα ανασυνδυσμασμένα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες ανίχνευσης του HCV (Από Χατζηγιάννη Σ., 1991)



Το γένωμα του HCV αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, το οποίο περιλαμβάνει 9.400 περίπου νουκλεοτίδια (Houghton M και συν. 1991· Choo Q-L και συν. 1991· Kato N και συν. 1990· Takamizawa A και συν. 1991). Ένα και μοναδικό μεταφραστικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF=open reading frame) εκτείνεται κατά μήκος ολόκληρου σχεδόν του γενώματος και κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη με 3010 ή 3011 αμινοξέα, η οποία αποτελεί πρόδρομη μορφή των πρωτεϊνών του ιού (Kato N και συν. 1990· Takamizawa A και συν. 1991). Μία 5' τερματική περιοχή με 324-341 νουκλεοτίδια προηγείται του πλαισίου. Ίσως αυτή η περιοχή έχει την ικανότητα να κωδικοποιεί πεπτίδια με μέχρι 28 αμινοξέα (Okamoto H και συν. 1991· Han JH και συν. 1991). Κατά πάσαν όμως πιθανότητα έχει μεγαλύτερη ρυθμιστική σημασία για τον αναδιπλασιασμό του ιού από ότι για την μετάφραση. Μια μικρή 3' τερματική περιοχή με 27-55 νουκλεοτίδια έπεται του πλαισίου. Και οι δύο τερματικές περιοχές χαρακτηρίζονται ως μη κωδικοποιούσες περιοχές (UTR = untranslated region).

Οι δομικές πρωτεΐνες του ιού κωδικοποιούνται από το 5' άκρο του γενώματος και οι μη δομικές από το 3' άκρο του γενώματος (Houghton M και συν. 1991).

Εκτεταμένες πειραματικές μελέτες κατέληξαν σε μία προκαταρκτική χαρτογράφηση των γονιδιακών περιοχών που περιλαμβάνει το γένωμα από την 5' τερματική περιοχή μέχρι την 3': C, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> ή E<sub>2</sub>/NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub>, NS<sub>3</sub>, NS<sub>4</sub>A, NS<sub>4</sub>B, NS<sub>5</sub>A, NS<sub>5</sub>B(V) (Bartenschlager R και συν. 1995). Οι ώριμες ιικές πρωτεΐνες προέρχονται από πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης, η οποία κωδικοποιείται από τις προαναφερθείσες γονιδιακές περιοχές του γενώματος. Η διάσπαση της πολυπρωτεΐνης επιτυγχάνεται σε 9' πρωτεολυτικές περιοχές τομής με την βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών (Πέτρος Καραγιάννης σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1995).

Η επεξεργασία του δομικού άκρου της πολυπρωτεΐνης από πεπτιδάσες του ξενιστή (signal peptidases) παρέχει την C πρωτεΐνη (p 21) του πυρηνοκαψιδίου

και τις δυο γλυκοπρωτεΐνες E<sub>1</sub> (p 31) και E<sub>2</sub> (p 70) του περιβλήματος και μια επιπλέον πρωτεΐνη p 7 η οποία πιθανόν παίζει ρόλο διαμεμβρανικού φορέα (K 6) (Lin C και συν. 1994). Η μη δομική πρωτεΐνη NS<sub>2</sub> (p 23) σε συνεργασία με την NS<sub>3</sub> δρα σαν μεταλλοπρωτεΐνάση στην περιοχή τομής και από την NS<sub>3</sub> και προκαλεί τον διαχωρισμό της από τις υπόλοιπες μη δομικές πρωτεΐνες της πολυπρωτεΐνης (ΓΠ Καραγιάννης σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, 1995· Bartenschlager R και συν. 1995· Grakoui A και συν. 1993· Hijikata M και συν. 1991· Hirowatari Y και συν. 1993). Το αμινικό άκρο της NS<sub>3</sub> (p 70) δρα σαν πρωτεάση σερίνης (serine proteinase) και αποτελεί βασικό παράγοντα της πρωτεολυτικής επεξεργασίας του μη δομικού άκρου της πολυπρωτεΐνης και την παροχή των περισσότερων μη δομικών πρωτεϊνών του ιού (Π. Καραγιάννης σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, 1995· Bartenschlager R και συν. 1995· Bartenschlager R και συν. 1993· Eckart M και συν. 1993· Grakoui A και συν. 1993· Hijikata M και συν. 1993· Tomei L και συν. 1993). Το καρβοξυλικό άκρο της NS<sub>3</sub> δρα στην RNA ελικάση η οποία πιθανώς συμβάλλει στην έκπτυξη του RNA - γενώματος κατά τον αναδιπλασιασμό του ιού. Η NS<sub>4A</sub> (p 8) φαίνεται ότι αποτελεί βοηθητικό συντελεστή (cofactor) της πρωτεάσης σερίνης αυξάνοντας την δραστηριότητά της κυρίως στην περιοχή τομής NS<sub>4B</sub>/NS<sub>5A</sub>. (Bartenschlager R και συν. 1995· Bartenschlager R και συν. 1994· Faila C και συν. 1994). Οι λειτουργίες της NS<sub>4B</sub> (p 27) και της NS<sub>5A</sub> (p 58) δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστές. Τέλος η NS<sub>5B</sub> (p 68) αποτελεί κατά πάσα πιθανότητα την ιική RNA πολυμεράση (Καραγιάννης Π, σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, 1995· Bartenschlager R και συν. 1995).

Ο HCV παρουσιάζει μεγάλη γενετική ετερογένεια. Το αρχικό στέλεχος, που περιέγραψε ο Choo QL, το 1989, παρουσιάζει σε συσχέτιση με τα Ιαπωνικά στελέχη ομοιότητα 71-78% σε αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και 85% σε αλληλουχίες αμινοξέων (Choo QI, Kuo G, Weiner AJ, et al, 1989· Okamoto H, Okada S, et al, 1991). Σε επίπεδο πρωτεϊνών, μεγαλύτερη ομοιομορφία παρατηρείται στις πρωτεΐνες εκείνες, οι οποίες κωδικογραφούνται από τις C, NS3,

NS4, NS5 γονιδιακές περιοχές, ενώ ποικιλομορφία υπάρχει στις πρωτεΐνες που κωδικογραφούνται από τα γονίδια E1, E2/NS1 και NS2 (Α. Χατζηγιάννη, 1994).

Τα στελέχη του HCV έχουν χωριστεί ανάλογα με την γονοτυπική τους σύσταση σε δύο ομάδες και η κάθε ομάδα σε δύο υποτύπους (κατάταξη Okamoto):

Ομάδα:	(group) I	(group) II
υπότυποι	I - II	III - IV

Οι Okamoto και συν. (19 ) ανακοίνωσαν ότι η συχνότητα των υποτύπων I - II - III - IV στην Ιαπωνία είναι αντίστοιχα 4, 82, 10, 4 %.

Οι III και IV ως τώρα ανιχνεύτηκαν μόνο στην Ιαπωνία και συσχετίζονται με ηπιότερη νόσο (Michiro S, Hoshi Y, Takeda K, Yoshikawa A, et al 1990). Στην Ν. Αμερική και στην Ευρώπη τα περισσότερα στελέχη του ιού ανήκουν στον τύπο I, ενώ στην Ιαπωνία στον τύπο II. Στην Ελλάδα ο γονότυπος I συναντάται συχνότερα στους ενδοφλέβιους χρήστες ναρκωτικών ουσιών, ο II σε ασθενείς με χρόνια περιοδική αιμοκάθαρση (Α. Χατζάκης, σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1994). Ακολούθησαν και άλλα συστήματα ονοματολογίας. Οι σημαντικότεροι ερευνητές πρότειναν το εξής κοινό σύστημα ονοματολογίας προκειμένου να επιλυθούν τα προβλήματα που προέκυψαν από τις πολλαπλές ονοματολογίες των γονότυπων του ιού.

Οι «τύποι» αντιστοιχούν στους αριθμούς 1, 2, . . . . . (αρίθμηση σύμφωνα με την σειρά ανακάλυψης), οι «υπότυποι» αντιστοιχούν στα a, b, c (αρίθμηση σύμφωνα με την σειρά ανακάλυψης). Στον πίνακα αυτόν περιλαμβάνονται οι μέχρι σήμερα γνωστοί γονότυποι με την ονομασία, που προτάθηκε από τους σημαντικότερους ερευνητές και την αντιστοιχία της με τις προϋπάρχουσες ονομασίες.

Το ποσοστό ομοιότητας αλληλουχιών μεταξύ διαφόρων γονοτύπων HCV στην περιοχή NS<sub>5</sub><sup>a</sup> έχει ως εξής:

Προτεινόμενη ονομασία	Εναλλακτικές ονομασίες <sup>b</sup>																
	Ch	Si	Ok	En	N <sup>c</sup>												
1a	I	1a	I	PT	12	95											
1b	II	1b	II	K1	19	80	94										
1c	- <sup>d</sup>	-	-	-	2	83	77	95									
2a	III	2a	III	K2a	6	62	63	66	92								
2b	III	2b	IV	K2b	10	64	66	67	79	93							
2c	III	-	-	-	4	63	63	64	81	79	92						
3a	IV	3	V	-	13	67	66	65	62	64	62	95					
3b	IV	-	-	-	2	67	71	69	63	66	62	78	99				
4a	-	4	-	-	3	66	62	65	61	63	62	64	68	88			
5a	V	-	-	-	4	69	70	69	65	66	63	65	69	65	96		
6a	-	-	-	-	1	66	65	62	65	65	64	64	62	66	67	NA <sup>e</sup>	
					1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	4a	5a	6a		

<sup>a</sup> Οι συγκρίσεις αφορούν τη νουκλεοτιδική περιοχή 7975-8196 (Chan et al).

<sup>b</sup> Ονοματολογία σύμφωνα με τα υπέρχοντα σχήματα, **Ch**: Houghton et al 1991, και Cha et al 1992, **Si**: Chan et al 1992, και Simmonds et al 1993, **Ok**: Okamoto et al 1992, **En**: Enomoto et al 1990.

<sup>c</sup> Αριθμός αλληλουχιών που συγκρίθηκαν σε κάθε ομάδα.

<sup>d</sup> Δεν ταξινομήθηκε.

<sup>e</sup> NA: Δεν εφαρμόζεται.

Κριτήριο για την διαφοροποίηση των γονότυπων είναι η NS<sub>5</sub> γονιδιακή περιοχή. Αν ένα στέλεχος του HCV παρουσιάζει ομοιότητα <72% με τα γνωστά στελέχη, σημαίνει νέο τύπο, ομοιότητα 75-87% σημαίνει νέο υπότυπο και ομοιότητα >88% σημαίνει ταυτότητα του στελέχους με τα ήδη γνωστά (Simmonds P, Alberti A, Alter HJ et al, 1994). Η ομοιότητα μεταξύ διαφόρων HCV γονοτύπων είναι μεγάλη στην γονιδιακή περιοχή C (81-91%) καθώς και στην NS<sub>3</sub> γονιδιακή περιοχή (70-80%), αλλά μικρή στην E<sub>1</sub> (55-75%) και στην NS<sub>2</sub> (55-

71%). Οι NS<sub>4</sub> και NS<sub>5</sub> έχουν ομοιότητα 65-79% και 66-79% αντίστοιχα. Η E<sub>2</sub>/NS<sub>1</sub> γονιδιακή περιοχή υφίσταται συχνές μεταλλάξεις.

Η ομοιότητα της περιοχής αυτής μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων είναι 65-72%, ενώ στελέχη του ίδιου γονότυπου παρουσιάζουν ομοιομορφία (87-93%). Οι μεταλλάξεις υφίστανται όχι μόνο σε στελέχη διαφορετικών ασθενών, αλλά και στον ίδιο τον ασθενή με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα ο HCV να κυκλοφορεί ως ετερογενές μίγμα γονιδιωμάτων, συγγενών μεταξύ τους, που συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή. Πρόκειται για τα quasi species (σχεδόν είδη) τα οποία αποτελούνται από μια κυριαρχούσα και συχνότερα εκφραζόμενη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και μια ποικιλία μεταλλαγμένων αλληλουχιών. (Ντουράκης Σ, 1994· Κοσκίνας Ι, 1995). Είναι προφανές ότι για τους λόγους αυτούς αφενός μεν είναι δύσκολη η ανάπτυξη εμβολίου, αφετέρου δε στη θεραπεία με ιντερφερόνη υπάρχει διαφορετική ανταπόκριση στα διάφορα στελέχη του ιού, γεγονός που προσανατολίζει στην κατεύθυνση του συνδυασμού αντιικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση της χρόνιας λοίμωξης (Kanazawa Y, Hayashi N, Mita E, et al. Hepatology 1994). Η 5' τερματική περιοχή (5' UTR) παρουσιάζει ομολογία 92-100% μεταξύ των γονοτύπων ενώ η 3' UTR διαφέρει σημαντικά μεταξύ των γονοτύπων. (Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, 1991· Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al, 1993).

Οι γονότυποι του ιού επηρεάζουν την κλινική εικόνα και τη φυσική πορεία της HCV λοίμωξης. Ο II κατά Okamoto (1b) ενοχοποιείται για την ταχύτερη εξέλιξη (κλινική και ιστολογική) και την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC). Επίσης συσχετίζεται με την συχνότερη εμφάνιση HCV λοίμωξης οφειλόμενης στο μόσχευμα μεταμοσχευμένων ασθενών. Οι γονότυποι III και IV (Okamoto) (2a, 2b) συσχετίζονται με την καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με ιντερφερόνη (Α. Χατζάκης, σε Χατζηγιάννη Σ., «Ηπατίτιδα C», 1994, Νταλέκος Γ, και συν, 1997).

Αρνητική είναι η συσχέτιση μεταξύ γονοτύπων και βιοχημικής δραστηριότητας (Sertaly L, Chagouilleres Q, Pawlotsky JM, et al, Hepatology

1994). Αντίθετα μεταξύ γονότυπου II (1b) και λεμφοκυτταρικής διήθησης των πυλαίων διαστημάτων η συσχέτιση είναι θετική (Tran Van Nhieeu J, Roudot-Thoraval G, Pawlotsky JM, et al, Hepatology; 1994). Επίσης ο γονότυπος II (1b) συσχετίζεται με την παρουσία κρουσφαιρινών, ενώ ο γονότυπος I (1a) δεν ανευρέθηκε σε ασυμπτωματικούς ασθενείς (Lunef F, Loiseau P, Cresta P, et al, Hepatology 1994).

Η γονιδιακή περιοχή του πυρήνα κωδικοποιεί πρωτεΐνες, τα αμινοξέα των οποίων διαφέρουν κατά 10% στους γονότυπους II και IV.

Η γονιδιακή περιοχή E<sub>2</sub>/NS<sub>1</sub>, κωδικοποιεί πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί αντιγονικό επίτοπο, πιθανό στόχο εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Λόγω των μεταλλάξεων που συμβαίνουν, αλλάζει η αντιγονική σύσταση της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης, πράγμα το οποίο βοηθά τον ιό να διαφύγει από την ανοσολογική πίεση του ξενιστή (escape quasi species, σχεδόν είδη διαφυγής) (Tanigushi et al, 1993).

Οι πρωτεΐνες του περιβλήματος που κωδικοποιούνται από τα γονίδια E1 και E2/NS1, παρουσιάζουν μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων ομοιότητα σε 290 από τα 442 αμινοξέα (66%).

Η αντιγονικότητα της πρωτεΐνης, που κωδικοποιείται από την NS<sub>4</sub> γονιδιακή περιοχή μελετήθηκε από τους Simmonds και συν. (1993) με χαρτογράφηση των επιτόπων χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία Elisa με διακλαδιζόμενα ολιγοπεπτίδια. Βρέθηκαν δύο κύριοι αντιγονικοί επίτοποι, οι οποίοι εκφράζονται από τις εξής αλληλουχίες αμινοξέων 1691-1708 ο πρώτος και 1710-1728 ο δεύτερος. Οι επίτοποι αυτοί παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία αμινοξέων, οι οποίες σημαίνουν και διαφορετική αντιγονικότητα των περιοχών αυτών μεταξύ των γονοτύπων του ιού.

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη 5-1-1, που χρησιμοποιείται στις δοκιμασίες Elisa 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς, αναλογεί στην πρωτεϊνική περιοχή, που απαρτίζεται από την 1694-1736 αλληλουχία αμινοξέων, δηλαδή περιλαμβάνει μέρος του πρώτου και ολόκληρο τον δεύτερο αντιγονικό επίτοπο.

Μέθοδοι μοριακής βιολογίας, και κυρίως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφόρων γονοτύπων του HCV καθώς και των ύποτύπων τους (Mcomich F και συν, 1994). Οι τεχνικές αυτές δεν εφαρμόζονται σαν εξετάσεις ρουτίνας, διότι απαιτούν οργανωμένα εργαστήρια και το κόστος τους είναι μεγάλο. Γι' αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν ανοσοενζυμικές τεχνικές, που βασίζονται στο διαχωρισμό των οροτύπων του ιού βάσει αντισωμάτων έναντι πεπτιδίων, που κωδικογραφούνται από την NS<sub>4</sub> γονιδιακή περιοχή (Bhattacharjee V και συν. 1995, Tsukiyama-Kohara K και συν. 1995).

Υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ HCV γονοτύπων και οροτύπων. Ο προσδιορισμός οροτύπων εξαρτάται από μία φυσιολογική ανοσολογική απάντηση σε ιογενή λοίμωξη. Έτσι, σε άτομα με ανοσοκαταστολή ή ορομετατροπή που ακολουθεί τη μόλυνση μπορεί να μην είναι δυνατή η ορολογική ταυτοποίηση.

Ο προσδιορισμός των γονοτύπων απαιτεί ιαιμία, ενώ ο προσδιορισμός οροτύπων δεν απαιτεί ιαιμία. Η παρουσία μικτών οροτύπων σε άτομα που έχουν λάβει πολλαπλές μεταγγίσεις ενισχύει την άποψη ότι είναι δυνατόν να υπάρχουν επαναμολύνσεις από διαφορετικά στελέχη του ιού στο ίδιο άτομο (Ζερβού Ε και συν. 1997).

## **ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ**

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ηπατοτρόποι ιοί προκαλούν ηπατική βλάβη είναι τρεις. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά το άμεσο κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα, όπου ο ίδιος ο ιός ή τα προϊόντα έκφρασης και πολλαπλασιασμού του είναι άμεσα υπεύθυνα για την νέκρωση των μολυσμένων κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων του ιϊκού πολλαπλασιασμού και του μεγέθους της ηπατικής βλάβης. Τα ιστολογικά

ευρήματα συνήθως είναι νεκρωτικές και εκφυλιστικές αλλοιώσεις στα παρεγχυματικά κύτταρα, χωρίς ιδιαίτερη φλεγμονώδη διήθηση. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι εκείνος κατά τον οποίο κύριο ρόλο παίζει το ανοσολογικό σύστημα, το οποίο είτε επιτίθεται εναντίον του ίδιου του ιού, είτε καταστρέφει τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα μέσω αυτοάνοσης αντίδρασης, που ενεργοποιείται από την παρουσία του ιού. Ο τρίτος μηχανισμός αποτελεί τον συνδυασμό των δύο παραπάνω (Alfredo 1993).

Ειδικότερα ο HCV προσβάλλει το ήπαρ, όπου ανιχνεύεται με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές (Hiramatsu και συν. 1992, Krawczunski 1992) και *in situ* υβριδισμό στα ηπατοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων και τα φλεγμονώδη κύτταρα του ήπατος (Negro και συν. 1992). Σπάνια είναι δυνατόν να προσβληθούν ο μυελός των οστών (απλαστική αναιμία), οι αρθρώσεις (άλγη) και το δέρμα (Perrilo και συν. 1981· Cargnel και συν. 1983). Με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ο ιός ανιχνεύεται στο περιφερικό αίμα και συγκεκριμένα στον ορό και στα T και B-λεμφοκύτταρα και στο αίμα της εμμήνου ρύσης των γυναικών (Ulrich και συν. 1991· Muller και συν. 1993). Ο ιός έχει επίσης ανευρεθεί στους σιελογόνους αδένες και στον σπλήνα ασθενών με χρόνια HCV λοίμωξη (Takamatsu και συν. 1992).

Ενώ οι αλλοιώσεις που προκαλεί ο ιός της ηπατίτιδας B είναι κυρίως ανοσολογικής αιτιολογίας, ο ιός της ηπατίτιδας C ασκεί κυτταροπαθογόνο δράση. Στην οξεία φάση της νόσου η καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος είναι παραλοβιώδης, διάχυτη και ανομοιογενής με ηωσινόφιλη κοκκίωση από οξύφιλα σωμάτια και στεάτωση (Dienes και συν. 1982· Omata και συν. 1981).

Τα κατεστραμμένα ηπατοκύτταρα σχηματίζουν τα σωμάτια του Councilman (Χόρτη 1991). Επίσης υπάρχει υπερπλασία των κυττάρων Kupffer, αραιή λεμφοκυτταρική διήθηση στα λόβια και στις περιπυλαιές περιοχές και απόπτωση του επιθηλίου των χοληφόρων αγγείων μέσα στους πόρους χωρίς καταστροφή της βασικής μεμβράνης.



Μετά από δύο εβδομάδες επέρχεται η λύση της νόσου με έντονα στοιχεία αναγέννησης. Η παραμονή φλεγμονής στα πυλαία διαστήματα αποτελεί δυσμενές προγνωστικό στοιχείο για την εξέλιξη σε χρόνια. Επίσης δυσμενές προγνωστικό στοιχείο αποτελεί η ύπαρξη «γεφυρών» από νεκρωμένα ηπατοκύτταρα και φλεγμονώδη στοιχεία μεταξύ των πυλαίων διαστημάτων, μεταξύ πυλαίας και κεντρικής φλέβας ή μεταξύ κεντρικών φλεβών (Boyer 1989).

Η χρόνια φάση διακρίνεται με βάση τα ιστολογικά ευρήματα στην "χρόνια εμμένουσα" στην οποία υπάρχει λεμφοκυτταρική διήθηση των πυλαίων διαστημάτων χωρίς επέκταση στα λοβία και στην "χρόνια ενεργό" στην οποία υπάρχει φλεγμονώδης διήθηση και των ηπατοκυττάρων που γειτονεύουν με τα πυλαία διαστήματα και ίνωση (Rubin 1989).

Η βαρύτητα της ιστολογικής βλάβης σχετίζεται α) με την πηγή της λοίμωξης. Συγκεκριμένα σε ασθενείς, που μολύνθηκαν από μετάγγιση αίματος, η ιστολογική βλάβη είναι βαρύτερη από ότι σε ασθενείς, που μολύνθηκαν με διαφορετικό τρόπο π.χ. ναρκομανείς, β) με τον γονότυπο του ιού (ο γονότυπος II-1b είναι περισσότερο κυτταροπαθόγόνος), γ) με την βαρύτητα της οξείας λοίμωξης. Η βαρύτητα της ιστολογικής βλάβης δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα τρανσαμινασών, ούτε με το μέγεθος του ιϊκού φορτίου. Επίσης βρέθηκε ότι υπάρχουν λιγότερα προσβεβλημένα κύτταρα από τον ιό στην χρόνια HCV από ότι στην χρόνια HBV λοίμωξη (Cleaves και συν. 1981· Chambers και συν. 1990· Fong και συν. 1991· Takehara και συν. 1992· Di Bisceglie και συν. 1993).

Για την κλινική πορεία της οξείας ή χρόνιας λοίμωξης που προκαλεί ο HCV ευθύνεται τόσο η χυμική όσο και η κυτταρική ανοσοαπάντηση. Τα μολυσμένα από τον ιό ηπατοκύτταρα λύνονται από τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα. Τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ευθύνονται για την καταστροφή των ηπατοκυττάρων και την κάθαρση των ιϊκών σωματιδίων στην οξεία αυτοπεριοριζόμενη νόσο. Η ανεπαρκής ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την διαφυγή ιϊκών σωματιδίων, τα οποία παραμένουν στα ηπατοκύτταρα και οδηγούν σε χρόνια

λοίμωξη. Η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων εξαρτάται από την παρουσία ενεργοποιημένων Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων, τα οποία εκκρίνουν μεγάλα ποσά ιντερφερονών  $\gamma$  και  $\alpha$ , οι οποίες επιτείνουν την δραστηριότητά τους. Εκτός αυτού στην πρόκληση ηπατικής βλάβης συμμετέχει και η χυμική ανοσία. Τα Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα, ενεργοποιούνται από τα ιϊκά αντιγόνα τα οποία προηγουμένως έχουν τροποποιηθεί από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα) και από το μέγιστο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας -MHC-. Τα βοηθητικά λεμφοκύτταρα εκτός από την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, επιδρούν και στα Β λεμφοκύτταρα τα οποία και διεγείρουν προς παραγωγή αντισωμάτων. Με αυτά τα δεδομένα, οι μελλοντικές θεραπευτικές προσπάθειες θα πρέπει να κατευθύνονται όχι μόνο στην αναστολή του ιϊκού αναδιπλασιασμού, αλλά θα πρέπει να δοθεί και κάποια έμφαση στην ενδυνάμωση της ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης του ξενιστή (Walfer και συν. 1995<sup>1</sup> Penna και συν 1991<sup>2</sup> Lohr και συν. 1993<sup>3</sup> Long και συν. 1990<sup>4</sup> Koziel και συν. 1993<sup>5</sup> Kita και συν. 1993<sup>6</sup> Shirai και συν. 1994<sup>7</sup> Cerny και συν. 1995<sup>8</sup> Simmonds και συν. 1993<sup>9</sup> Stuhler και συν. 1993<sup>10</sup> Lassarte και συν. 1992<sup>11</sup> Chau και συν. 1991<sup>12</sup> Lohr και συν. 1996<sup>13</sup> Chemello και συν. 1993.)

Η χρησιμοποίηση ανασυνδυασμένων πεπτιδίων σε διαγνωστικές δοκιμασίες δεύτερης και τρίτης γενιάς και ο προσδιορισμός ορολογικών δεικτών δείχνει ότι οι πρωτεΐνες οι οποίες κωδικοποιούνται από το γένωμα του ιού, εμπεριέχουν αντιγονικούς επιτόπους, που αναγνωρίζονται από τα Β-λεμφοκύτταρα στους περισσότερους ασθενείς με ΗCV λοίμωξη. Τα λεμφοκύτταρα αυτά, πολλαπλασιάζονται όταν ευαισθητοποιηθούν μετά από έκθεσή τους στις ανασυνδυασμένες αυτές πρωτεΐνες (Schupper και συν. 1993). Η περιοχή του πυρηνοκαψιδίου είναι η πιο εκτεταμένα μελετημένη περιοχή από την άποψη αυτή. Σε 4-32 εβδομάδες από την έναρξη της λοίμωξης αναπτύσσονται αντισώματα, τα οποία δεν έχουν εξουδερωτική δράση. Τα αντισώματα αυτά παραμένουν για αδιευκρίνιστο χρονικό διάστημα, σε περίπτωση που δεν έχουμε μετάπτωση σε χρονιότητα. Η παρουσία τους δεν συσχετίζεται με εξελισσόμενη νόσο (Alter,

Purcell, Shih, Melpolder, και συν. 1989). Εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του HCV εντοπίστηκαν σε πρόσφατη μελέτη από τους Farci, και συν. 1992. Η επαναμόλυνση πειραματόζων από το ίδιο στέλεχος του ιού υποδηλώνει ότι η προστατευτική δράση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του HCV είναι περιορισμένη (Farci και συν. 1992). Η ανίχνευση αντισωμάτων με τις νεώτερες μεθόδους επιτυγχάνεται στο 90% των ασθενών με χρόνια HCV λοίμωξη (Hosein και συν. 1991· Okamoto και συν. 1992). Στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι οι πρωτεΐνες του περιβλήματος του ιού. (Rumenapf και συν. 1991). Αντισώματα κατά των πρωτεϊνών του περιβλήματος έχουν ανιχνευτεί στο 10-41% των ασθενών με χρόνια HCV λοίμωξη (Tibbs και συν. 1991).

Σε ασθενείς που πάσχουν από ηπατίτιδα C ανιχνεύονται με τεχνικές μοριακής βιολογίας αντι-GOR αντισώματα (Mishiro και συν. 1990). Το πεπτίδιο GOR είναι πυρηνικό αντιγόνο, που εκφράζεται περισσότερο στους ιστούς ηπατοκυτταρικού καρκίνου ενώ υπάρχουν και κλώνοι T-λεμφοκυττάρων με έκφραση GOR σε ασθενείς με ΗΚΚ και χρόνια ηπατίτιδα C (Mishiro και συν. 1991, Manns 1993).

Στην Ιαπωνία το 80% των ασθενών με NANB ηπατίτιδα έχουν αντι-GOR αντισώματα (Mishiro και συν. 1993). Η παρουσία του αντι-GOR επιβεβαιώθηκε και στη Δύση, αποτελεί δε επιφαινόμενο και δεν έχει παθογενετική, κλινική ή προγνωστική σημασία, αφού δεν συσχετίζεται με την ηλικία, το φύλο, τον τρόπο μετάδοσης, την βιοχημεία του ήπατος, την ιστολογική βαρύτητα της ηπατίτιδας ή την ανταπόκριση στην ιντερφερόνη (Lau 1992).

Μετά την ανακάλυψη του HCV μελέτες από Ιταλία, Ισπανία και Γερμανία έδειξαν ότι συσχετίζεται με την αυτοάνοση ηπατίτιδα ιδιαίτερα σε ασθενείς με αντισώματα κατά μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος-νεφρών (LKM-1) (Lenji και συν. 1990· Garson και συν. 1991· Lenji και συν. 1991). Άλλες μελέτες όμως αμφισβητούν την διαπίστωση αυτή (Lohr και συν. 1990· Paralla και συν. 1991· Mc Farlane και συν. 1993· Koskinas και συν. 1993).

## **ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ**

Ο HCV προκαλεί: α) οξεία ηπατίτιδα, β) χρόνια ηπατίτιδα, γ) κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, δ) χρόνια ιοφορία χωρίς ηπατικές (ή άλλων οργάνων) ανωμαλίες και ε) συστηματικές παθήσεις και εξωηπατικά σύνδρομα (Χατζηγιάννης, 1994).

**Η οξεία ηπατίτιδα** από τον HCV, συνήθως είναι ήπια, υποκλινική ή και αφανής ακόμη, πάντως είναι πιο ήπια από τις οξείες ηπατίτιδες A και B. Το 25% των ασθενών μπορεί να εμφανίσει ικτερική εικόνα με ανορεξία, ναυτία, καταβολή, πυρετό (Schmilovitz-Weiss και συν. 1993). Σχεδόν ανύπαρκτη είναι η κεραυνοβόλος ηπατίτιδα C (Choo και συν. 1989). Στην αρχική φάση της οξείας C λοίμωξης οι αμινοτρανσφεράσες του ορού αυξομειώνονται και μπορεί να γίνουν ακόμη και φυσιολογικές και έτσι η διάγνωση παρακωλύεται (Tassopoulos και συν. 1992).

Η οξεία ενεργός λοίμωξη χαρακτηρίζεται από την παρουσία στον ορό αντι-HCV αντισωμάτων, HCV-RNA, και αυξημένα επίπεδα ALT. Στην φάση αποδρομής είναι πιθανό να εξαλειφθεί το HCV-RNA και τα αντι-HCV IgM αντισώματα. Σπανιότατα εξαλείφονται τα αντι-HCV αντισώματα, ενώ οι τιμές των τρανσαμινασών και οι ιστολογικές βλάβες υποχωρούν. Στην φάση αυτή η παρατεταμένη παρουσία αντι-HCV IgM αντισωμάτων, συνηγορεί υπέρ της μετάπτωσης σε χρονιότητα. Η παρουσία αντι-HCV αντισωμάτων και υψηλών τιμών τρανσαμινασών πέραν του εξαμήνου, αποτελούν κριτήρια χρονιότητας (Houghton και συν. 1991· Tassopoulos και συν. 1992· Mc Guinness και συν. 1993· Sue UJC, και συν. 1993). Τα αντι-HCV αντισώματα είναι ανιχνεύσιμα 2-3 μήνες μετά την μόλυνση και μπορεί να παραμείνουν 1-4 χρόνια μετά από επεισόδιο οξείας HCV λοίμωξης. Έχει αναφερθεί ότι βαθμιαία ελάττωση των αντι-HCV αντισωμάτων σημαίνει αυτοπεριοριζόμενη νόσο χωρίς μετάπτωση σε χρονιότητα. Η παραμονή

αντι-HCV αντισωμάτων μετά από οξεία ηπατίτιδα C δεν σημαίνει πάντα μετάπτωση σε χρονιότητα, διότι τα αντι-HCV αντισώματα παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε τίτλο που μειώνεται αργά και προοδευτικά (Durakis και συν. 1992).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της οξείας C λοίμωξης είναι η μετάπτωσή της σε χρονιότητα σε ποσοστό 60-90%. Η αντίστοιχη μετάπτωση της οξείας λοίμωξης από τον HBV σε χρονιότητα είναι 5% (Genesa και συν. 1991· Yano και συν. 1993).

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η συχνότητα μετάπτωσης της οξείας λοίμωξης C σε χρονιότητα είναι μικρότερη στις σποραδικές (10%) από ότι στις μεταμεταγγισιακές περιπτώσεις (50-60%). (Norkrans και συν. 1979). Τελευταίες όμως μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συχνότητα μετάπτωσης είναι η ίδια (60-90%) (Alter και συν. 1993).

Υπεύθυνη για το ποσοστό μετάπτωσης σε χρονιότητα θεωρείται η ικανότητα του HCV να μεταλλάσσεται ταχύτατα, κυρίως όταν βρίσκεται υπό ανοσολογική πίεση και το ότι κυκλοφορεί ως μίγμα μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων (quasi species), με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται οι αντιγονικοί επίτοποι και να συνιστούν μηχανισμό διαφυγής από την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή (escape, quasi species) (Alter 1994). Οι συνεχείς αυτές μεταλλάξεις, οδηγούν σε παραγωγή υπολειμματικών μορφών του ιού οι οποίες παρεμβάλλονται και δεσμεύουν δυνητικώς εξουδετερωτικά αντισώματα, με αποτέλεσμα ο ιός να διαφεύγει του ανοσολογικού μηχανισμού (Ντουράκης σε Χατζηγιάννη Ηπατίτιδα C, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1994). Επίσης ο ιός έχει την ικανότητα να αμβλύνει την αντιγονική του έκφραση ελαττώνοντας την ένταση του αναδιπλασιασμού του (Alter 1994).

Ο κίνδυνος για μετάπτωση σε χρονιότητα είναι συγκριτικά ψηλότερος στους άνδρες (Tasopoulos και συν. 1992) και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, (Ντουράκης σε Χατζηγιάννη Ηπατίτιδα C, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1994).

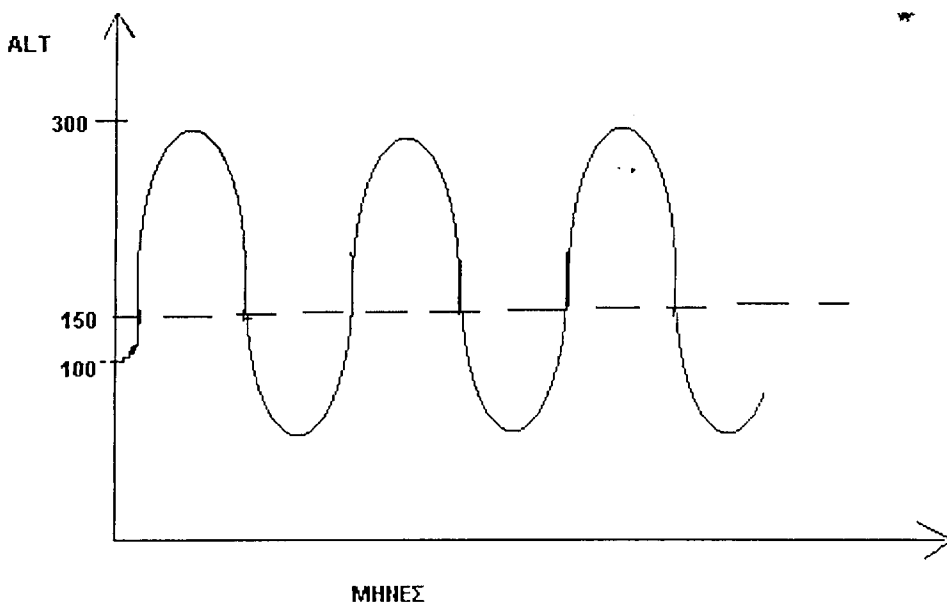
Η οξεία ηπατίτιδα C αντιπροσωπεύει το 9% των περιστατικών οξείας ηπατίτιδας σε ενήλικες στην Ελλάδα και μεταπίπτει σε χρονιότητα συχνότερα από

τις άλλες ιογενείς ηπατίτιδες (Alter και συν. 1990). Η οξεία ηπατίτιδα C δεν είναι ακίνδυνη νόσος (Wejstal και συν. 1987' Colombo και συν. 1987' Feinman και συν. 1988). Σε ασθενείς με οξεία ηπατίτιδα C οι τρανσαμινάσεις είναι δυνατόν να αυξομειώνονται συνεχώς ή να είναι διαλειπόντως φυσιολογικές ή φυσιολογικές για μεγάλο χρονικό διάστημα κι έπειτα αυξημένες (Tassopoulos και συν. 1992).

Ανιχνεύσιμα επίπεδα HCV-RNA διαπιστώνονται 2-6 εβδομάδες από την έκθεση στον ιό. Μέγιστα επίπεδα ιαιμίας παρατηρούνται πριν από την εκδήλωση ή κατά τα αρχικά στάδια της τόσο σε ασθενείς, που μεταπίπτουν σε χρονιότητα, όσο και σε εκείνους που ιώνται (Ακριβιάδης, Ηπατίτιδα C, 1995). Η εξέλιξη σε χρόνια λοίμωξη δεν εξαρτάται από το χρόνο εμφάνισης ούτε από το επίπεδο του HCV-RNA στο αίμα (Alter HJ. 1994). Για την ακριβή αξιολόγηση ασθενών με οξεία νόσο απαιτείται παρακολούθηση πέραν του ενός έτους.

Η μετάπτωση σε **χρονιότητα** τοποθετείται σχηματικά 6 με 12 μήνες, μετά την έναρξη της οξείας ηπατίτιδας εφόσον οι τρανσαμινάσεις παραμένουν αυξημένες. Η διάκριση μεταξύ ίασης και μετάπτωσης σε χρονιότητα είναι δύσκολη, διότι οι τρανσαμινάσεις αυξομειώνονται και μπορεί να φτάσουν και σε φυσιολογικά επίπεδα. Φυσιολογικές τιμές τρανσαμινασών ή εξαφάνιση των αντι-HCV αντισωμάτων δεν σημαίνουν ίαση από την οξεία ηπατίτιδα (Genesca και συν. 1991). Στην Ιαπωνία υπολογίζεται ότι  $2 \times 10^6$  άτομα έχουν εκτεθεί στον ιό. Το 70% οδηγήθηκαν σε χρόνια λοίμωξη, ενώ σε 30% η λοίμωξη αυτοπεριορίστηκε. Πολύ πιθανόν σ' αυτό το 30% των ασθενών ο ιός να παραμένει σε λανθάνουσα ή ανενεργό κατάσταση (Yano και συν. 1993).

Οι τρανσαμινάσεις στην χρόνια νόσο διακυμαίνονται σύμφωνα με το σχήμα:



αλλά μπορεί να είναι και φυσιολογικές ή μόνιμα αυξημένες.

Οι περισσότεροι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, είναι ασυμπτωματικοί, ή έχουν ελαφρά συμπτώματα όπως αίσθημα κόπωσης και αδυναμία για πολλά χρόνια. Η παρουσία ικτέρου αποτελεί κακό προγνωστικό σημείο, διότι υποδηλώνει προχωρημένη ηπατοκυτταρική βλάβη (Maclutyre και συν. 1992· Sherlak και συν. 1993).

Η ιστολογική δραστηριότητα της χρόνιας ηπατίτιδας C δεν συμβαδίζει πάντα με βιοχημικές διαταραχές. Ο HCV μπορεί να πολλαπλασιάζεται χωρίς να προκαλείται αύξηση της τιμής των τρανσαμινασών (Genesca και συν. 1991). Είναι λοιπόν απαραίτητος ο προσδιορισμός του HCV-RNA διότι η παρουσία του σημαίνει νόσο σε εξέλιξη (Bonino και συν. 1993· Brillanti και συν. 1993).

Το ιϊκό φορτίο είναι χαμηλότερο σε άτομα με ελαφρότερες ιστολογικές βλάβες και υψηλότερο σε κίρρωση, συνήθως αυξάνεται όταν επιδεινώνεται η ιστολογική εικόνα και παρατείνεται η λοίμωξη. Η χρόνια ενεργός λοίμωξη συνοδεύεται από την παρουσία HCV-RNA, χωρίς η αύξηση των τιμών των τρανσαμινασών να είναι συνεχής. Τα αντι-HCV IgM αντισώματα και η παρουσία του HCVAg αντιγόνου στον ηπατικό ιστό αποτελούν δείκτες ενεργού νόσου και βοηθούν στην σταδιοποίηση και πρόγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας C (Kato και συν. 1993· Hagiwara και συν. 1993).

Ουσιώδης είναι η διάκριση μεταξύ χρόνιας λοίμωξης και χρόνιας ηπατίτιδας C. Η παρουσία και ο πολ/σμός του ιού, χωρίς εκδήλωση ηπατικής βλάβης χαρακτηρίζουν την λοίμωξη. Αντίθετα όταν υπάρχει ηπατική βλάβη, τότε πρόκειται για ηπατίτιδα. Στην κλινική πράξη θεωρείται ότι κάθε άτομο με αυξημένες τρανσαμινάσες και αντι-HCV αντισώματα πάσχει από χρόνια ηπατίτιδα C. Σε οροαρνητικούς ασθενείς η παρουσία ιαιμίας, (δηλ. η διαπίστωση HCV-RNA με nested PCR) δηλώνει χρόνια λοίμωξη. Έχουν περιγραφεί περιπτώσεις διαπίστωσης αντι-HCV αντισωμάτων σε κλινικώς υγιή άτομα με φυσιολογικές τιμές τρανσαμινασών. Στην προκειμένη περίπτωση είναι δύσκολο να πει κανείς, αν πρόκειται για παλιά έκθεση στον HCV, ή αν πρόκειται για χρόνια λοίμωξη, γιατί στην χρόνια λοίμωξη παρατηρείται αυξομείωση των τιμών των τρανσαμινασών, οι οποίες κατά διαστήματα επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα (Alberti και συν. 1991). Στις περιπτώσεις αυτές είναι αναγκαία η παρακολούθηση των ασθενών με nested-PCR για την διαπίστωση της ιαιμίας. Ακόμη και αν μετά από επανειλημμένο έλεγχο, τα αποτελέσματα της PCR για HCV-RNA είναι αρνητικά, η πιθανότητα να επαναπροσδιοριστεί ο ιός δεν αποκλείεται (Esteban και συν. 1991). Αυτό οφείλεται όπως προαναφέρθηκε στα quasi species και τις υπολειμματικές μορφές του ιού, που οδηγούν στην διαφυγή του από το ανοσολογικό σύστημα (Alter 1994).

Έχουν αναγνωρισθεί "ασυμπτωματικοί" υγιείς φορείς, δηλ. άτομα με θετικό HCV RNA και φυσιολογική βιοχημική και ιστολογική εικόνα του ηπατικού παρεγχύματος. Δεν είναι γνωστό αν τα άτομα αυτά παραμένουν στην ίδια κατάσταση με την πάροδο του χρόνου (Ντουράκης Σ, 1994· Shakil και συν. 1995· Prieto και συν. 1995· Farci και συν. 1991· Alter και συν. 1992). Δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του HCV-RNA στον ορό των υγιών φορέων του ιού και των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C (Shindo και συν. 1994· Kuzushita και συν. 1994).

Η αυτόματη εξαφάνιση του HCV-RNA στην χρόνια λοίμωξη είναι σπάνια (TanaKa και συν. 1991). Αυτόματη ύφεση χρόνιας ηπατίτιδας C, παρατηρείται



μόνο στο 2% των χρονίως πασχόντων σε αντίθεση με 40% στην χρόνια ηπατίτιδα Β με θετικό ΗΒεΑg (Yano και συν. 1993).

Η χρόνια ηπατίτιδα C, απαιτεί 10 χρόνια για να εξελιχθεί σε κίρρωση και η κίρρωση άλλα 10 χρόνια για να εξελιχθεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Kirosawa και συν. 1990· Zavitsanos και συν. 1992). Χαμηλές λευκωματίνες στον ορό, παράταση του χρόνου προθρομβίνης και αύξηση της AST μεγαλύτερη από την αύξηση της ALT, υποδηλώνουν κίρρωση με ηπατική ανεπάρκεια. Είναι γεγονός ότι λίγες μελέτες υπάρχουν για την πρόγνωση της χρόνιας ηπατίτιδας C, διότι η παρακολούθηση των ασθενών είναι βραχυπρόθεσμη και για την εκδήλωση σοβαρών ηπατικών βλαβών χρειάζονται αρκετά χρόνια (Ντουράκης ΣΠ, σε Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, 1994). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετάπτωσης της χρόνιας ηπατίτιδας σε ηπατική κίρρωση είναι:

- Η ηλικία έκθεσης στον ιό. Ο ΗCV προσβάλλει κυρίως μεσήλικες.
- Η διάρκεια της νόσου.
- Η ωριμότητα και πληρότητα του ανοσιακού συστήματος.
- Ο βαθμός της ιστολογικής βλάβης.
- Η κατάχρηση του αλκοόλ.
- Η λοίμωξη με ΗΒV (Ντουράκης 1994). Ίσως η χρόνια ηπατίτιδα C αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου σε άτομα με συνλοίμωξη με ΗΒV (Eyster και συν. 1993).
- Ο γονότυπος του ιού. Ο γονότυπος Ib, συσχετίζεται με την μετάπτωση της χρόνιας ηπατίτιδας C σε κίρρωση (Brechtel και συν. 1993).

Η κίρρωση είναι δυνατόν να εξελιχθεί σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Δεν υπάρχουν ενδείξεις, ότι ο ΗCV είναι άμεσα καρκινογόνος ιός. Δεν γίνεται αντίστροφη μεταγραφή αυτού και δεν ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή. Επίσης δεν ανευρέθηκαν ογκογονίδια στο γονιδίωμά του. Η ηπατική βλάβη συνίσταται στην συνεχή νεκροαγέννηση, χωρίς να μεσολαβούν διαστήματα μακρόχρονης ηρεμίας (Ruiz και συν. 1992· Sheu και συν. 1992). Ασθενείς με ΗΚΚ εμφανίζουν ορολογικές ή ιολογικές ενδείξεις λοίμωξης με ΗCV σε ποσοστό που

κυμαίνεται 14-83%. Η διακύμανση αυτή οφείλεται στην παρέμβαση διεθνών, εθνικών και γεωγραφικών παραγόντων (Zavitsanos και συν. 1992· Ruiz και συν. 1992· Thelu και συν. 1992· Ikeda και συν. 1993· Γιαννούλης και συν. 1993· Μάνεσης και συν. 1994). Στην Ελλάδα σε μελέτη των Γκορίτσα και συν. 1993, ανακοινώθηκε η ανίχνευση αντι-HCV αντισωμάτων και HCV-RNA σε ασθενείς με ΗΚΚ σε ποσοστό 14%. Σε αντι-HCV θετικούς ασθενείς ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ αναφέρεται ιδιαίτερα αυξημένος σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (Simmoti και συν. 1992). Σε ορισμένες χώρες π.χ. Ιαπωνία, (Ikeda και συν. 1993) και Ισπανία (Ruiz και συν. 1992), το ποσοστό των ασθενών με ΗΚΚ και θετικά αντι-HCV αντισώματα είναι μεγάλο, ενώ σε άλλες χώρες το αντίστοιχο ποσοστό είναι μικρό. Ο γονότυπος Ib συσχετίζεται με την βαρύτητα της χρόνιας λοίμωξης και την μετάπτωση σε κίρρωση και αποτελεί παράγοντα αυξημένου κινδύνου για την ανάπτυξη ΗΚΚ (Kato και συν. 1991· Chemello και συν. 1993). Άλλοι παράγοντες που συνοψίζονται στην ηπατοκυτταρική καρκινογένεση είναι:

- Η μεγάλη ηλικία.
- Η κατάχρηση αλκοόλ (Ikeda και συν. 1993· Tsukuma και συν. 1993).
- Η συνύπαρξη ενεργού HBV λοίμωξης.
- Πιθανώς το κάπνισμα (Tzouou και συν. 1991· Tsukuma και συν. 1993· Χατζηγιάννης, 1994).

Στην Ιαπωνία τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση του ΗΚΚ. Η κύρια αιτία για την αύξηση αυτή είναι η παράταση της επιβίωσης των κίρρωτικών ασθενών λόγω επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης και η χρόνια ηπατίτιδα. Καθώς οι φορείς του HBV έχουν σημαντικά μειωθεί, η αύξηση του ΗΚΚ κυρίως οφείλεται στην χρόνια ηπατίτιδα και στην κίρρωση κατόπιν HCV λοίμωξης. (Susumu Takamo, και συν. 1995) αν και σπάνια, όμως υπάρχουν περιπτώσεις μετάπτωσης χρόνιας ηπατίτιδας C σε ΗΚΚ, χωρίς κίρρωση.

Σε μελέτη των Susumu Takamo, Osamu Yokosuka και συν, 1995 αναφέρεται ότι από 13 περιπτώσεις ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σε μία μόνο (7,7%) δεν προηγήθηκε του

ηπατοκυτταρικού καρκινώματος κίρρωση. Αντίθετα από 5 περιπτώσεις ασθενών με ηπατίτιδα Β και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στις 2 (40%) δεν προηγήθηκε κίρρωση. Επίσης στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι οι γονότυποι δεν παίζουν ρόλο στην εμφάνιση ΗΚΚ με ή χωρίς κίρρωση.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ είναι σημαντικά αυξημένος σε ασθενείς με κίρρωση από ΗCV, σε σύγκριση με κίρρωση από ΗΒV λοίμωξη (Ikeda και συν. 1993). Ο αυξημένος αυτός κίνδυνος ίσως οφείλεται στην πολύ βαρύτερη κλινική εξέλιξη της κίρρωσης, που προκαλεί ο ΗΒV, η οποία μεταπίπτει σε φάση μη αντιρρόπησης, με εμφάνιση επιπλοκών, που οδηγούν ταχέως στο θάνατο. Αντίθετα, στους ασθενείς με κίρρωση κατόπιν ΗCV λοίμωξης η κλινική πορεία είναι ηπιότερη, επομένως επιβιώνουν μακρότερο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα να υπάρχει ο χρόνος για την ανάπτυξη του ΗΚΚ (Ikeda και συν. 1993).

Ο ΗCV ενοχοποιείται για εξωηπατικές εκδηλώσεις όπως:

- Κρυσφαιριναιμία (μεικτή τύπου II και III)
- Σπειραματονεφρίτιδα
- Σύνδρομο Sjogren
- Ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα

Επίσης είναι πιθανόν να συνδέεται με τα ακόλουθα νοσήματα:

- Ρευματοειδή αρθρίτιδα
- Σακχαρώδη διαβήτη
- Οζώδης πολυαρτηρίτιδα
- Κνίδωση
- Οζώδες ερύθημα
- Έλκος του Moogen στον κερατοειδή
- Ομαλό λειχήνα

(Σ. Χατζηγιάννης, Ηπατίτιδα C, 1995, εκδόσεις Πασχαλίδη)

Όσον αφορά την κρουσφαιριναιμία διάφορες μελέτες έδειξαν, ότι ασθενείς με πρωτοπαθή μικτή κρουσφαιριναιμία, έχουν στον ορό αντι-HCV αντισώματα σε ποσοστό 42-66% HCV-RNA ανιχνεύτηκε στον ορό σε υψηλότερα ποσοστά (81-86%) (Angelo και συν. 1992· Misiani και συν. 1992· Ferri και συν. 1991). Επίσης μελέτες έδειξαν ότι η θεραπεία με ιντερφερόνη α εξαφανίζει ή ελαττώνει την συγκέντρωση των κρουσφαιρινών στον ορό παράλληλα με την ελάττωση των τρανσαμινασών (Marcellin και συν. 1993· Lunel και συν. 1993· Farahvash και συν. 1993· Levey και συν. 1993· Bonomo και συν. 1987). Επίσης βρέθηκε ότι στο κλάσμα των κρουσφαιρινών υπάρχει εμπλουτισμός τόσο του HCV-RNA (1000/πλάσια συγκέντρωση) όσο και των αντι-HCV αντισωμάτων (10/πλάσια συγκέντρωση) και επίσης ότι σε ασθενείς με Π.Μ.Κ. και HCV λοίμωξη, ποσοστό μεγαλύτερο από 99% του συνολικού HCV-RNA ανιχνεύεται στο κλάσμα των κρουσφαιρινών (Augello και συν. 1992).

Η χρόνια λοίμωξη από τον HCV μπορεί να προκαλέσει μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα, που συχνά συνοδεύεται από κρουσφαιριναιμία. Το 1993, περιγράφηκαν 8 ασθενείς νεφρολογικού κέντρου με χρόνια ηπατίτιδα C συνδεδεμένη με λευκωματουρία και νεφρική ανεπάρκεια. (Johnson και συν. 1993). Με την χορήγηση ιντερφερόνης α βελτιώθηκαν η λευκωματουρία, η νεφρική ανεπάρκεια και η χρόνια ηπατίτιδα (Appel G, 1993). Από υλικό βιοψίας νεφρού δεν απομονώθηκε HCV-RNA στο σπείραμα. Η συσχέτιση HCV λοίμωξης και σπειραματονεφρίτιδας είναι σημαντική από κλινική άποψη και υποστηρίζεται ότι σε ασθενείς με HCV λοίμωξη και παθολογικά ευρήματα στα ούρα, θα πρέπει να εξετάζεται ενδεχομένως η ύπαρξη σπειραματονεφρίτιδας. Επίσης οι ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα άγνωστης αιτιολογίας, θα πρέπει να ελέγχονται και για πιθανή HCV λοίμωξη (Johnson και συν. 1993· Appel, 1993).

Ο HCV είναι ένας ιός που αποβάλλεται στο σίελο (Abe και συν. 1987· Ducheiko και συν. 1990· Takamatsu και συν. 1990· Wawy και συν. 1992) και θα μπορούσε να συσχετιστεί με το σύνδρομο Sjogren μέσω προσβολής των

δακρυϊκών και σιελογόνων αδένων (Manns 1993) ή στα πλαίσια αυτοάνοσης διαταραχής. (Haddad και συν. 1992). Ο HCV προκαλεί ιστολογικές βλάβες στους σιελογόνους αδένες, παρόμοιες τόσο με αυτές του συνδρόμου Sjogren, όσο και με αυτές, που παρατηρούνται στην ιστολογική εξέταση του ήπατος. Οι μέχρι σήμερα μελέτες δεν επαρκούν για να λεχθεί ότι ο HCV αποτελεί ένα από τα αίτια του συνδρόμου Sjogren, αφού φαίνεται ότι διαφέρουν σε γενετικούς παράγοντες, στην έκφραση αυτοαντισωμάτων και στην βαρύτητα ιστολογικών αλλοιώσεων (Pirisi και συν. 1994). Πάντως σε ασθενείς με ξηροφθαλμία και ξηροστομία και αυξημένες τρανσαμινάσες, θα πρέπει να ελέγχεται ενδεχόμενη χρόνια HCV λοίμωξη (Σ. Χατζηγιάννης, 1995).

Έχουν αναφερθεί μεμονωμένα περιστατικά αυτοάνοσης θρομβοπενίας, που επιπλέκει οξεία (Domingo και συν. 1990) και χρόνια ηπατίτιδα C χωρίς πυλαία υπέρταση (Durand και συν. 1993). Αντι-HCV αντισώματα διαπιστώθηκαν σε ποσοστό 19% σε ασθενείς με θρομβοπενική πορφύρα άγνωστης αιτιολογίας (Silva και συν. 1992). Στους μισούς ασθενείς, η HCV λοίμωξη είχε προηγηθεί της εκδήλωσης της θρομβοπενίας, ενώ τα πυρηνικά οξέα του ιού ανιχνεύτηκαν στα αιμοπετάλια, συνηγορώντας υπέρ ενεργού μόλυνσής τους. Η θεραπεία με ιντερφερόνη α φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων, που είναι ανεξάρτητη από την ανταπόκριση της ηπατικής νόσου (Durand και συν. 1994· Ponlachic και συν. 1994).

Ηπατοτρόποι ιοί όπως της ηπατίτιδας A και B, ο κυτταρομεγαλοϊός και ο ιός Erstein-Barr έχουν από παλιά ενοχοποιηθεί για την πρόκληση απλαστικής αναιμίας (Casciato και συν. 1978· Mc Sweeney και συν. 1978). Μερικοί ασθενείς, κατά την διάγνωση της απλαστικής αναιμίας παρουσίαζαν υψηλές τιμές τρανσαμινασών, που θα μπορούσε να αποδοθούν σε υποκλινική προσβολή του ήπατος, από άγνωστο ακόμη ιό ηπατίτιδος (Camitta και συν. 1982). Η συσχέτιση της οξείας NANB ηπατίτιδας με την πρόκληση απλαστικής αναιμίας στηρίχθηκε σε κλινικές παρατηρήσεις (Perrilo και συν. 1981), αλλά και στην διαπίστωση ότι ορός από χιμπατζήδες που έπασχαν από οξεία ηπατίτιδα NANB, παρεντερικής μετάδοσης,

ανέστειλε την λειτουργία των αρχέγονων κυττάρων του μυελού *in vitro* (Zeldis και συν. 1989). Όσον αφορά στον HCV θεωρήθηκε αρχικά ότι η πρόκληση απλαστικής αναιμίας οφείλεται σε προσβολή των αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών, λόγω του ότι συγγενεύει με τους φλαβοϊούς και οι οποίοι όταν χορηγήθηκαν ως αντινεοπλασματικοί παράγοντες, προκάλεσαν απλασία μυελού (Nakau S, Lai CJ, Young NS, 1989· Young N, Mortimer P, 1984· Halstead SB, 1982· Tigert WD, Crosby WH, Berye TO, 1962).

Νεώτερες μελέτες δεν ενισχύουν την άποψη ότι ο HCV προκαλεί απλαστική αναιμία. Ο αυξημένος επιπολασμός της NANB ηπατίτιδας (15% οροθετικοί με Elisa-1<sup>ns</sup> γενιάς) σε αναδρομική μελέτη 118 ασθενών με βαριά απλαστική αναιμία, αποδόθηκε στις μεταγγίσεις (Pol και συν. 1990). Σε νεώτερες μελέτες ασθενών με απλαστική αναιμία και οξεία NANB ηπατίτιδα, δεν διαπιστώθηκε HCV ιαίμια ή υψηλή οροθετικότητα παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν πιο ευαίσθητες ορολογικές μέθοδοι (Hibbs και συν. 1992). Έτσι ενισχύεται η άποψη ότι ο HCV δεν προκαλεί απλαστική αναιμία και πιθανά η συσχέτιση NANB ηπατίτιδας και απλαστικής αναιμίας αφορά σε κάποιον άλλο ιό (Pol και συν. 1992).

Ο Borque L, 1992 περιέγραψε ασθενή, που ανέπτυξε ρευματοειδή αρθρίτιδα μετά από οξεία ηπατίτιδα C παρεντερικώς μεταδοθείσης. Είναι πιθανόν ο HCV να προσβάλλει τις αρθρώσεις ή και να προκαλεί βλάβες λόγω κυτταροτοξικότητας ή μέσω ανοσολογικής αντίδρασης. Πρόσφατα συσχετίστηκε η πρόκληση σακχαρώδους διαβήτη και HCV λοίμωξης, σε μελέτη 100 ασθενών σε αναμονή για μεταμόσχευση, λόγω κίρρωσης ήπατος τελικού σταδίου. Ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη ήταν 50% στους 34 αντι-HCV οροθετικούς ασθενείς, δηλ. πολύ υψηλότερος, από ότι στους αντι-HCV οροαρνητικούς ασθενείς (Alison Med, και συν. 1994). Εκφράζεται έτσι η υπόθεση ότι ο HCV μπορεί να προσβάλλει τα κύτταρα του παγκρέατος, όπως κάνει με τα λεμφοκύτταρα, ή μπορεί να προκαλεί την αυτοάνοση καταστροφή τους μέσω διέγερσης ανοσολογικού μηχανισμού (Χατζηγιάννης Σ, 1995). Οι Casoub και συν. (1992) σε μελέτη τους αναφέρουν ότι οι 6 από τους 50 (12%) ασθενείς με οζώδη

πολυαρτηρίτιδα ήταν αντι-HCV θετικοί, ενώ δεν παρουσίαζαν διαταραχές του βιοχημικού ελέγχου του ήπατος. Εκφράστηκε έτσι η υπόθεση ότι πιθανά ο HCV να αποτελεί έναυσμα για την πρόκληση της αγγειακής βλάβης.

Οι Reichel και συν. 1990, αναφέρουν εκδήλωση κνίδωσης σε ασθενείς με οξεία μεταμεταγγισιακή ηπατίτιδα C, κατά την οροαναστροφή. Επίσης έχει περιγραφεί οζώδες ερύθημα σε ασθενή με οξεία ηπατίτιδα C, που υποχώρησε μετά την θεραπεία της ηπατίτιδας (Domingo και συν. 1990). Ο Wilson και συν. (1993), περιγράφουν δυο περιστατικά ασθενών με χρόνια HCV ηπατίτιδα παρεντερικής μετάδοσης με ιαιμία και έλκος του Mooren, που ανταποκρίθηκε μαζί με την ηπατίτιδα στην θεραπευτική χορήγηση ιντερφερόνης α. Η πρόωρη διακοπή της οδήγησε σε υποτροπή του έλκους που επουλώθηκε με την επαναχορήγησή της.

Πρόσφατα διαπιστώθηκε υψηλή συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων (38%) και HCV-RNA (30%) σε ασθενείς με ομαλό λειχήνα (Santander και συν. 1994). Εκφράστηκε η άποψη ότι ο ιός μπορεί να αποτελεί το παθογόνο αίτιο της ηπατοπάθειας σε ομαλό λειχήνα. (Klode και συν. 1994). Σ' αυτή την περίπτωση η ιντερφερόνη α βοηθά την ηπατική και τη δερματική νόσο.

## **ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΙΝΔΥΝΟ HCV ΛΟΙΜΩΞΗΣ**

Η συλλοίμωξη HCV και HIV συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο σεξουαλικής και κάθετης μετάδοσης καθώς και με υψηλότερα επίπεδα HCV-RNA στον ορό (Eyster και συν. 1991).

Ενδιαφέρουσα είναι η συσχέτιση HBV και HCV. Από τις πρώτες μελέτες που έγιναν επί φορέων HBV, ανιχνεύτηκαν αντι-HCV αντισώματα σε ποσοστό 11% με Elisa 1ης γενιάς (Foug και συν. 1991) ενώ με Elisa 2ης γενιάς το ποσοστό ήταν πιο ψηλό (Smith και συν. 1992). Με την χρήση PCR βρέθηκε ότι η παρουσία του HCV RNA συνδυαζόταν με απουσία HBV-DNA, ενώ στους έχοντες HBV-DNA,

διαπιστώθηκε το HCV-RNA μόνο σε αναλογία 10% (Bach και συν. 1992). Ενδιαφέρον είναι ότι όλοι οι ασθενείς αυτοί είχαν HCV-RNA στο ήπαρ (Pontisso και συν. 1993· Crespo και συν. 1994). Οι Mimms και συν. (1993) σε μελέτη 5 ασθενών που μολύνθηκαν ταυτόχρονα με HBV και HCV, βρήκαν ότι σε όλους το HBsAg, αρνητικοποιήθηκε και η διάρκεια παραμονής και το μέγεθος της τιμής των τρανσαμινασών ήταν χαμηλότερα σε σχέση με ασθενείς που είχαν μόνο HBV λοίμωξη. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο HCV καταστέλει τον πολλαπλασιασμό του HBV είναι άγνωστος.

Η αλκοολική ηπατοπάθεια είναι ένα νόσημα που συσχετίστηκε με αυξημένη συχνότητα λοίμωξης από τον HCV (Pares και συν. 1990· Brillanti και συν. 1991· Mendanhall και συν. 1991). Σε μελέτη των Candwell και συν. σε ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια ανευρίσκονται στον ορό αντι-HCV αντισώματα, σε ποσοστό 25%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για HCV-RNA είναι 16% (Candwell και συν. 1993), εν αντιθέσει με τη μελέτη των Dalekos G και συν. όπου δεν διαπιστώθηκε αυξημένο ποσοστό αντι-HCV αντισωμάτων σε αλκοολικούς της περιοχής της Ηπείρου (Dalekos G και συν. 1996).

Οι νεφροπαθείς αποτελούν επίσης ομάδα υψηλού κινδύνου. Σε μεγάλη αμερικάνικη μελέτη, το ποσοστό των αντι-HCV θετικών ασθενών ήταν 10%, ενώ στην Ευρώπη το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 25-30% (Nin και συν. 1993· Dusso και συν. 1993). Σε ιαπωνική μελέτη βρέθηκε ποσοστό 38,6% αντι-HCV θετικών ασθενών. Ενδιαφέρον ήταν ότι τα ποσοστά δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών που είχαν μεταγγιστεί και εκείνων που δεν είχαν μεταγγιστεί. Υπήρχε όμως σαφής συσχέτιση με την χρονική διάρκεια υποβολής σε χρόνια περιοδική αιμοκάθαρση όπως προκύπτει από το ότι σε ασθενείς άνω των 50 ετών το ποσοστό ήταν 50%, έναντι 4,6% σε νέους ασθενείς (Irie και συν. 1994). Σε αντίστοιχη μελέτη των Elisaf M, Tsianos E και συν. διαπιστώθηκαν αντι-HCV αντισώματα σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς σε ποσοστό 17,6% (Elisaf M, Tsianos E, και συν. 1991).



Και άλλα νοσήματα έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο HCV λοίμωξης. Οι Bertolini και συν. (1992) αναφέρουν ποσοστό 17% αντι-HCV θετικών ασθενών με πρωτοπαθή χολική κίρρωση. Τέλος εντυπωσιακό είναι ότι το 32% των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στην φάση της ύφεσης ήταν αντι-HCV θετικά, ενώ το ποσοστό ήταν μόνο 9% σε παιδιά με άλλα νεοπλάσματα, που χρησίμευσαν ως μάρτυρες. Ακόμη πιο εντυπωσιακό είναι ότι η υψηλή αυτή συχνότητα λοίμωξης ήταν ανεξάρτητη των μεταγγίσεων (Dibenetto και συν. 1994).

## **ΜΕΤΑΔΟΣΗ**

Ο HCV είναι ένας ηπατοτρόπος ιός, ο οποίος ανιχνεύεται με PCR στο περιφερικό αίμα (Ulrich και συν. 1990· Ulrich και συν. 1991) και συγκεκριμένα στον ορό, στα Β και Τ λεμφοκύτταρα, όπου φαίνεται να έχει την ικανότητα πολλαπλασιασμού (εξωηπατικός πολ/σμός). Επίσης έχει ανιχνευθεί στα ηπατοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων οδών με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές και "in situ" υβριδισμό (Hiramatsu και συν. 1991· Krawczynski και συν. 1992· Negro και συν. 1992· Nauri Aria και συν. 1993), HCV-RNA έχει ανιχνευθεί επίσης στους σιελογόνους αδένες, στον σπλήνα, στο αίμα της εμμηνορρυσίας και στο γάλα γυναικών με χρόνια HCV λοίμωξη (Takamatsu και συν. 1992· Silverman και συν. 1994).

Ο ιός μεταδίδεται κυρίως αιματογενώς (Mast και συν. 1993· Yano και συν. 1993· Margolis 1993· Παπαθεοδωρίδης και συν. 1993). Μετά από μετάγγιση αντι-HCV θετικού αίματος ο κίνδυνος μετάδοσης HCV λοίμωξης είναι περίπου 75% (Alter και συν. 1991· Mast και συν. 1993). Στην Ελλάδα η μετάγγιση αίματος ευθύνετο για το 19,8% των περιπτώσεων οξείας ηπατίτιδας NANB πριν καθιερωθεί ο έλεγχος των αιμοδοτών (Τασσόπουλος και συν. 1992). Ομάδες ατόμων εκτεθειμένες σε υψηλό κίνδυνο παρεντερικής μόλυνσης με τον HCV είναι οι

ενδοφλέβιοι χρήστες ναρκωτικών ουσιών (Παπαθεοδωρίδης και συν. 1993· Hatziyiannis και συν. 1993· Coppola και συν. 1993), οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς, οι λήπτες ιστών και οργάνων και το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό. (Pereira και συν. 1991· Μπολέτης και συν. 1992· Κοκκίνη και συν. 1992· Roth και συν. 1992). Η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στο ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό δεν είναι μεγάλη, παρόλο που εκτίθενται σε μεγάλο κίνδυνο μόλυνσης (Genesa και συν. 1991· Marinho και συν. 1991· Ραπτοπούλου-Γιγή και συν. 1992). Σε ελληνική μελέτη η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στο ιατρικό προσωπικό βρέθηκε μόλις 0,48%.

Ο Homma και συν. αναφέρουν 7 περιπτώσεις αδελφών νοσοκόμων, που τραπηθήκαν με βελόνη χρησιμοποιηθείσα σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Σε δύο από αυτές 10 και 120 λεπτά μετά το νυγμό, διαπιστώθηκε η παρουσία HCV-RNA στο αίμα τους. Όμως ούτε αυτές, ούτε οι άλλες ανέπτυξαν οξεία ηπατίτιδα C, ούτε αργότερα εμφανίστηκαν αντι-HCV αντισώματα ή HCV-RNA στον ορό. Η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι η μετάδοση κατόπιν νυγμού βελόνας είναι αμελητέα.

Στην παρεντερική μετάδοση του ιού σημαντική ευθύνη αποδίδεται στην κακή αποστείρωση συρίγγων πολλαπλής χρήσης και στην τεχνική εμβολιασμών με πιστολάκι. Στις αναπτυγμένες χώρες σήμερα δεν χρησιμοποιούνται τέτοιες τεχνικές αποστείρωσης και εμβολιασμού, αλλά στις χώρες του τρίτου κόσμου, τέτοιες τεχνικές χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα και συνιστούν παράγοντες μετάδοσης τόσο του HCV όσο και του HBV. Παράγοντας κινδύνου είναι επίσης και τα τατουάζ (Hadziyiannis και συν. 1993· Strojiono 1993· Σκληρός και συν. 1994).

Η χορήγηση πλάσματος, παραγώγων πήξεως και άλλων παραγώγων αίματος ευθύνονται για την διασπορά του HCV (Hadziyiannis και συν. 1993). Προϊάντα πλάσματος που υπεβλήθησαν σε θερμική ή χημική απενεργοποίηση, είναι μη μολυσματικά (Makris και συν. 1993).

Η χρήση ανοσοσφαιρινών θεωρείται ασφαλής (Lee και συν. 1988). Σε Ιρλανδική όμως μελέτη αναφέρεται "επιδημία" λοίμωξης με HCV σε ασθενείς που έλαβαν αντι-D ανοσοσφαιρίνη (Power και συν. 1995).

Περιπτώσεις ηπατίτιδας C, χωρίς ιστορικό παρεντερικής έκθεσης αναφέρονται ως "σποραδικές". Εδώ υπάγονται η γενετήσια και η ενδοοικογενειακή μετάδοση. Από τα αποτελέσματα σχετικών ερευνών προκύπτει ότι η μετάδοση σε αυτές τις περιπτώσεις είναι μεν δυνατή, αλλά περιορισμένη (Tor και συν. 1990· Ρουμελιώτου και συν. 1992· Βασιλοπούλου-Καδά και συν. 1992). Όσον αφορά στην γενετήσια μετάδοση, σημαντική ομάδα κινδύνου φαίνεται να αποτελούν οι σύζυγοι ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, οι οποίοι έχουν αντισώματα σε ποσοστό 27% (Reano και συν. 1992). Ο κίνδυνος αυξάνει με τα χρόνια της συζυγικής ζωής και την συχνότητα των επαφών και δεν αναφέρονται περιπτώσεις μετάδοσης σε έγγαμο βίο μικρότερο των 10 ετών.

Σε ιαπωνική μελέτη (Oshita και συν. 1993), η συχνότητα παρουσίας του HCV σε συζύγους ασθενών με HCV ηπατοπάθεια, ήταν 24%. Επίσης διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς με χρόνια ηπατοπάθεια C κατόπιν μόλυνσης με μετάγγιση αίματος οι σεξουαλικοί σύντροφοι είχαν υψηλά ποσοστά αντι-HCV αντισωμάτων (49%) στον ορό, ενώ όταν η νόσος δεν συσχετιζόταν με μετάγγιση το σχετικό ποσοστό ήταν χαμηλό (16%). Τα αντίστοιχα ποσοστά του HCV-RNA στον ορό ήταν 45% έναντι 5%. Σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι το 65% των συζύγων ασθενών με ηπατίτιδα C και διάρκεια γάμου άνω των 30 ετών είχαν αντι-HCV αντισώματα, έναντι 20% εκείνων με διάρκεια γάμου κάτω των 20 ετών. Τα ποσοστά διαπίστωσης HCV-RNA ήταν αντίστοιχα 65% και 20% (Ueno και συν. 1994).

Σε κανένα από 58 παιδιά των οποίων ο ένας ή και οι δύο γονείς ήταν αντι-HCV θετικοί, δεν διαπιστώθηκε μετάδοση του ιού από τους μολυσμένους γονείς (Deny και συν. 1992). Σε ιαπωνική μελέτη αναφέρεται μικρή, αλλά υπαρκτή ενδοοικογενειακή διασπορά από μολυσμένους γονείς στα παιδιά και άλλους συγκατοικούντες συγγενείς (Oshita και συν. 1993). Το ποσοστό της οικογενειακής

διασποράς ήταν περίπου 5%, έναντι 2% των ομάδων ελέγχου και 1,5% των αιμοδοτών της ίδιας περιοχής.

Σε Ευρωπαϊκή μελέτη απεδείχθη ότι μετάδοσή του HCV κατόπιν μόλυνσης του ενός σεξουαλικού συντρόφου από ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών, ευνοείται εάν υπάρχει HIV λοίμωξη και στους δύο (28,6%), ή όταν ο ένας από τους δύο είναι HIV θετικός (12,8%). Αντίθετα ουδείς σεξουαλικός σύντροφος εμφάνισε θετικότητα, όταν ήταν και οι δύο HIV αρνητικοί. Το σημαντικό της μελέτης είναι ότι τα ευρήματα ήταν ανεξάρτητα από την χρήση ή μη προφυλακτικού (Garbielli και συν. 1994).

Σε μελέτη, όπου εξετάστηκε το αίμα της εμμήνου ρύσης HCV οροθετικών γυναικών διαπιστώθηκε η παρουσία HCV-RNA (Silverman και συν. 1994), πράγμα το οποίο επισημαίνει δυνητική πηγή κινδύνου. Σε αντίστοιχη μελέτη, που έγινε στο σπέρμα δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη HCV-RNA (Fried και συν. 1992).

Σε μελέτη των Helga και συν. 1995, αναφέρεται ότι καμιά από τις γυναίκες, οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα και μολύνθηκαν από τον HCV, δεν μετέδωσε τον ιό στον σεξουαλικό σύντροφό της. Σε οροεπιδημιολογικές μελέτες ατόμων με σεξουαλική συμπεριφορά κινδύνου, όπως ομοφυλόφιλοι, ιερόδουλες κ.ά. η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15% (Melbye και συν. 1990· Ρουμελιώτου και συν. 1992· Weinstak και συν. 1993). Η συχνότητα της HCV λοίμωξης είναι μεγαλύτερη (7-23%) στους HIV θετικούς ομοφυλόφιλους, επιβεβαιώνοντας ότι η συνύπαρξη HCV και HIV λοίμωξης ευνοεί την διασπορά του HCV.

Η κάθετη (περιγεννητική) μετάδοση του HCV έχει επίσης αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Φαίνεται ότι ο HCV μεταδίδεται κάθετα από την μητέρα στο παιδί σε συχνότητα, που κυμαίνεται στις διάφορες μελέτες από 1-13% (Alter MJ, 1994). Οι απαραίτητες προϋποθέσεις δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Σημαντικό ρόλο παίζει ο τίτλος του HCV-RNA στον ορό της μητέρας και έχει διαπιστωθεί σε μελέτη ότι υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ τίτλων ιαιμίας της

μητέρας και της συχνότητας μετάδοσης του HCV στο νεογνό (ORTHO και συν. 1994). Παιδιά θετικών HCV μητέρων σπάνια εμφανίζουν οροαναστροφή, εκτός αν οι μητέρες είναι συγχρόνως μολυσμένες με τον HIV (Stevens και συν. 1990).

Κάθετη μετάδοση έχει διαπιστωθεί και χωρίς την παρουσία αντι-HCV αντισωμάτων στο νεογνό, το οποίο όμως ήταν HCV-RNA (θετικό) (Tholerum και συν. 1991). Σε ιαπωνική μελέτη 12 από 2.015 μελετηθείσες έγκυες (0,6%) είχαν αντι-HCV αντισώματα και 7 από αυτές ήταν και HCV-RNA θετικές. Τρία (3) από τα παιδιά των γυναικών αυτών (43%) παρουσίασαν HCV-RNA κατά την γέννησή τους, το οποίο εξαλείφθηκε ένα μήνα αργότερα. Δύο (2) από τις 7 αυτές γυναίκες είχαν HCV-RNA στο γάλα και ένα (1) νεογνό, που θήλαζε από το γάλα αυτό εμφάνισε αντι-HCV αντισώματα και HCV-RNA κατά τον 10ο μήνα (Ortho 1994). Το γενικό συμπέρασμα από πολλές οροεπιδημιολογικές μελέτες είναι ότι ο HCV μεταδίδεται από μητέρα στο παιδί σε ποσοστό 4-5%. Η μετάδοση είναι συχνότερη (50%) όταν τα επίπεδα του HCV-RNA στη μητέρα είναι υψηλά (Ortho και συν. 1994). Η περιγεννητική μετάδοση του HCV είναι πολύ πιο περιορισμένη σε σχέση με εκείνη του HBV (Tor και συν. 1990).

Οι ομάδες μεγάλου κινδύνου ηπατίτιδας C και τα ποσοστά ανίχνευσης του αντι-HCV στον τόπο μας φαίνονται παρακάτω (δεδομένα από 11 Ελληνικές δημοσιεύσεις):

Ομάδα	Συγγραφείς	Αντι-HCV (%)
Πολυμεταγγιζόμενοι	Βασιλοπούλου-Καδά και συν.	29.6
	Πολίτη και συν.	37.4
	Κοκκίνη και συν.	38.6
	Γκιώκα και συν.	15.9
Αιμορροφιλικοί	Χατζάκης και συν.	94.3
Χρονίως αιμοκαθαρόμενοι	Λουίζου και συν.	17.3
	Μπολέτης και συν.	23.3
	Κοκκίνη και συν.	25.0
	Ελισάφ και συν.	17.6
Με νεφρική μεταμόσχευση	Μπολέτης και συν.	10.2
Ογκολογικοί ασθενείς	Χατζηγιάννης και συν.	6.1
	Κοκκίνη και συν.	13.8
Ενδοφλέβιοι χρήστες ναρκωτικών	Μαλλιώρη και συν.	81.1
	Νταλέκος και συν.	82.8
Ιερόδουλες	Ρουμελιώτου και συν.	4.9
Ομοφυλόφιλοι (HIV +)	Ρουμελιώτου και συν.	7.8
	Βασιλοπούλου-Καδά και συν.	11 - 23.3
Ομοφυλόφιλοι (HIV -)	Βασιλοπούλου-Καδά και συν.	0.9 - 1.9
	Ρουμελιώτου και συν.	1.3

## ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ηπατίτιδα C αρχικά έδωσε την εντύπωση μιας λοίμωξης με χαμηλή συχνότητα, τόσο στον Ελλαδικό χώρο όσο και παγκοσμίως. Η συχνότητα διαπίστωσης αντι-HCV αντισωμάτων βρέθηκε μικρότερη του 2% και συχνά κάτω του 1% (Χατζηγιάννης ΣΙ, 1992). Όμως, οι πρώτες μελέτες αφορούσαν εθελοντές

αιμοδοτές, δηλαδή επρόκειτο για επιλεγμένη ομάδα και ο έλεγχος αντι-HCV αντισωμάτων γινόταν με ανοσοενζυμικές τεχνικές 1ης γενιάς, (δηλαδή έλεγχος αντι-C<sub>100-3</sub>). Αποτέλεσμα αυτών των δύο παραγόντων ήταν η υποεκτίμηση της συχνότητας της ηπατίτιδας C.

Για την ορθή εκτίμηση του μεγέθους και της σοβαρότητας μιας ιογενούς νόσου, σαν την ηπατίτιδα C, απαραίτητες προϋποθέσεις είναι η ύπαρξη επιπολασμού της, η μελέτη κατάλληλου αντιπροσωπευτικού δείγματος του πληθυσμού και η ύπαρξη δεικτών της οργανικής βλάβης, που προκαλείται από την λοίμωξη.

Στην επιδημιολογική μελέτη της ηπατίτιδας C σαν δείκτης επιπολασμού της λοίμωξης χρησιμοποιήθηκε η διαπίστωση αντι-HCV αντισωμάτων. Ο δείκτης αυτός δεν είναι ο καταλληλότερος διότι η ανεύρεσή του δεν σημαίνει πάντα ιοφορία, δεν ανιχνεύεται σε αρχική φάση οξείας λοίμωξης και δεν συσχετίζεται πάντα με την παρουσία ηπατικής νόσου. Επίσης η διαπίστωσή του συνδέεται με την δυνατότητα ψευδώς θετικών αντιδράσεων.

Με την εφαρμογή ανοσοενζυμικών μεθόδων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς έχουν βελτιωθεί σημαντικά η ευαισθησία και η ειδικότητα διαπίστωσης αντι-HCV αντισωμάτων. Το γεγονός αυτό, όπως και ο έλεγχος και άλλων ομάδων πληθυσμού (πέραν των αιμοδοτών) καθώς και στοιχεία από αναπτυσσόμενες χώρες, οδήγησαν στην αναθεώρηση των αρχικών απόψεων για την HCV λοίμωξη προς το χειρότερο (Χατζηγιάννης ΣΙ, Ηπατίτιδα C, 1994· Δ Τσαντούλας, 1995).

Η συχνότητα της HCV λοίμωξης αυξάνει από τον Βορρά προς τον Νότο και από την Δύση προς την Ανατολή. Πιο συγκεκριμένα, στην Ινδονησία η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων είναι 3,1%, στην Κίνα 2,1%, στις Φιλιππίνες 2,3%, στην Υεμένη 6%, στη Βραζιλία 1,8% (Kiyosawa K, Furuta S, 1993· και Χατζηγιάννης ΣΙ, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη 1994, 11-29). Στην Ιαπωνία και στην Αίγυπτο διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων αυξάνει με την ηλικία (Mishiro S 1993· Kame MA, Kuhns MC, Dewoly Miller F, et al 1993). Στην Ιαπωνία η συνολική συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων είναι 1,1% όμως σε άτομα

άνω των 50 ετών φτάνει και ξεπερνά ίσως το 3% (Kiyosawa K, Sodeyama T, Zanaka E et al 1993). Στο Azahiro, π.χ. μια απομονωμένη περιοχή στην Κεντρική Ιαπωνία, το ποσοστό αντι-HCV αντισωμάτων βρέθηκε 32,4%, ενώ σε άλλες μη ενδημικές περιοχές ήταν 2,3% (Kiyosawa K, Tanaka E, Sodeyama T, Yoshirawa T, et al 1994). Βελονισμός και "κοφτές βεντούζες", μία μέθοδος για την ανακούφιση του μυϊκού πόνου, χωρίς αποστείρωση των εργαλείων, ενοχοποιήθηκαν για αυτό το υψηλό ποσοστό. Στο Βόρειο τμήμα των ΗΠΑ και του Καναδά, η συχνότητα στους αιμοδότες ανέρχεται σε 0,01-0,05%.

Όσον αφορά στην Ευρώπη υπάρχουν χώρες, όπου η συχνότητα των αντι-HCV αντισωμάτων είναι μικρότερη από 0,5%, όπως είναι η Μ. Βρετανία, η Νορβηγία, η Δανία, η Σουηδία, η Φιλανδία και χώρες όπου η συχνότητα κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 1,0% όπως η Ολλανδία, η Γερμανία, η Αυστρία, η Γαλλία και χώρες με συχνότητα πάνω από 1%, όπως η Ουγγαρία και η Γιουγκοσλαβία (Χατζηγιάννης ΣΙ, σε Ηπατίτιδα C, εκδ. Πασχαλίδη, 1994). Σε Ιταλική μελέτη αναφέρεται ότι η συχνότητα ανεύρεσης αντι-HCV αντισωμάτων αυξάνει με την ηλικία (όπως ακριβώς και στην Ιαπωνική μελέτη) και συγκεκριμένα σε ηλικία μικρότερη των 10 ετών είναι 0%, ενώ σε ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών ανέρχεται σε 5% περίπου (Rizzeto M, Esteban R, Weiland C, Trepo C, Seminar on hep., C. Edited by European Commission, Luxemburg 1994, pII-4-3).

Στην Ελλάδα τα ποσοστά στους αιμοδότες κυμαίνονται κάτω του 0,5% (Πολίτη Κ, σε Ηπατίτιδα C, Εκδ. Πασχαλίδη, 1994', Ραπτοπούλου Μ, Ζαραφείδου Ε, Ορφανού Ε, και συν. 1992) και σε ορισμένες περιοχές (π.χ. Θεσσαλονίκη) κάτω του 0,1%. Στον αιμοδοτικό πληθυσμό της Ηπείρου η συχνότητα διαπίστωσης αντι-HCV αντισωμάτων αναφέρεται ότι είναι 0.6% (Ζερβού Ε και συν. 1998). Για τον γενικό πληθυσμό τα στοιχεία είναι περιορισμένα. Συγκεκριμένα στην Κρήτη (περιοχή Σηλαιίου) η συχνότητα των αντι-HCV αντισωμάτων ξεπερνά το 5% (Σουριδάκης Α, Αθανάκης Φ, Κουρούσης Χ, 1994). Τα ίδια περίπου αποτελέσματα (8%) αναφέρονται και για το Κατάκωλο του νομού Ηλείας, (Χατζηγιάννης Σ, Μπράμος Ι, Ρηνιώτης Κ, και συν. Ημερίδα hep.C 1995). Επίσης διαπιστώθηκαν



διαφορές μεταξύ αγροτικού και αστικού πληθυσμού. (Αδημοσίευτα αποτελέσματα Ιολογικού Εργαστηρίου Πανεπιστημίου Κρήτης. Εφαρμοσμένη κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική. Τόμος 10, Τεύχος 4, 1995). Επίσης υψηλή συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων παρατηρήθηκε στους παλινοστούντες από την πρώην Σοβιετική Ένωση (8%) (Σκληρός Ε, Βλάχος Δ, Αργυρόπουλος Θ, 1994).

Στην χώρα μας από την ανάλυση στοιχείων διαφόρων μελετών (Πολίτη Κ, Richardson SC, Καλατζάκης Ι, 1992· Χατζηγιάννης Σ.Ι, 1992· Hatzidimitriou et al, 1993· Noral F, Bachir D, Bernaudin F et al 1993), προκύπτει ότι η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε στρατιώτες αιμοδότες ήταν 0,4%, στους συγγενείς αιμοδοτών 0,28%, και στους τακτικούς εθελοντές αιμοδότες 0,20%. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε άτομα 25 ως 29 ετών και ότι η συχνότητα αντι-HCV στους τακτικούς αιμοδότες είναι εξαιρετικά χαμηλή (Πολίτη Κ, Richardson SC, Καλατζάκης Ι, 1992· Hatzidimitriou et al, 1993).

Η ετήσια συχνότητα της οξείας ηπατίτιδας C αποτελεί σημαντικό δείκτη για την διερεύνηση της πορείας της λοίμωξης σε ένα πληθυσμό, καθώς και δείκτη σοβαρότητας της λοίμωξης αυτής (Χατζηγιάννης ΣΙ, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1995, 14-19). Σύμφωνα με εκτίμηση του CDC (Center for Disease Control) των ΗΠΑ (Alter M, Mast E, 1994), η ετήσια συχνότητα της ηπατίτιδας C στις ΗΠΑ αφού παρέμεινε σταθερή στην 10ετία του 1980, με μέσο όρο 150.000 περιπτώσεις ετησίως, μετά το 1989 παρουσίασε σημαντική πτώση, που οφείλεται κυρίως στην μείωση των περιπτώσεων, που συνδέονται με παρεντερική χρήση ναρκωτικών κύριο παράγοντα κινδύνου στις ΗΠΑ, που ευθύνεται για το 40% των περιπτώσεων. Σε προοπτική μελέτη του NIH το 1992 όπου οι αιματοδότες ελέγχοντο με αντιδραστήρια 2ης γενεάς, η παρακολούθηση 300 ασθενών, που δέχθηκαν μετάγγιση αίματος δεν αποκάλυψε μέχρι το 1996 καμιά περίπτωση ηπατίτιδας. Ο Alter Η (1994), αναφέρει ότι η συχνότητα της οξείας μεταμεταγγισιακής ηπατίτιδας, έχει μειωθεί από 8-10% πριν το 1985 σε 1% το 1994. Η ελάττωση αυτή αποδίδεται αρχικά σαν αποτέλεσμα εντατικοποίησης του

ελέγχου του ιστορικού των αιμοδοτών, κυρίως από τον φόβο του AIDS, και στη συνέχεια από την ανάπτυξη πιο ευαίσθητων τεχνικών για την ανίχνευση φορέων HCV και την υποχρεωτική εισαγωγή τους στις αιμοδοσίες.

Σε παγκόσμια κλίμακα πάνω από πεντακόσια εκατομμύρια άτομα (500.000.000) πάσχουν από HCV λοίμωξη ενώ στην Ελλάδα τα άτομα που πάσχουν από χρόνια λοίμωξη C είναι περίπου 200.000. Τα νεώτερα δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συχνότητα της HCV λοίμωξης είναι όντως πιο μεγάλη από ότι αρχικώς είχε υπολογιστεί (Χατζηγιάννης Σ, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1994, 11-29). Ιδιαίτερη σημασία έχει η διερεύνηση ενδημικών περιοχών, που συνεχώς πληθαίνουν (Χατζηγιάννης Σ, Ηπατίτιδα C, 1995, 14-19).

## **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

### **1. Ανοσοενζυμικές μέθοδοι**

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (Elisa) ανιχνεύουν αντισώματα έναντι αντιγονικών περιοχών που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ιού. Για την ανίχνευση αντι-HCV αντισωμάτων υπάρχουν διαθέσιμες από διάφορους οίκους σειρές αντιδραστηρίων πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Η Elisa δεύτερης γενιάς αποτελεί σήμερα την πρωταρχική εξέταση ρουτίνας για τον έλεγχο αντι-HCV αντισωμάτων.

Τα αντιγόνα, που συμπεριλαμβάνονται στις σειρές των αντιδραστηρίων, προέρχονται από ανασυνδυασμένο HCV αντιγόνο εκφρασμένο σε διάφορους μικροοργανισμούς (E. coli, Yeast). Τα αντιγόνα αυτά είναι καθηλωμένα σε στερεό υποδοχέα (σφαιρίδια πολυστερίνης ή φρεάτια μικροπλακών τιτλοποίησης). Στο καθηλωμένο στην στερεά φάση αντιγόνο προστίθεται αραιωμένο δείγμα του εξεταζόμενου ορού. Αν στο δείγμα υπάρχουν αντισώματα, τότε αυτά συνδέονται με το καθηλωμένο στην στερεά φάση αντιγόνο. Μετά από επώαση και έκπλυση

προστίθεται αντιανθρώπιος αντισφαιρινικός ορός σεσημασμένος με ένζυμο (υπεροξειδάση). Μετά από νέα επώαση και έκπλυση προστίθεται το αντίστοιχο ενζυμικό υπόστρωμα. Εάν η αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος δεν συνοδεύεται αυτόματα από αλλαγή χρώματος, τότε προστίθεται και χρωμογόνο. Ακολουθεί και πάλι επώαση και η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται κατόπιν ορισμένου χρόνου με όξινο ή αλκαλικό διάλυμα ηλεκτρολύτη. Ακολουθεί φωτομέτρηση. Θετικά είναι εκείνα τα δείγματα των οποίων η τιμή της οπτικής πυκνότητας είναι μεγαλύτερη από την τιμή εκείνη, η οποία έχει οριστεί ως ουδός (Ternyck 1988).

Τα αντιδραστήρια πρώτης γενιάς (Elisa-1) ανιχνεύουν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από την NS<sub>4</sub> γονιδιακή περιοχή. Οι δοκιμασίες Elisa πρώτης γενιάς περιέχουν το ανασυνδυσασμένο πεπτίδιο C 100-3, που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που κωδικοποιεί η NS<sub>4</sub> γονιδιακή περιοχή.

Τα αντιδραστήρια της δεύτερης γενιάς (Elisa-2) ανιχνεύουν αντισώματα έναντι τεσσάρων αντιγονικών περιοχών που κωδικοποιούνται από την γονιδιακή περιοχή C καθώς και από τις NS<sub>3</sub> και NS<sub>4</sub> γονιδιακές περιοχές. Τέσσερις ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες των αντιγονικών αυτών περιοχών χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες Elisa δεύτερης γενιάς και αναφέρονται ως C<sub>22</sub>, C<sub>33</sub>, C<sub>100-3</sub>, 5-1-1. Οι δοκιμασίες αυτές είναι πιο ευαίσθητες σε σχέση με τις Elisa πρώτης γενιάς (Alter HJ, 1992) και δίνουν πρωιμότερα θετικά αποτελέσματα.

Οι Contreras και Barbara (1992) αναφέρουν ότι οι μέγιστες απώλειες μη μολυσματικών αιμοδοτών με τα αντιδραστήρια πρώτης γενιάς (Elisa-1) λόγω ψευδοθετικών αντιδράσεων έχει μειωθεί με τα αντιδραστήρια δεύτερης γενιάς (Elisa-2) στο 1:1000 σε αιμοδότες, που αιμοδοτούν για πρώτη φορά και στο 1:9000 σε αιμοδότες, που αιμοδοτούν συχνότερα.

Ο Χατζηγιάννης, (1992) κατόπιν συγκρίσεως αποτελεσμάτων 55.000 αιμοδοτών, από 9 χώρες, διαπίστωσε επιπλέον ότι η σχέση αληθώς θετικών αντιδράσεων Elisa 2/ Elisa 1 είναι 1,6 (δηλ. για κάθε 10 αιμοδότες με αντί-HCV αντισώματα, που ανιχνεύονται με την Elisa-1, αντιστοιχούν έξι ακόμη, που ανιχνεύονται με την Elisa-2).

Τα αντιδραστήρια τρίτης γενιάς (Elisa-3) περιλαμβάνουν την προσθήκη ενός ακόμη ανασυνδυασμένου πεπτιδίου, που αφορά στην πρωτεϊνική περιοχή, που κωδικοποιείται από την NS<sub>5</sub> γονιδιακή περιοχή, και έτσι αυξάνεται ακόμη περισσότερο η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου. Είναι δυνατόν όμως σε ορισμένες περιπτώσεις να περάσουν μέχρι και 6 μήνες από την μόλυνση μέχρι να παραχθούν αντισώματα (μέση περίοδος 12 εβδομάδες). Επίσης οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς ευκαιριακά δύνανται να εμφανίσουν μόλυνση με HCV, χωρίς να αναπτύξουν αντισώματα. Σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτείται εφαρμογή της PCR.

## **2. Δοκιμασία Ανοσοαποτύπωσης**

Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει αντιδραστήρια πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένα αντιγόνα του HCV, εκφρασμένα σε διάφορους φορείς. Τα αντιγόνα αυτά, με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυκρυλαμίδης διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και ακολούθως μεταφέρονται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε φύλλο νιτροκυτταρίνης το οποίο κόβεται σε λωρίδες, οι οποίες επωάζονται με τα προς εξέταση δείγματα, καθώς και με μάρτυρες (θετικό και αρνητικό). Αν στο δείγμα υπάρχουν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνικών αντιγόνων, τα οποία είναι καθηλωμένα στις λωρίδες νιτροκυτταρίνης, συνδέονται με αυτά. Η αντίδραση γίνεται εμφανής με την προσθήκη αντιανθρώπινου αντισφαιρινικού ορού ιχνοθετημένου με ένζυμο, το οποίο μπορεί να προκαλέσει χρωματομετρική αντίδραση μετά την προσθήκη του αντίστοιχου υποστρώματος (Ebeling F, Nau K, Kormen R, Leikola J, 1990· Skidmore S, 1979).

Με τα αντιδραστήρια πρώτης γενιάς ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από την NS<sub>4</sub> γονιδιακή περιοχή. Μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία και η ειδικότητα των αντιδραστηρίων δεύτερης γενιάς με την οποία ελέγχονται αντισώματα έναντι τεσσάρων αντιγονικών περιοχών που κωδικοποιούνται από τις C, NS<sub>3</sub>, NS<sub>4</sub> γονιδιακές περιοχές. Επίσης υπάρχει και ένα

ανθρώπινο αντιγόνο του υπεροξειδίου της δισμουτάσης. Θετικό αποτέλεσμα έχουμε σε περίπτωση αντίδρασης με δύο τουλάχιστο ιϊκά αντιγόνα. Σε περίπτωση αντίδρασης με ένα ιϊκό αντιγόνο, ή με ένα ιϊκό αντιγόνο και το υπεροξειδίο της δισμοντάσης, τότε το αποτέλεσμα θεωρείται αμφίβολο (INDETERMINATED). Η δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιείται ως επιβεβαιωτική δοκιμασία σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Δεν αποτελεί όμως πραγματική επιβεβαιωτική δοκιμασία, διότι και αυτή (όπως και η Elisa-2) χρησιμοποιεί τις ίδιες αντιγονικές περιοχές του ιϊκού γονιδιώματος. Αποφεύγονται όμως τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα όπως επί υπεργαμμασφαιριναιμίας (Ντουράκης Σ, 1993). Πραγματική επιβεβαιωτική μέθοδος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Με τη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης και αντιδραστήρια πρώτης γενιάς επιβεβαιώνεται το 68% των θετικών περιπτώσεων για αντι-HCV, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα αντιδραστήρια δεύτερης γενιάς είναι 89% (Alter HJ, 1992).

Με τα αντιδραστήρια τρίτης γενιάς ανιχνεύονται επιπλέον και αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί η NS<sub>5</sub> γονιδιακή περιοχή, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των αμφίβολων αποτελεσμάτων σε σχέση με τα αντιδραστήρια δεύτερης γενιάς (Γ. Νταλέκος, 1995).

Η θετική αντίδραση αντισώματος έναντι HCV συχνά περιορίζεται σε ένα από τα αντιγόνα του ιού. Τέτοιες περιπτώσεις θεωρούνται αμφίβολες και δύναται να οφείλονται σε μη ειδική σύνδεση των Ig G με τα ιϊκά αντιγόνα. Σε υγιείς αιμοδότες αμφίβολα αποτελέσματα με δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης δεύτερης γενιάς συνήθως σημαίνουν μη ειδική αντίδραση.

### **3. PCR - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Με την δοκιμασία PCR ανιχνεύεται το ιϊκό RNA του HCV (Garson TA, Tedder RS, Briggs M, et al, 1990· Ulrich PP, Romeo JM, Laue PK, 1990).

Αρχικά αποδεσμεύεται το ιϊκό RNA από τις πρωτεΐνες, οι οποίες απομακρύνονται όπως επίσης απομακρύνονται και άλλες οργανικές ενώσεις.

Ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA σε διάλυμα αιθανόλης. Μετά γίνεται η αντίστροφη μεταγραφή του HCV-RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Η RNA εξαρτώμενη DNA-πολυμεράση, συνθέτει την συμπληρωματική DNA-αλυσίδα με εκμαγείο ένα μονόκλωνο RNA. Θεωρητικά για την εκκίνηση της αντίδρασης PCR χρειάζεται ένα εναρκτήριο μόριο DNA.

Στις αλυσίδες (ή αλύσους) DNA προσαρμόζεται ένα ζευγάρι ολιγονουκλεοτίδια, εκκινητές (ή primers), που αποτελούν τα εναρκτήρια μόρια για την δράση της πολυμεράσης. Τα μόρια αυτά είναι συμπληρωματικά στους δύο κλώνους του cDNA του ιού σε κατεύθυνση 5' → 3' και σε απόσταση λίγων εκατοντάδων ζευγών βάσεων μεταξύ τους.

Ακολουθεί διαδοχικά επανάληψη των κύκλων της PCR, για να πάρουμε σε μεγάλη ποσότητα το κομμάτι του DNA ανάμεσα στους δύο εκκινητές της αντίδρασης. Για να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου εφαρμόζεται και δεύτερη PCR, στο προϊόν της πρώτης, με την χρησιμοποίηση ενός ζευγαριού ολιγονουκλεοτιδίων. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τους διαδοχικούς κύκλους για να πάρουμε το τελικό προϊόν, που είναι ένα κομμάτι DNA με αλληλουχία αντίστοιχη της περιοχής του γονιδιώματος του ιού, που έχουμε ενισχύσει. Από μερικά μόρια ιϊκού RNA καταλήγουμε έτσι σε απείρως μεγαλύτερη ποσότητα DNA, το οποίο ανιχνεύεται ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αγαρόζης. Με την ηλεκτροφόρηση έχουμε διαχωρισμό των επιμέρους ζωνών του DNA, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι ζώνες χρωματίζονται με φθορίζουσα χρωστική η οποία δεσμεύεται χημικά από τα πυρηνικά οξέα (Κ. Αυγίδης, 1994).

Η ειδικότητα του προϊόντος της PCR ελέγχεται με μεθόδους μοριακού υβριδισμού, όπως είναι το "Southern blot" (Southern EU, 1975). Με την μέθοδο αυτή, μεταφέρουμε το DNA από την πηκτή αγαρόζης σε νιτροκυτταρίνη και ακολουθεί δοκιμασία μοριακού υβριδισμού με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές-DNA ειδικούς για το γονιδίωμα του ιού. Πρόκειται για μια ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση, του προϊόντος της PCR.

Μια άλλη μέθοδος με την οποία γίνεται ειδική ανίχνευση του προϊόντος της PCR και ποσοτικός προσδιορισμός είναι εκείνη που χρησιμοποιεί microplates, όπου είναι επικολλημένος ο DNA-ανιχνευτής (Mantero G, 1991). Πρόκειται για ανοσοενζυμική μέθοδο κατά την οποία το δίκλωνο DNA ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή και το δείγμα αναγνωρίζεται από μονοκλωνικά αντισώματα. Κατόπιν γίνεται φωτομέτρηση και αναγωγή σε ποσότητα DNA.

Επίσης ποσοτική εκτίμηση του HCV-RNA γίνεται με την ανταγωνιστική ή ποσοτική PCR. Παρασκευάζουμε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων γνωστής ποσότητας HCV-RNA και τις χρησιμοποιούμε ως ποσοτικούς μάρτυρες στην PCR. Τα γνωστά αυτά δείγματα ελέγχονται με τα άγνωστα παράλληλα (οπότε έχουμε εφαρμογή ανταγωνιστικής PCR) και με σύγκριση των προϊόντων επιτρέπεται η ποσοτική εκτίμηση των δειγμάτων (Kaneko et al, 1992).

Άτομα με αντι- HCV αντισώματα επιβεβαιωμένα με RIBA και αντιδραστήρια τρίτης γενιάς και αρνητική HCV-PCR είναι δυνατόν να μην εμφανίζουν ιαιμία μετά από προηγούμενη μόλυνση, ή να εμφανίζουν ιαιμία κάτω από τα επίπεδα διάγνωσης με PCR, ή το αποτέλεσμα των προηγούμενων μεθόδων να είναι ψευδώς θετικό. Αρνητική HCV-PCR σε ασθενείς αντι-HCV θετικούς με RIBA, συσχετίζεται με την απουσία φλεγμονής σε δείγματα βιοψίας ήπατος (Albert A, Morsica G, Chemello L, et al 1992). Σε ασθενείς με ηπατίτιδα C, που υποβάλλονται σε αντιϊκή θεραπεία, HCV-ιαιμία είναι δυνατό να υπάρχει παρόλο που δεν ανιχνεύεται ο ιός με PCR, διότι το RNA ίσως υπάρχει σε επίπεδα μικρότερα από εκείνα που ανιχνεύει η PCR, ή ο ιός βρίσκεται σε άλλα σημεία του οργανισμού και όχι στο αίμα (Δ. Σπαντίδος, 1995).

#### **4. Μέθοδος συνθετικού διακλαδιζόμενου DNA (branched DNA - bDNA)**

Με την επίδραση πρωτεΐνάσης K και απορρυπαντικού, απελευθερώνεται το RNA του ιού, το οποίο παγιδεύεται στην επιφάνεια μιας μικροπλάκας από ειδικά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές, και ακινητοποιείται. Εκεί υβριδίζεται μία

δεύτερη σειρά ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών, που χρησιμεύει για τη σύνδεση του συνθετικού διακλαδιζόμενου DNA. Ακολούθως στο διακλαδιζόμενο DNA υβριδίζονται DNA-ανιχνευτές οι οποίοι είναι σεσημασμένοι με αλκαλική φωσφατόση.

Οι διακλαδώσεις του DNA χρησιμεύουν για να αυξήσουν σημαντικά τις θέσεις σύνδεσης των μορίων, που είναι σεσημασμένα με αλκαλική φωσφατόση. Στο τέλος το σύμπλεγμα επωάζεται με το χημειοφωταυγικό υπόστρωμα διοξετάνη και το παραγόμενο φως μετρίεται σε φωτόμετρο.

Σε κάθε εξέταση εκτός από τα εξεταζόμενα δείγματα χρησιμοποιούνται τέσσερα δείγματα γνωστής περιεκτικότητας σε HCV-RNA και κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βάσει της οποίας υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις HCV-RNA των δειγμάτων. Το κάθε δείγμα εξετάζεται εις διπλούν και αν ο συντελεστής μεταβλητότητας είναι μεγαλύτερος από 20%, η εξέταση επαναλαμβάνεται (Κ Αυγίδης, σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, 1994, εκδόσεις Πασχαλίδη).

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το ότι είναι εύκολη, δεν απαιτείται εξειδίκευση, είναι ταχεία (σε μιάμιση μέρα εξετάζονται 42 ασθενείς), δεν υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης και κυρίως το αποτέλεσμα είναι ποσοτικό. Μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόσμος και η μικρότερη ευαισθησία συγκριτικά με την PCR (350.000 μόρια HCV-RNA/ml έναντι  $10^3$ - $10^4$  μόρια ml με PCR) (Lan T, Davis G, Knijjen T, et al, 1993· Urdea MS, Horn T, Fulty TJ, et al, 1991· Sanchey-Pescador R, Sheridar PJ, Detmer JJ, et al, 1992)

## **5. Ανίχνευση αντιγόνων του HCV**

Η μέτρηση του αντιγόνου HCV στον ορό είναι εξαιρετικά δυσχερής. Είναι δυνατός ο προσδιορισμός HCV αντιγόνων στο ήπαρ με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Τα αντιγόνα HCV στο ήπαρ εμφανίζουν κυτταροπλασματική εντόπιση και το σημαντικότερο αντιγόνο είναι η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί η NS<sub>3</sub> γονιδιακή περιοχή (Krawacy-yanski K, Beach MJ, Braddley DW, et al, 1992).



## ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Η ανάπτυξη ενός ασφαλούς και αποτελεσματικού εμβολίου αποτελεί τον ιδανικό τρόπο προφύλαξης από την HCV λοίμωξη.

Η μεγάλη ετερογένεια του ιού αποτελεί εμπόδιο στην ανάπτυξη ενός τέτοιου εμβολίου. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα στρέφονται εναντίον της περιοχής του περιβλήματος του ιού, στην οποία έχει διαπιστωθεί μεγάλη συχνότητα μεταβολών.

Οι μεταλλάξεις που υφίσταται ο HCV συσχετίζονται με νέα στελέχη ή σχεδόν-στελέχη (*quasi species*) που αποτελούν μορφές διαφυγής (*escape mutations*) του ιού από το ανοσολογικό σύστημα και ευθύνονται για την μακροχρόνια παραμονή του ιού στο περιβάλλον του ξενιστή (Okamoto 1990, Koff 1994). Η ανοσία έναντι ενός *quasi species* ή ενός γονότυπου δεν ισχύει για τους υπόλοιπους.

Σχετικά πρόσφατα ανακοινώθηκε (Houghton M, Choo G-L, Selbay A., 1994) ότι οι χιμπατζήδες, που εμβολιάστηκαν με ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη του περιβλήματος του HCV, ανέπτυξαν αντίσταση στη λοίμωξη από τον HCV και το γεγονός αυτό αποτελεί θετικό βήμα στον τομέα ανάπτυξης εμβολίου.

Η προστατευτική δράση των T-λεμφοκυττάρων δεν φαίνεται πολύ ενθαρρυντική, χωρίς βέβαια να αποκλείεται στο μέλλον κάποια πρόοδος προς την κατεύθυνση αυτή. Η χορήγηση γ σφαιρίνης δεν προφυλάσσει σε περίπτωση παρεντερικής έκθεσης στον HCV (CDC 1991) (Farci et al 1992). Επίσης δεν υπάρχουν δεδομένα πρώιμης θεραπευτικής αγωγής με ιντερφερόνη.

Όπως προαναφέρθηκε ο HCV μεταδίδεται κυρίως παρεντερικά. Η ευρεία χρησιμοποίηση ειδικών δοκιμασιών για την ανίχνευση του ιού και την διαπίστωση αντισωμάτων και η εφαρμογή του υποχρεωτικού ελέγχου των αιμοδοτών αποτέλεσαν ουσιαστικό βήμα στην πρόληψη της νόσου. Τώρα πια γίνεται αυστηρή επιλογή των αιμοδοτών, αποκλείονται οι οροθετικοί δότες και παρέχεται η δυνατότητα επιβεβαίωσης των θετικών αποτελεσμάτων με ειδικές επιβεβαιωτικές

δοκιμασίες. Επίσης έχει θεσπιστεί ο υποχρεωτικός έλεγχος των δοτών μυελού οστών και οργάνων και έτσι περιορίζεται η μετάδοση του ιού με μεταμοσχεύσεις (Alter H, 1994).

Η χρήση ανεπαρκώς αποστειρωμένων βελονών και συρίγγων πολλαπλής χρήσης ή και οι εμβολιασμοί με "πιστολάκια" συνετέλεσαν στην διασπορά του HCV κατά το παρελθόν και ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες (Hadziyannis ST, 1993· Strojzolini T, 1993· Σκληρός E, Βλάχος Δ, Αργυρόπουλος Θ, και συν. 1994). Στις περισσότερες χώρες του κόσμου έχει πια καθιερωθεί η χρησιμοποίηση αποστειρωμένων συρίγγων και βελονών μιας χρήσης, πράγμα το οποίο ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μετάδοσης του HCV με αυτόν τον τρόπο.

Η χρησιμοποίηση γαντιών ελαττώνει τον κίνδυνο μετάδοσης από νυγμό βελόνης. Σε ένα εργαστηριακό πειραματικό μοντέλο αποδείχτηκε ότι βελόνες που διέρχονται δια μέσω γαντιών μεταφέρουν 50% μικρότερη ποσότητα αίματος, από εκείνη, που θα μεταφερόταν χωρίς γάντια. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρήθηκε ανεξάρτητα από το υλικό, από το οποίο ήταν φτιαγμένα τα γάντια (Mast and Gerbening 1991). Βέβαια συνιστάται πάνω από όλα οι οποιοδήποτε χειρισμοί, που γίνονται από το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό, να γίνονται με ηρεμία και ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να αποφεύγονται τα ατυχή συμβάντα.

Αναφέρονται 7 περιπτώσεις αδελφών νοσοκόμων, που τρυπήθηκαν με βελόνη χρησιμοποιηθείσα σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Σε καμία δεν αναπτύχθηκε οξεία λοίμωξη από τον HCV, ούτε αργότερα εμφανίστηκαν αντι-HCV αντισώματα ή HCV-RNA (Homma S, 1994).

Επίσης σπανιότατα είναι δυνατόν κάποιος ασθενής να μολυνθεί με την χρήση μολυσμένων εργαλείων ή με αίμα από οροθετικό ιατρό ή νοσηλεύτη. Τέτοια ατυχή συμβάντα (άγνωστη παραμένει η συχνότητά τους) είναι εξαιρετικά σπάνια, δεδομένου ότι το ιατρικό και παραϊατρικό λαμβάνει όλες τις δυνατές προφυλάξεις.

Όσον αφορά στη σεξουαλική μετάδοση, συμβάλλουν τα επίπεδα HCV-RNA στο αίμα, καθώς και η συχνότητα και η χρονική διάρκεια των επαφών. Όπως αναφέρουν οι Garbielli C, Zannini A, Corradini A, Gafa S, 1994, αυτή δεν

αποτελεί κύριο τρόπο μετάδοσης του HCV. Η ενδοοικογενειακή μετάδοση είναι ελάχιστη ως ανύπαρκτη.

## **ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Στόχο της θεραπευτικής προσπάθειας για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C αποτελούν η εκκρίωση του ιού, η μείωση της νοσηρότητας, η μεγαλύτερη επιβίωση, η εξάλειψη της μολυσματικότητας, η αποκατάσταση της ηπατικής βλάβης και η αναστολή της εξέλιξης.

Οι πρώτες προσπάθειες για την θεραπεία της NANB ηπατίτιδας βασίστηκαν στην ήδη υπάρχουσα εμπειρία, από την θεραπεία άλλων μορφών ηπατίτιδας. Έτσι, δοκιμάστηκαν η χορήγηση κορτιζόνης, αντιϊκών φαρμάκων και ιντερφερόνης (IFN). Τελικά διαπιστώθηκε ότι τόσο η κορτιζόνη όσο και τα αντιϊκά φάρμακα (π.χ. acyclovir) είχαν αρνητικό αποτέλεσμα (Realdi και συν. 1982' Hoofnagle 1982' Pappas και συν. 1985). Η χρήση της IFN όμως αποδείχθηκε ενθαρρυντική. Σε 8 από 10 περιπτώσεις χρόνιας NANB ηπατίτιδας που χορηγήθηκε, παρατηρήθηκε σημαντική ιστολογική και βιοχημική βελτίωση (Hoofnagle και συν. 1986). Η παρατήρηση αυτή προκάλεσε έντονο ενδιαφέρον και αποτέλεσε το ερέθισμα για πολλές προοπτικές κλινικές μελέτες (Davis 1990). Οι περισσότεροι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν σ' αυτές τις μελέτες ήταν αντι-HCV θετικοί (70-90%) (Trepo και συν. 1992). Σήμερα η θεραπευτική εκτίμηση της IFN γίνεται σε ασθενείς με αντι-HCV αντισώματα και θετικό HCV-RNA, δηλαδή σε τεκμηριωμένη χρόνια λοίμωξη.

Θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας C συνιστάται κυρίως σε ασθενείς που παρουσιάζουν ιστολογικώς φλεγμονή με ή χωρίς ίνωση, μόνιμα αυξημένες αμινοτρανσφεράσες και ανιχνεύσιμα επίπεδα ιαιμίας. Μόνο ασθενείς με αντιρροπούμενη κίρρωση μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία. Επίσης, αποκλείονται από τη θεραπεία οι ασθενείς που κάνουν κατάχρηση αιθυλικής αλκοόλης ή χρήση ενδοφλεβίων τοξικών ουσιών.

Μέχρι πρόσφατα, η μόνη εγκεκριμένη μορφή θεραπείας για την αντιμετώπιση της HCV λοίμωξης ήταν η ιντερφερόνη-α (IFN-α), (Linday K.L., 1997), η οποία παρουσιάζει αντιική (ενίσχυση της αποδόμησης του ενδοκυττάριου HCV-RNA και αναστολή της μετάφρασής του) και ανοσοτροποποιητική δράση (αύξηση της έκφρασης των αντιγόνων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (τάξη I) στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και ενίσχυση της δράσης της ιντερλευκίνης-2).

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με IFN-α καθορίζεται με βάση την ανταπόκριση των αμινοτρανσφερασών (βιοχημική) και της ιαιμίας (ιολογική) και τη βελτίωση της ιστολογίας του ήπατος (ιστολογική). Η απουσία ιαιμίας κατά το τέλος της θεραπείας χαρακτηρίζεται ως πλήρης ανταπόκριση, ενώ εάν αυτή συνεχισθεί και μετά από 6 μήνες ως μόνιμη (παρατεταμένη) ανταπόκριση. Η μόνιμη ανταπόκριση αποτελεί το στόχο της θεραπείας, αφού δεν ακολουθείται από υποτροπές και συνδέεται με μακροχρόνια απουσία ιαιμίας, σημαντική ιστολογική βελτίωση και εξαφάνιση των ενδοηπατικών μορφών του ιικού πολλαπλασιασμού (Mecellin P. 1997). Πιθανόν να εκφράζει ίαση από τη χρόνια HCV λοίμωξη. Με τη χορήγηση 3ΜU IFN-α υποδορίως, 3 φορές την εβδομάδα για 12 μήνες, το ποσοστό πλήρους ανταπόκρισης κυμαίνεται στο 40-50%, ενώ της μόνιμης στο 15-20% των ασθενών.

Η ριμπαβιρίνη είναι νουκλεοσιδικό ανάλογο της γουανίνης που παρουσιάζει δράση έναντι ποικίλων DNA και RNA ιών (ιός αναπνευστικού συγκυτίου, ιός πυρετού Lassa, Hanta -ιοί κ.λ.π.) συμπεριλαμβανομένων και των ιών της οικογένειας των flaviviridae. Η ριμπαβιρίνη παρουσιάζει ανοσοτροποποιητική δράση,. Η χορήγηση ριμπαβιρίνης στη χρόνια HCV λοίμωξη προκαλεί βιοχημική ανταπόκριση, αλλά όχι ιολογική ή ιστολογική.

Η ριμπαβιρίνη παρουσιάζει συνεργατική δράση με την IFN-α αυξάνοντας το ποσοστό της μόνιμης ανταπόκρισης κατά 2-3 περίπου φορές. Σε πρωτοθεραπευόμενους, η χορήγηση του συνδυασμού IFN-α (3ΜU, 3 φορές την εβδομάδα υποδορίως) και ριμπαβιρίνης (1000 mg σε ασθενείς με σωματικό βάρος

≤ 75 kg ή 1200 mg σε ασθενείς με σωματικό βάρος >75 kg, σε δύο δόσεις, κάψουλες Rebatol των 200 mg σε κουτιά των 168 τεμαχίων), για διάστημα 24 και 48 εβδομάδων, είχε ως αποτέλεσμα μόνιμη ανταπόκριση σε ποσοστό 33% και 41% αντιστοίχως και ιστολογική στο 61% (έναντι 6%, 16% και 41% με μονοθεραπεία) (Mc Huctchison SC, 1998 & Roynard T. 1998). Ο γονότυπος 1 ανταποκρίνεται λιγότερο ικανοποιητικά και απαιτεί αγωγή 12 μηνών (μόνιμη ανταπόκριση 30%). Οι γονότυποι 2 και 3 ανταποκρίνονται στη θεραπεία καλύτερα, χωρίς να παρουσιάζεται διαφορά μεταξύ 6 και 12 μηνών θεραπείας (μόνιμη ανταπόκριση 65%).

Σε ασθενείς που υποτροπίασαν μετά από θεραπεία με IFN-α, η χορήγηση συνδυασμού με IFN-α και ριμπαβίνης για 6 μήνες έδωσε μόνιμη ανταπόκριση στο 49%, έναντι 5% της επανάληψης της θεραπείας με IFN-α. Επί αντένδειξης χορήγησης συνδυασμένης αγωγής, μπορεί να χορηγηθεί IFN-α σε δόση μεγαλύτερη των 3 MU, 3 φορές την εβδομάδα, για 12 μήνες.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της IFN-α διακρίνονται σε πρώιμες (πυρετός, κακουχία, μυαλγίες, κεφαλαλγία, ναυτία) και υποχωρούν με τη συνέχιση της αγωγής και τη χορήγηση ακεταμινοφαίνης ή και ινδομεθακίνης και σε καθυστερημένες (αλωπεκία, κατάθλιψη, δυσχέρεια συγκέντρωσης, ευερεθιστότητα). Σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες της IFN-α είναι οι λοιμώξεις (λόγω λευκοπενίας) και η ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων. Απόλυτες αντενδείξεις χορήγησης IFN-α αποτελούν οι σοβαρές ανεξέλεγκτες ψυχικές διαταραχές (ψυχωσική συνδρομή ή σοβαρή καταθλιπτική συνδρομή), η ουδετεροπενία και θρομβοπενία, η μεταμόσχευση οργάνου (εκτός του ήπατος), η καρδιακή ανεπάρκεια και οι επιληπτικοί σπασμοί. Σχετικές αντενδείξεις αποτελούν ο αρρυθμιστικός σακχαρώδης διαβήτης και οι αυτοάνοσες διαταραχές (π.χ. θυρεοειδίτιδα Hashimoto). Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες της ριμπαβιρίνης είναι η αναστρέψιμη αιμόλυση και η τερατογόνος δράση, ενώ οι άλλες είναι ήπιες (εξάνθημα, κνησμός βήχας, δύσπνοια, αϋπνία, ανορεξία). Απόλυτες αντενδείξεις χορήγησης ριμπαβιρίνης αποτελούν η νεφρική ανεπάρκεια (λόγω του κινδύνου

βαριάς αιμόλυσης από την ενδοερυθροκυτταρική συσσώρευση του φαρμάκου), η αναιμία, η στεφανιαία νόσος, η καρδιακή ανεπάρκεια και η κύηση. Η αιμοσφαιρίνη μειώνεται κατά 2-3 g/dL στις πρώτες 4-8 εβδομάδες θεραπείας. Όταν μειωθεί σε επίπεδα <10 g/dL χρειάζεται μείωση της δόσης της ριμπαβιρίνης.

Ο συνδυασμός IFN-α και ριμπαβιρίνης αποτελεί μία αποδεκτή και οικονομικά συμφέρουσα σύγχρονη θεραπεία της χρόνιας HCV λοίμωξης. Αρχικά προσδιορίζεται ο γονότυπος του ιού για να καθοριστεί η διάρκεια της θεραπείας και η παρακολούθηση περιλαμβάνει έλεγχο της αιμοσφαιρίνης και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων.

Σήμερα, για την θεραπεία των ασθενών με χρόνια ιογενή ηπατίτιδα C, χορηγείται και η πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α-2b σε μονοθεραπεία, ή σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνονται τα μέγιστα θεραπευτικά αποτελέσματα με ασφάλεια (Dhumeaux D, Doffel M, και συν, 1997· Mans M και συν, 2001).

Καλοί προγνωστικοί δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία είναι η μικρή ηλικία, η σχετικά πρόσφατη λοίμωξη, η ήπια βιοχημική και ιστολογική δραστηριότητα, το κανονικό σωματικό βάρος, τα χαμηλά επίπεδα HCV-RNA στον ορό, η μειωμένη ποσότητα HCV αντιγόνου στο ήπαρ, και η απουσία αυξημένου ηπατικού σιδήρου. Κακοί προγνωστικοί δείκτες είναι ο γονότυπος 1 και η γονοτυπική πολυμορφία του στελέχους που προκάλεσε την λοίμωξη (Camma S και συν, 1992· Yoshika και συν, 1992· Lay Lyn και συν 1993).

Στις πρόσφατες μελέτες γύρω από τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C, προστέθηκε στους ήδη γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες ανταπόκρισης μια νέα παράμετρος, η 80/80/80. Η παράμετρος αυτή βασίζεται στην απλή αρχή, ότι οι ασθενείς που στο τέλος της θεραπείας τους έχουν λάβει το 80% της ιντερφερόνης, το 80% της ριμπαβιρίνης και τα δύο για το 80% του συνολικού προβλεπόμενου χρόνου θεραπείας, αποτελούν μια ομάδα προς αξιολόγηση και οι υπόλοιποι ασθενείς διαφορετική ομάδα (Mc Hutchison JG, 2000).

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας υπήρξε η μελέτη της μεταμεταγγισιακής μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C σε μία ομάδα ατόμων που είχαν υποβληθεί σε πολλαπλές μεταγγίσεις αίματος πριν καθιερωθεί ο υποχρεωτικός έλεγχος των αιμοδοτών για αντι-HCV αντισώματα (1991).

Η εργασία αυτή μου ανατέθηκε από τον τότε Διευθυντή του Παν/κού Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Καθηγητή κ.Γ. Αντωνιάδη, με την προοπτική τα αποτελέσματά της να χρησιμοποιηθούν αφενός μεν άμεσα για την εκτίμηση του μεγέθους του κινδύνου μεταμεταγγισιακής μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C στη χώρα μας, αφετέρου δε μελλοντικά για την αξιολόγηση της συμβολής του προληπτικού ελέγχου των αιμοδοτών στον αναμενόμενο περιορισμό της.

## **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Για την διαπίστωση αντι-HCV αντισωμάτων εξετάσθηκαν συνολικά 270 δείγματα ορών ατόμων και των δύο φύλων, ηλικίας από 1 μηνός μέχρι 40 ετών. Τα άτομα αυτά έπασχαν από ομόζυγη β-θαλασσαιμία και ως εκ τούτου είχαν υποβληθεί σε πολλαπλές μεταγγίσεις.

Τα ίδια δείγματα εξετάσθηκαν και για την παρουσία HBsAg και αντι-HBc αντισωμάτων, ώστε κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού αντι-HCV αντισωμάτων για την εκτίμηση του μεγέθους του κινδύνου μεταμεταγγισιακής μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C να υπάρχουν παράλληλα συγκριτικά στοιχεία αναφορικά με την ηπατίτιδα Β η οποία έχει μελετηθεί εκτενέστερα.

Τα δείγματα των ορών ελήφθησαν στα πλαίσια μιας άλλης οροεπιδημιολογικής έρευνας το 1986, διαμοιράστηκαν σε περισσότερα σωληνάρια erpendorf και διατηρήθηκαν μέχρι την εξέτασή τους στους  $-30^{\circ}$  C χωρίς να υποβληθούν ενδιάμεσως σε απόψυξη.

Οι προσδιορισμοί των αντι-HCV αντισωμάτων έγιναν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, και αντιδραστήρια δεύτερης γενιάς του οίκου ABBOTT. Τα ELISA θετικά δείγματα ελέγχθηκαν με τη συμπληρωματική δοκιμασία EIA supplemental assay και όσα μετά από αυτή τη δοκιμασία ήταν θετικά ελέγχθηκαν για την



επιβεβαίωση του θετικού αποτελέσματος με τις δοκιμασίες RIBA δεύτερης γενιάς του οίκου Chiron και Western blot τρίτης γενιάς του οίκου Murex. Οι προσδιορισμοί HBsAg και αντι-HBc αντισωμάτων έγιναν επίσης με τη μέθοδο ELISA και αντιδραστήρια του οίκου ABBOTT.

## **ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

### **A. ELISA 2<sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ ΜΕ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΚΑΘΗΛΩΜΕΝΟ ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΠΟΛΥΣΤΕΡΙΝΗΣ**

Για τον προσδιορισμό αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C χρησιμοποιήθηκε η σειρά έτοιμων τυποποιημένων αντιδραστηρίων Abbott HCV EIA 2<sup>nd</sup> Generation του Οίκου ABBOTT, σύμφωνα με τις ένθετες οδηγίες του κατασκευαστή.

#### **1) Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εξής αρχή.

Αραιωμένα, με ειδικό αραιωτικό, δείγματα ορού επωάζονται με σφαιρίδια πολυστερίνης στα οποία έχει καθηλωθεί αντιγόνο προερχόμενο από ανασυνδυσασμένο DNA του HCV εκφρασμένο σε E.coli. Αν στο προς εξέταση δείγμα υπάρχουν αντισώματα αυτά συνδέονται με το προσηλωμένο στα σφαιρίδια αντιγόνο. Μετά από απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου υλικού και έκπλυση των σφαιριδίων, τα ειδικά αντισώματα παραμένουν συνδεδεμένα στα σφαιρίδια και

ανιχνεύονται μετά από επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισωμάτων, που παραμένει προσηλωμένο στην επιφάνεια των σφαιριδίων με διάλυμα που περιέχει αντισώματα αιγός έναντι ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης (conjugate) σεσημασμένα με υπεροξειδάση. Επί θετικής αντίδρασης τα σεσημασμένα με υπεροξειδάση αντισώματα αιγός συνδέονται με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισωμάτων στην επιφάνεια των σφαιριδίων. Μετά από απομάκρυνση του μη προσκολληθέντος υλικού και έκπλυση των σφαιριδίων, ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμικού υποστρώματος ( $H_2O_2$ ) και δείκτη ( $O$ -PD). Μετά από ορισμένο χρόνο επώασης η αντίδραση σταματά με την προσθήκη θειϊκού οξέος. Επί θετικής αντίδρασης εμφανίζεται κίτρινο χρώμα η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με το ποσό των αντι-HCV αντισωμάτων. Η εκτίμηση της έντασης του χρώματος γίνεται φωτομετρικώς.

## **2) Υλικό και όργανα**

Με κάθε σειρά αντιδραστηρίων παρέχεται από τον οίκο Abbott, το παρακάτω αναλώσιμο υλικό: 5 ή 2 πλαστικές πλάκες αντίδρασης (Reaction trays) των 20 ή 60 βυθισμάτων κατά πλάκα αντίστοιχα, αυτοκόλλητα καλύμματα για τις πλάκες και πολυστερινικά σωληνάρια 12x75 mm σε ειδική συσκευασία, ώστε να είναι δυνατή η εύκολη μεταφορά των σφαιριδίων από τις πλάκες αντίδρασης σ' αυτά. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (Varipipette 10-100 μl και 100-1000 μl, erpendorf), καθώς και πλαστικά ρύγγη μιας χρήσης κίτρινα 10-100 μl και μπλε 101-1000 μl (No 0030000.004 και No 0030015.002, erpendorf). Επίσης πιπέττα πολλαπλής διανομής (multipipette) για την ισόποση κατανομή των διαφόρων αντιδραστηρίων (No 4780, erpendorf) και πλαστικές σύριγγες διανομής αντιδραστηρίων (combitips) των 2,5, 5, 50 ml (No 0030048.016, 0030048.067 και 003048.15 erpendorf). Διανεμητής σφαιριδίων (Single bead dispenser No 6155-20 Abbott). Αναδευτήρας Vortex (Genie 2 του οίκου Scientific Industries, INC) για την ανάδευση δειγμάτων και αντιδραστηρίων.

Υδατόλουτρο με θερμοστάτη (Wasserbad memmert W 700) για την επώαση πλακών αντίδρασης σε θερμοκρασία  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Χειροκίνητο σύστημα έκπλυσης των σφαιριδίων στα βυθίσματα των πλακών αντίδρασης (Pentawash, Abbott), το οποίο αποτελείται από αντλία κενού (Vaccubrand, Typ ME<sub>2</sub>), αντλία νερού, (Heidolph-Dispensing Pump MP 24, Heidolph-Electro Gm bH και CO.KG) πενταθέσιο βραχίονα (Pentawash II No 6118 Abbott) και δυο φιάλες κενού των 2 λίτρων.

Για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε διχρωματικό φωτόμετρο Abbott Quantum II με ενσωματωμένο υπολογιστή και εκτυπωτή, (Module A., List No 4045-94, Mode 1.24).

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία  $4^\circ\text{C}$  και καταψύκτες  $-20^\circ\text{C}$  και  $-30^\circ\text{C}$  για την διατήρηση των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων ορών. Φυγόκεντροι για την λήψη ορού από τα δείγματα αίματος, επιτραπέζια χρονόμετρα για την μέτρηση του χρόνου επώασης, συσκευές παροχής απεσταγμένου και απιονισμένου ύδατος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση των σφαιριδίων.

Σιφώνια ογκομετρικοί κύλινδροι κι άλλα γυάλινα σκεύη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των προσδιορισμών δεν αναφέρονται ξεχωριστά, διότι αποτελούν βασικό εξοπλισμό για κάθε ορολογικό εργαστήριο και δεν χρησιμοποιούνται ειδικά για την εκτέλεση αυτών των προσδιορισμών.

### **3) Αντιδραστήρια**

Η σειρά των έτοιμων τυποποιημένων αντιδραστηρίων περιέχει τα εξής:

- 1) 100 σφαιρίδια πολυστερίνης με προσροφημένο στην επιφάνειά τους HCV-αντιγόνο.
- 2) 3 φιαλίδια του 1 mL το καθένα, συμπυκνωμένου ενζυμικού συζεύγματος (conjugate concetrate): Ρυθμιστικό διάλυμα Tris με αντιμικροβιακές ουσίες (0,01% Gentamycin, 0.01% Thimerosae), που περιέχει αντισώματα έναντι ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G σε ελάχιστη συγκέντρωση 0.02  $\mu\text{g/mL}$ , συνδεδεμένα με υπεροξειδάση.

- 3) 3 φιαλίδια των 19 mL το καθένα, διαλύματος αραιωτικού για το ενζυμικό σύζευγμα (conjugate diluent), που περιέχει ορό βοδιού και αιγός και αντιμικροβιακές ουσίες.
- 4) 1 φιαλίδιο των 2 mL θετικού μάρτυρα. Αδρανοποιημένο πλάσμα ανθρώπου με αντισώματα έναντι του HCV με ελάχιστο τίτλο 1:2 και αντιμικροβιακές ουσίες.
- 5) 1 φιαλίδιο των 2 mL αρνητικού μάρτυρα. Αδρανοποιημένο πλάσμα ανθρώπου αρνητικό για αντι-HCV αντισώματα με αντιμικροβιακές ουσίες.
- 6) 2 φιαλίδια των 20 mL το καθένα, αραιωτικού διαλύματος για τα δείγματα των ορών. Διάλυμα Tris, που περιέχει ορό βοδιού και αιγός σε ελάχιστη συγκέντρωση 1%, και 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
- 7) 1 φιάλη με 10 δισκία OPD (ορθοφαινολενοδιαμίνη 2HCl). Δισκία με 12.8 mg OPD/δισκίο.
- 8) 1 φιάλη των 55 mL διαλυτικού για τα δισκία OPD. Κιτρικοφωσφορικό διάλυμα, που περιέχει 0,2% υπεροξείδιο του υδρογόνου. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 1N θειικού οξέως το οποίο παρέχεται από τον οίκο με κάθε σειρά αντιδραστηρίων (φιάλη 110 mL).

Η φύλαξη των αντιδραστηρίων έγινε σε θερμοκρασία 4-8°C (μέχρι την ημερομηνία λήξεώς τους) και πριν την χρησιμοποίησή του ετίθεντο σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **4. Τεχνική εκτέλεσης των προσδιορισμών**

Πρωταρχικά συμπληρωνόταν ειδικό πρωτόκολλο, σύμφωνα με το οποίο καθοριζόταν η σειρά του θετικού μάρτυρα (X3), του αρνητικού μάρτυρα (X2) και των προς εξέταση ορών. Κατόπιν εγένετο διανομή 10 μl μαρτύρων και δειγμάτων των προς εξέταση ορών σε σωληνάρια πολυστερίνης και προστίθεντο 400 μl αραιωτικού διαλύματος. Μετά από ελαφρά ανακίνηση μεταφερόταν 200 μl μαρτύρων και δειγμάτων στα βυθίσματα των πλακών αντίδρασης, έτσι ώστε στα τρία πρώτα βυθίσματα να υπάρχει αραιωμένος ο θετικός μάρτυρας, στα επόμενα δύο ο αρνητικός μάρτυρας και στα υπόλοιπα τα προς εξέταση δείγματα, σύμφωνα

με το πρωτόκολλο, που συντάχθηκε αρχικά. Ακολούθως διανέμετο από ένα σφαιρίδιο πολυστερίνης σε κάθε βύθισμα της πλάκας αντίδρασης.

Μετά από εφαρμογή αυτοκόλλητου καλύμματος και ελαφριά ανακίνηση, οι πλάκες τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο 40°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) για μία ώρα ( $\pm 5$  λεπτά) (πρώτη επώαση). Κατά την διάρκεια της επώασης παρασκευαζόταν η αραιώση του ενζυμικού συζεύγματος (conjugate). Το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου του συμπυκνωμένου συζεύγματος αδειάζονταν στο φιαλίδιο του αντίστοιχου αραιωτικού διαλύματος και αναμιγνύετο με ελαφρά ανάδευση. Το αραιωμένο πιασ ενζυμικό υποστρώμα ήταν έτοιμο για χρήση, αφού πρώτα αφιέτο σε θερμοκρασία δωματίου για 30' -60' λεπτά.

Μετά το τέλος της πρώτης επώασης απομακρυνόταν από κάθε πλάκα το αυτοκόλλητο κάλυμμα, ακολουθούσε έκπλυση κάθε σφαιριδίου με 5,0 ml απιονισμένου ύδατος επί 3 φορές με το Pentawash. Μετά επροστίθεντο 200 μl αραιωμένου ενζυμικού συμπλέγματος σε κάθε βύθισμα της πλάκας, που έχει σφαιρίδια. Ακολουθούσε επικάλυψη με αυτοκόλλητη ταινία, ελαφρά ανακίνηση των πλακών αντίδρασης και τοποθέτησή τους στο υδατόλουτρο στους 40°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) για 30' λεπτά ( $\pm 2$  λεπτά) (δεύτερη επώαση).

Δέκα (10') λεπτά πριν από το τέλος της δεύτερης επώασης παρασκευαζόταν η απαραίτητη ποσότητα διαλύματος χρωμογόνου-ενζυμικού υποστρώματος (για 100 εξεταστέα δείγματα, 35 ml). Εγένετο χρήση 7 δισκίων OPD, τα οποία διαλυόταν σε 35 ml διαλυτικού και ακολουθούσε ανάδευση στο Vortex. Το διάλυμα χρησιμοποιείτο μέσα σε μία (1) ώρα από την στιγμή της παρασκευής του και η φύλαξή του γινόταν σε σκούρα πλαστική φιάλη.

Μετά τη δεύτερη επώαση ακολουθούσε νέα έκπλυση των σφαιριδίων, όπως προαναφέρθηκε (αφού προηγουμένως αφαιρείτο η αυτοκόλλητη ταινία). Ακολούθως γινόταν η μεταφορά των σφαιριδίων στον πυθμένα σωληναρίων, τα οποία ήταν ειδικά συσκευασμένα και αντίστοιχα αριθμημένα. Η μεταφορά επιτυγχάνετο με ανάστροφη τοποθέτηση των σωληναρίων, ώστε τα στόμιά τους να εφαρμόζουν ακριβώς στα αντίστοιχα βυθίσματα. Ακολουθούσε αναστροφή της

πλάκας και τα σφαιρίδια έπεφταν στον πυθμένα των σωληναρίων και προστίθεντο 300 μl διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος σε κάθε σωληνάριο, που περιείχε σφαιρίδιο, καθώς και σε δύο κενά τα οποία χρησιμοποιούνταν ως τυφλά (Blank) για την ρύθμιση της τιμής μηδέν (0) στο φωτόμετρο. Εν συνεχεία γινόταν επικάλυψη των σωληναρίων και τοποθέτησή τους για 30' λεπτά ( $\pm 2'$ ) σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά σε σκοτεινό χώρο. Μετά από την επώαση (ακριβώς 30 λεπτά από την αρχή της) προστίθετο 1,0 ml 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε όλα τα σωληνάρια. Ακολουθούσε ανάδευση των σωληναρίων στο Vortex και μετά γινόταν η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο φωτόμετρο Quantum II και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, η οποία πρέπει να γίνεται το πολύ μέσα σε δύο ώρες μετά την προσθήκη του 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων γινόταν με το Qautum II, το οποίο έχει ενσωματωμένο ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή, ο οποίος τύπωνε απευθείας τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Δείγματα με τιμές οπτικής πυκνότητας μικρότερες της τιμής που είχε οριστεί ως ουδός (Cutoff value) χαρακτηρίζοντο ως αρνητικά. Δείγματα με τιμές μεγαλύτερες ή ίσες της τιμής του ουδού χαρακτηρίζοντο αρχικά ως θετικά. Ο ουδός (cutoff value) προκύπτει από την μέση απορρόφηση των αρνητικών μαρτύρων συν 0.25 της μέσης απορρόφησης των θετικών μαρτύρων. Η διαφορά μεταξύ της μέσης απορρόφησης των θετικών και αρνητικών μαρτύρων πρέπει να είναι 0.400 ή μεγαλύτερη. Αν δεν συμβαίνει αυτό θα πρέπει να γίνει επανεξέταση των δειγμάτων. Αν η διαφορά είναι πολύ μικρή, τότε τίθεται η υποψία, πιθανής ακαταλληλότητας των αντιδραστηρίων.

Τα θετικά δείγματα ελέγχθηκαν με την συμπληρωματική δοκιμασία EIASupplemental assay και όσα και μετά από αυτή την δοκιμασία ήταν θετικά, επιβεβαιώθηκαν με τις μεθόδους RIBA 2<sup>ης</sup> γενιάς και Western blott 3<sup>ης</sup> γενιάς.

## **B. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ (Abbott supplemental assay)**

Χρησιμοποιήθηκε η σειρά έτοιμων αντιδραστηρίων Abbott HCV EIA Supplemental assay του οίκου Abbott. Πρόκειται για μια διαδικασία όμοια με την προηγούμενη με την διαφορά ότι διεξάγεται χωριστά η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από την γονιδιακή περιοχή core, και των πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από τις γονιδιακές περιοχές NS<sub>2</sub>, NS<sub>3</sub> και NS<sub>4</sub>. Γι' αυτό χρησιμοποιούνται δυο διαφορετικά συστήματα.

### **1) Αρχή της μεθόδου**

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης αντισωμάτων. Στο ένα σύστημα σφαιρίδια πολυστερίνης στην επιφάνεια των οποίων έχει προσροφηθεί δομικό αντιγόνο core ανασυνδισμένο DNA του ιού, εκφρασμένο σε E.coli, επωάζονται με αραιωμένα δείγματα ορών και κατάλληλων μαρτύρων. Στο δεύτερο σύστημα σφαιρίδια πολυστερίνης στα οποία έχουν προσροφηθεί μη δομικά αντιγόνα προερχόμενα από ανασυνδισμένο DNA του ιού, εκφρασμένο σε E.coli επωάζονται με τα ίδια δείγματα των αραιωμένων ορών και των κατάλληλων μαρτύρων. Αν στο δείγμα υπάρχουν αντισώματα έναντι των δομικών ή μη δομικών αντιγόνων του ιού, αυτά κατά την διάρκεια της επώασης προσηλώνονται στα αντίστοιχα σφαιρίδια. Μετά την απομάκρυνση του μη προσηλωθέντος υλικού και έκπλυση των σφαιριδίων, αυτά επωάζονται εκ νέου με ενζυμικό σύζευγμα, το οποίο περιέχει αντισώματα έναντι ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G, ιχνοθετημένα με υπεροξειδάση. Το ενζυμικό σύζευγμα, προσηλώνεται στο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (επί παρουσίας αντισωμάτων) και ακολουθεί απομάκρυνση του μη προσηλωθέντος υλικού και έκπλυση σφαιριδίων. Στην συνέχεια προστίθεται στα σφαιρίδια διάλυμα που περιέχει υπόστρωμα ενζύμου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και χρωμογόνο (ορθοφαινουλενοδιαμίνη). Μετά από επώαση επί θετικής αντίδρασης ακολουθεί ενζυμική διάσπαση του υποστρώματος, που συνοδεύεται από παραγωγή πορτοκαλί χρώματος, η ένταση



του οποίου εξαρτάται από το ποσό των αντισωμάτων έναντι του ιού. Η ενζυμική αντίδραση σταματά μετά από 30 min με την προσθήκη διαλύματος 1N θειϊκού οξέος. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε φωτόμετρο Quantum II σε μήκος κύματος 492 nm.

## **2) Υλικό και όργανα**

Χρησιμοποιούνται ακριβώς τα ίδια, όπως και στην προηγούμενη δοκιμασία.

## **3) Αντιδραστήρια**

Η σειρά περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:

- α) 50 σφαιρίδια πολυστερίνης με καθηλωμένο στην επιφάνειά τους HCV δομικό αντιγόνο core,
- β) 50 σφαιρίδια πολυστερίνης με καθηλωμένα στην επιφάνειά τους μη δομικά αντιγόνα, από την δομική περιοχή του γενώματος του ιού.
- γ) 3 φιαλίδια (1 ml το καθένα) συμπυκνωμένου ενζυμικού συζεύγματος. Πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα tris με αντισώματα βοός έναντι ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G σε ελάχιστη συγκέντρωση 0,02 µg/mL, συνδεδεμένα με υπεροξειδάση. Επίσης περιέχει 0,015% Γενταμικίνη και 0,01% θυμεροζάλη (Thimerosal).
- δ) 3 φιαλίδια (19 mL το καθένα) αραιωτικού διαλύματος για το ενζυμικό σύζευγμα, που περιέχει ορό βοός και αιγός και αντιμικροβιακές ουσίες (0,015% Γενταμικίνη).
- ε) 1 φιαλίδιο (2 mL) θετικού μάρτυρα. Αδρανοποιημένο πλάσμα ανθρώπου με αντισώματα έναντι του HCV σε ελάχιστο τίτλο 1:2 και 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
- στ) 1 φιαλίδιο (2 mL) αρνητικού μάρτυρα. Πλάσμα ανθρώπου αρνητικό για αντι-HCV αντισώματα, με 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

- ζ) 2 φιαλίδια (20 mL το καθένα) αραιωτικό διάλυμα για τα δείγματα ορών. Πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα tris που περιέχει ορό βοός και αιγός και 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
- η) 1 φιάλη (10 δισκία) OPD (ορθο-φαιλυλενοδιαμίνη 2 HCL). Δισκία με 12,8 mg OPD/δισκίο.
- θ) 1 φιάλη (55 mL) διαλυτικού για τα δισκία OPD. Κιτρικοσφωρικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,02% υπεροξειδίου του υδρογόνου.
- ι) Κανονικό διάλυμα θειϊκού οξέος για την αναστολή της αντίδρασης (φιάλη 110 mL).

Η φύλαξη των αντιδραστηρίων γινόταν σε θερμοκρασία 4-8°C μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξεως και φέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου, πριν την χρησιμοποίησή τους.

#### **4) Τεχνική εκτέλεσης του προσδιορισμού**

Πριν από την εξέταση συμπληρωνόταν ειδικό πρωτόκολλο στο οποίο καταχωρούνται με προκαθορισμένη σειρά τα προς εξέταση δείγματα ορών και οι κατάλληλοι μάρτυρες θετικός x3 και αρνητικός x2.

Κατόπιν εγένετο διανομή 15 μl από κάθε δείγμα και από τους μάρτυρες σε σωληνάρια πολυστερίνης και προσετίθεντο 600 μl αραιωτικού διαλύματος. Μετά από ήπια ανάδευση, μεταφερόταν 200 μl από τα αραιωμένα δείγματα στα βυθίσματα των πλακών αντίδρασης που περιείχαν σφαιρίδια με προσηλωμένο το δομικό αντιγόνο του HCV και 200 μl στα βυθίσματα των πλακών που περιείχαν σφαιρίδια με μη δομικά αντιγόνα του HCV.

Ακολουθούσε η ίδια διαδικασία σε όλα τα στάδια με εκείνη που περιγράφηκε προηγουμένως και η φωτομέτρηση εγένετο στο Quantum II ο ηλεκτρονικός υπολογιστής του οποίου αξιολογούσε τις μετρήσεις και ο εκτυπωτής τύπωνε απ' ευθείας τα αποτελέσματα. Φωτομετρούνταν αρχικά τα δείγματα εκείνα τα οποία επώαστηκαν με τα σφαιρίδια στα οποία είχε προσηλωθεί δομικό αντιγόνο

και ακολούθως τα δείγματα που επώαστηκαν με τα σφαιρίδια με προσηλωμένα τα μη δομικά αντιγόνα.

Ως αρνητικά χαρακτηρίζοντο τα δείγματα των οποίων η απορρόφηση ήταν μικρότερη της τιμής του ουδού (cutoff value) και στα δύο συστήματα.

Ως θετικά χαρακτηρίζοντο τα δείγματα των οποίων η απορρόφηση ήταν μεγαλύτερη ή ίση της τιμής του ουδού, (cutoff value), στο ένα ή και στα δύο συστήματα ανίχνευσης. Όσα δείγματα ήταν θετικά και σ' αυτή την συμπληρωματική δοκιμασία, εξετάζονταν περαιτέρω με τις επιβεβαιωτικές μεθόδους RIBA 2<sup>ης</sup> γενιάς και Western blott 3<sup>ης</sup> γενιάς.

## **Γ. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗΣ 2<sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ (RIBA)**

Για την εκτέλεση αυτής της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε η σειρά έτοιμων τυποποιημένων αντιδραστηρίων του οίκου Chiron.

### **1) Αρχή της μεθόδου**

Με τη δοκιμασία αυτή γίνεται ανίχνευση αντι-HCV αντισωμάτων. Η ανίχνευση των αντι-HCV αντισωμάτων στηρίζεται σε παραδοσιακές τεχνικές, στις οποίες οι αντιγονικές πολυπρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από το γένωμα του HCV καθηλώνονται σε φύλλα νιτροκυτταρίνης. Αυτό επιτυγχάνεται με τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος με κάθετη ηλεκτροφόρηση και με την μεταφορά τους με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε φύλλο νιτροκυτταρίνης, το οποίο κόβεται σε λωρίδες κατάλληλου μεγέθους. Οι αντιγονικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από ανασυνδυασμένο HCV-cDNA. Τρεις από αυτές ανήκουν στις μη δομικές πρωτεΐνες (5-1-1, c100-3, c33c), ενώ η τέταρτη (c22-3) είναι δομική.

Κατά την δοκιμασία αυτή αρχικά γίνεται ενυδάτωση των λωρίδων νιτροκυτταρίνης. Ύστερα επώαση των μαρτύρων (θετικού και αρνητικού) και των δειγμάτων ορών με τις λωρίδες. Αν στα δείγματα υπάρχουν αντι-HCV αντισώματα

αυτά συνδέονται με τις καθηλωμένες στις λωρίδες αντίστοιχες πρωτεΐνες του ορού. Ακολουθεί έκπλυση και επώαση με αντιανθρώπινα αντι-IgG ανοσοσφαιρίνη ιχνοθετημένη με αλκαλική φωσφατάση, η οποία επί θετικής αντίδρασης προσηλώνεται στο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Μετά από νέα έκπλυση και απομάκρυνση του μη προσηλωθέντος υλικού, προστίθεται το διάλυμα χρωμογόνου, το οποίο καθιστά ορατή την ενζυμική δράση του ανοσοενζυμικού συμπλόκου, το οποίο έχει προσηλωθεί σε διάφορες θέσεις της λωρίδας νιτροκυτταρίνης.

Η εμφάνιση έγχρωμων ταινιών στις θέσεις όπου έχουν καθηλωθεί οι πρωτεΐνες του HCV, επιτρέπει την διαπίστωση ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτών των πρωτεϊνών.

## **2) Υλικό και όργανα**

Η σειρά των αντιδραστηρίων περιέχει πλαστικά δοχεία πλυσίματος, για τις ταινίες. (Product No 930590, Chiron RIBA Starter Kit). Επιπλέον για την εκτέλεση της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκαν: αυτόματη πιπέττα διανομής αντιδραστηρίων (multipette) με σύριγγα διανομής των 50 ml, αυτόματες πιπέττες ρυθμιζόμενου άγκου (varipette 10-100 ml και 101-1000 ml), πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης κίτρινα 10-100 ml και μπλε 101-1000 ml (erpendorf) για τις παραπάνω πιπέττες, ογκομετρικοί κύλινδροι και δοχεία των 50, 100, 500 ml και 10, 25 ml αντίστοιχα, συσκευή ανακίνησης σε τρία επίπεδα δυνατότητας 16-20 κύκλων το λεπτό.

## **3) Αντιδραστήρια**

Η σειρά των έτοιμων τυποποιημένων αντιδραστηρίων περιέχει τα εξής αντιδραστήρια:

- a) 30 αριθμημένες (1-30) λωρίδες νιτροκυτταρίνης στις οποίες έχουν διαχωριστεί και καθηλωθεί οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες 5-1-1, C100-3, C33C, C22-3 του HCV. Επιπλέον υπάρχουν στις λωρίδες δύο θέσεις στις οποίες έχει καθηλωθεί ανθρώπινη IgG ανοσοσφαιρίνη σε υψηλή (επίπεδο I) και χαμηλή (επίπεδο II) συγκέντρωση και μια θέση στην οποία έχει καθηλωθεί

ανασυνδυσασμένο ανθρώπειο υπεροξειδίο της δισμουτάσης. Η κάθε λωρίδα νιτροκυτταρίνης είναι τοποθετημένη μέσα σε μικρό πλαστικό σωληνάριο τα οποία ανά πέντε είναι τυλιγμένα με πλαστικό κάλυμμα. Τα αντιγόνα 5-1-1 και C33c προέρχονται από ανασυνδυσασμένο cDNA εκφρασμένο σε *E.coli* ενώ τα αντιγόνα C22-3 και C100-3 από ανασυνδυσασμένο DNA εκφρασμένο σε *S. cerevisiae*.

- β) Μια φιάλη 50 ml αραιωτικού διαλύματος. Πρόκειται για ένα φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνη βοός και 0,01% thimerosal ως συντηρητικό.
- γ) Μια φιάλη 65 ml ενζυμικού συζεύγματος. Ορός αιγός με αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρινών IgG του ανθρώπου, ιχνοθετημένα με υπεροξειδάση και 0,01% thimerosal ως συντηρητικό.
- δ) Μια φιάλη 12 ml συμπυκνωμένου ενζυμικού υποστρώματος. Περιέχει 4-chloro-1 naphthol και μεθανόλη.
- ε) Μια φιάλη 60 ml αραιωτικού για το ενζυμικό υπόστρωμα. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει υπεροξειδίο του υδρογόνου.
- στ) Μια φιάλη 80 ml συμπυκνωμένου πλυστικού διαλύματος. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με 0,01% thimerosal ως συντηρητικό.
- ζ) Μια φιάλη 0,3 ml θετικού μάρτυρα. Αδρανοποιημένος ορός ανθρώπου με αντισώματα έναντι του HCV, αλλά αρνητικός έναντι HBsAg και HIV. Περιέχει 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
- η) Μια φιάλη αρνητικού μάρτυρα 0,3 ml. Ορός ή πλάσμα ανθρώπου, χωρίς αντι-HCV αντισώματα, επίσης αρνητικός έναντι HBsAg και HIV. Περιέχει 0,1% αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
- θ) Ένα πακέτο 5 g σκόνη γάλακτος με 0% λιπαρά.

Τα αντιδραστήρια διατηρούνταν σε θερμοκρασία 2-8°C μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης και φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν.

#### 4) Τεχνική της εκτέλεσης

Πριν από την εξέταση συμπληρωνόταν το πρωτόκολλο εργασίας, στο οποίο καταχωρούνταν με προκαθορισμένη σειρά τα προς εξέταση δείγματα ορών και οι μάρτυρες (θετικός και αρνητικός).

Μισή ώρα πριν την έναρξη της διαδικασίας τα αντιδραστήρια μεταφερόταν από το ψυγείο, όπου διατηρούνται (2-8°C), σε θερμοκρασία δωματίου (15-30°C).

Αρχικά παρασκευαζόταν το διάλυμα για την αραιώση των εξεταζόμενων δειγμάτων. Για 30 δείγματα, προστίθεντο 1,8 γραμμάρια αποξηραμένου γάλακτος σε 36 ml αραιωτικού διαλύματος. Ακολουθούσε καλή ανάδευση του διαλύματος, το οποίο μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 8 ώρες. Στα πλαστικά σωληνάρια με τις λωρίδες νιτροκυτταρίνης αριθμημένες από 1 έως 30, προσετίθεντο 1 ml από το προπαρασκευασθέν αραιωτικό διάλυμα. Αμέσως μετά προσετίθεντο 20 ml από τα εξεταζόμενα δείγματα και τους μάρτυρες.

Ακολούθως επαναπωματιζόταν με προσοχή όλα τα πλαστικά σωληνάρια, τοποθετούνταν σε ειδικά στατώ και ανακινούνται σε συσκευή ανακίνησης (16-20 κύκλοι/λεπτό) για 4 ως 4½ ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την διάρκεια της ανακίνησης παρασκευαζόταν το πλυστικό διάλυμα εργασίας ως εξής: το συμπυκνωμένο πλυστικό διάλυμα αραιώνετο με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:50 (για 30 δείγματα: 17 ml σε 833 ml H<sub>2</sub>O). Το πλυστικό διάλυμα μετά την παρασκευή του μπορεί να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για μια εβδομάδα.

Μετά το πέρας της επώασης γινόταν αναρρόφηση του υγρού περιεχομένου από τα σωληνάρια και προστίθετο 1 ml πλυστικού διαλύματος, σε κάθε σωληνάριο. Μετά από σύντομη ανάδευση γινόταν πάλι αναρρόφηση του υγρού περιεχομένου από τα σωληνάρια και προσετίθετο ξανά 1 ml πλυστικού διαλύματος σε κάθε σωληνάριο. Ακολούθως οι λωρίδες και το υγρό περιεχόμενο κάθε σωληναρίου μεταφερόταν σε ειδικό πλαστικό δοχείο. Χρησιμοποιούνταν δυο πλυστικά δοχεία σε καθένα από τα οποία τοποθετούνταν 15 λωρίδες νιτροκυτταρίνης και αφού αφαιρείτο το υγρό περιεχόμενο επροστίθετο 30 ml

πλυστικού διαλύματος σε κάθε δοχείο. Ακολουθούσε ήπια ανακίνηση και αφαιρείτο το πλυστικό διάλυμα. Ακολουθούσαν ομοίως δεύτερη και τρίτη πλύση.

Μετά το τέλος της τρίτης πλύσης προσετίθεντο στα δοχεία, το ενζυμικό σύζευγμα, σε ποσότητα 1 ml για κάθε λωρίδα νιτροκυτταρίνης. Ακολουθούσε συνεχής ανακίνηση σε  $110 \pm 5$  rpm σε κυκλικό αναδευτήρα για 30-35 min σε θερμοκρασία δωματίου, μετά το πέρας της οποίας γινόταν αφαίρεση του υγρού περιεχομένου και νέα έκπλυση των λωρίδων τρεις φορές. (Όπως ακριβώς περιγράφηκε πιο πάνω).

Κατά τη διάρκεια της ανακίνησης γινόταν η παρασκευή του προς χρήση διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος με την προσθήκη 6 ml συμπυκνωμένου διαλύματος σε 30 ml αραιωτικού διαλύματος για το υπόστρωμα. Το διάλυμα διατηρείται μέχρι και μία ώρα μετά από την παρασκευή του σε σκοτεινό περιβάλλον.

Μετά από την τελευταία έκπλυση προσετίθετο 15 ml του έτοιμου ενζυμικού υποστρώματος για κάθε δοχείο και ακολουθούσε ανακίνηση για 15-20 λεπτά σε  $110 \pm 5$  rpm, σε κυκλικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά αφαιρείτο το διάλυμα του ενζυμικού υποστρώματος και επροστίθεντο 60 ml απεσταγμένου νερού το οποίο μετά από τρίλεπτη περίπου ελαφρά ανακίνηση αφαιρείτο.

Ακολούθως με την βοήθεια μιας λαβίδας μεταφερόταν οι λωρίδες νιτροκυτταρίνης και αφηνόταν να στεγνώσουν σε απορροφητικό χαρτί, περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά γινόταν η ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Η εκτίμηση γινόταν μακροσκοπικά και πάντα σε σχέση με τους μάρτυρες (θετικό και αρνητικό).

Πάνω στην κάθε λωρίδα υπάρχουν, εκτός από τις πρωτεΐνες του HCV και δύο θέσεις με καθηλωμένη ανθρώπινη IgG ανοσοσφαιρίνη, που αποτελούν εσωτερικούς μάρτυρες και αντιστοιχούν σε δύο επίπεδα (levels) I, χαμηλής συγκέντρωσης και II υψηλής συγκέντρωσης. Η ένταση του χρώματος κάθε ταινίας αξιολογείται με +, ++, +++, ή +++++, συγκρινόμενη πάντα με τις ταινίες των

εσωτερικών μαρτύρων. Το επίπεδο 2 αξιολογείται με +++ και το επίπεδο 1 με +. Ταινία στην οποία η ένταση χρώματος ήταν μικρότερη εκείνης του επιπέδου 1, χαρακτηριζόταν ως +/- . Ταινία με ένταση χρώματος μεγαλύτερης του επιπέδου II χαρακτηριζόταν ως 4+.

Η αξιολόγηση είναι εφικτή μόνο όταν:

- α) στην λωρίδα του θετικού μάρτυρα εμφανιζόταν ευδιάκριτα όλες οι ταινίες που αντιστοιχούσαν στις αντιγονικές περιοχές του HCV, που περιλαμβάνονταν σε αυτή, με ένταση 2+ ή και μεγαλύτερη, και καμία αντίδραση στην ταινία με το υπεροξειδίο της δισμουτάσης (hSOD).
- β) στην λωρίδα του αρνητικού μάρτυρα δεν εμφανιζόταν καμιά έγχρωμη ταινία στις περιοχές που αντιστοιχούν στις HCV πρωτεΐνες, αλλά η hSOD περιοχή εμφάνιζε ταινία ασθενέστερης έντασης από εκείνης του επιπέδου II.

Αρνητικά χαρακτηριζόταν τα δείγματα τα οποία δεν εμφάνιζαν καμία έγχρωμη ταινία.

Θετικά χαρακτηριζόταν τα δείγματα τα οποία εμφάνιζαν θετικότητα 1+ ή και μεγαλύτερη σε δύο τουλάχιστον ταινίες που αντιπροσώπευαν διαφορετικές περιοχές του HCV γενώματος.

Τέλος αδιευκρίνιστα χαρακτηριζόταν εκείνα τα δείγματα τα οποία εμφάνιζαν:

- α) 1+ θετικότητα ή μεγαλύτερη σε μία μόνο ταινία,
- β)  $\geq 1+$  θετικότητα σε μία μόνο ταινία και στην hSOD ταινία
- γ) θετικότητα  $\geq 1+$  στις ταινίες που αντιστοιχούσαν στις 5-1-1 και c100-3 περιοχές του HCV γενώματος.

Όσον αφορά στις γονιδιακές περιοχές 5-1-1 και c100-3 του HCV, οι Bush et al (1993) έδειξαν ότι ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τις γονιδιακές αυτές περιοχές του HCV δεν είναι ενδεικτικά παρούσας ή παρελθούσας λοίμωξης, σε χαμηλού κινδύνου πληθυσμό (π.χ. εθελοντές αιμοδότες). Σε αυτόν τον πληθυσμό η συχνότητα ανεύρεσης αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών αυτών ήταν 0,1%. Επίσης δεν διαπιστώθηκε



αύξηση της τιμής των τρανσαμινασών. Follow up μελέτες με RIBA HCV 2.0 του οίκου Chiron δεν έδειξαν καμία ανάπτυξη σε δεύτερο χρόνο αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τις c22-3 και c33c γονιδιακές περιοχές. Σε ασθενείς με NANB ηπατίτιδα, κλινικές μελέτες με RIBA HCV 2.0 της Chiron έδειξαν ότι περίπου 1,1% των ασθενών ανέπτυξαν αρχικά αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από γονιδιακές περιοχές 5-1-1 και c100-3 και αργότερα άρχισαν σιγά-σιγά να εμφανίζουν και αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τις γονιδιακές περιοχές c33C και c22-3.

#### **Δ. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΚΑΘΗΛΩΣΗΣ 3<sup>ης</sup> ΓΕΝΙΑΣ**

Για την εκτέλεση αυτής της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε η σειρά έτοιμων τυποποιημένων αντιδραστηρίων HCV BLOT 3.0 του οίκου Murex, σύμφωνα με τις ενδείξεις του κατασκευαστή.

##### **1) Αρχή της μεθόδου**

Πρόκειται για μέθοδο η οποία βασίζεται στην ίδια αρχή με εκείνη της RIBA με μόνη διαφορά, ότι ελέγχει και την NS<sub>5</sub> περιοχή του γενώματος του HCV με αντίστοιχο αντιγόνο, το οποίο είναι καθηλωμένο στις ταινίες νιτροκυταρίνης.

Η εκτέλεση της δοκιμασίας περιλαμβάνει τα ίδια ακριβώς στάδια με εκείνα της καθήλωσης 2<sup>ης</sup> γενιάς (RIBA), τα οποία ήδη περιγράφηκαν.

##### **2) Υλικό και όργανα**

Για την εκτέλεση της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε το System 27 Autoblot της Cenelabs diagnostics PTE LTD, το οποίο είναι αυτοματοποιημένο και ρυθμίζεται έτσι ώστε να επιτελεί τα διαδοχικά βήματα της διαδικασίας αυτόματα. Η ανθρώπινη μεσολάβηση περιορίζεται στην αρχική προετοιμασία των κατάλληλων αντιδραστηρίων και στην ρύθμιση του συστήματος.

Το S.27 διαθέτει 5 επιλογές προγραμμάτων. Στην προκειμένη περίπτωση η επιλογή Νο 4 αφορά στον HCV. Το πρόγραμμα του συστήματος περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο πρόπλυσης και ακολουθούν τα στάδια επώασης, προσθήκης ενζυμικού συζεύγματος, προσθήκης υποστρώματος- χρωμογόνου και τέλος το στάδιο της τελικής έκπλυσης. Μεταξύ των σταδίων γίνεται ξέπλυμα των λωρίδων νιτροκυτταρίνης. Σε κάθε στάδιο προστίθεται η ανάλογη ποσότητα αντιδραστηρίων. Η ποσότητα των αντιδραστηρίων και η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου είναι προγραμματισμένα από τον κατασκευαστή του μηχανήματος και συσχετίζεται με την επιλογή του προγράμματος. Με το S 27 Autoblot διατίθενται επίσης δύο δίσκοι με 27 θέσεις για δείγματα ορών και μαρτύρων, με τα καλύμματά τους, δύο δοχεία αποβλήτων με καλύμματα, τέσσερα πλαστικά δοχεία των 125 ml και τέσσερα των 500 ml.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης απεσταγμένο νερό, ογκομετρικοί κύλινδροι των 100, 250 και 500 ml, αυτόματη πιπέτα διανομέας (multipipette), σύριγγα των 50 ml, πιπέτα αυτόματη ρυθμισμένου όγκου (varipette 10-100 μl), ρύγχη μπλέ και κίτρινα μιας χρήσης, γάντια μιας χρήσης, πλαστικό κουτάλι και πλαστική λαβίδα και διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου.

### **3) Αντιδραστήρια**

- 1) 18 αριθμημένες λωρίδες νιτροκυτταρίνης στις οποίες έχουν καθηλωθεί ανασυνδισμένα αντιγόνα που κωδικοποιούνται από τις περιοχές core, NS<sub>3</sub>, NS<sub>4</sub> και NS<sub>5</sub> του γενώματος του HCV. Επίσης σε κάθε λωρίδα υπάρχουν δύο θέσεις στις οποίες έχουν καθηλωθεί ανθρώπινη IgG ανοσοσφαιρίνη και αντίσωμα έναντι ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG. Οι λωρίδες βρίσκονται μέσα σε πλαστικό σωληνάριο, το οποίο επικαλύπτεται με πλαστικό κάλυμμα.
- 2) Ένα φιαλίδιο των (80 μl) αρνητικού μάρτυρα. Αδρανοποιημένος ανθρώπιος ορός χωρίς αντι-HCV και αντι-HIV αντισώματα, καθώς επίσης αρνητικός στον έλεγχο HBsAg. Περιέχει ως συντηρητικά αζίδιο του νατρίου και thimerosal.

- 3) Ένα φιαλίδιο (80 μl) θετικού μάρτυρα με υψηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι του HCV και αρνητικό για αντι-HIV αντισώματα και HBsAg.
- 4) Μια φιάλη (20 ml) συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος (stockbuffer), το οποίο περιέχει αδρανοποιημένο ορό αιγός και αραιώνεται με απεσταγμένο νερό.
- 5) Μια φιάλη (70 ml) συμπυκνωμένου πλυστικού διαλύματος (wash buffer). Πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο αραιώνεται με απεσταγμένο νερό. Χρησιμοποιείται ως αραιωτικό και πλυστικό κατά την διεξαγωγή της αντίδρασης.
- 6) Ένα φιαλίδιο 120 μl ενζυμικού συζεύγματος. Ορός αιγός με αντισώματα έναντι ανθρώπινης G ανοσοσφαιρίνης, ιχνοθετημένα με αλκαλική φωσφατάση. Περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
- 7) 1 φιάλη (120 ml) διαλύματος υποστρώματος-χρωμογόνου. Περιέχει 5 Bromo-4chro-3-indolyl-phosphate και Nitroblue tetrazolium.
- 8) Ένα πακέτο (10 g) γάλακτος σε σκόνη.
- 9) Ένα πλαστικό κουτάλι και μια πλαστική λαβίδα.

Η φύλαξη των αντιδραστηρίων έγινε σε θερμοκρασία 2-8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης και φέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν.

#### **4) Η τεχνική της εκτέλεσης**

Αρχικά συντασσόταν το πρωτόκολλο εργασίας στο οποίο καταχωρούνταν με προκαθορισμένη σειρά τα προς εξέταση δείγματα, καθώς και οι μάρτυρες: θετικός και αρνητικός. Κάθε φορά ελεγχόταν 16 δείγματα και δύο μάρτυρες (Σύνολο 18)

Μετά την σύνταξη του πρωτοκόλλου ετοιμαζόταν το πλυστικό (wash buffer) διάλυμα, κατόπιν αραιώσης συμπυκνωμένου πλυστικού διαλύματος (wash buffer concetrate), σε απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:20.

Το διάλυμα αυτό τοποθετούνταν σε ένα από τα τέσσερα πλαστικά δοχεία των 500 ml, έφερε με την ένδειξη Wash Buffer, το οποίο εν συνεχεία τοποθετούνταν σε ειδική θέση στο S. 27 Autoblot, απ' όπου με ειδικό πλαστικό

σωληνάκι το οποίο κατέληγε σε ρύγχος, γινόταν διανομή του διαλύματος στα δείγματα, όταν το μηχάνημα άρχιζε να λειτουργεί.

Κατόπιν ετοποθετούντο οι λωρίδες νιτροκυτταρίνης στις αντίστοιχες αριθμημένες θέσεις σ' έναν από τους δύο δίσκους του S. 27. Ο δίσκος πριν από την θέση 1 διέθετε μία θέση με την ένδειξη P, η οποία έμενε κενή. Κατόπιν ετοποθετείτο ο δίσκος στο S. 27, το οποίο ρυθμιζόταν ώστε να πραγματοποιήσει μία πρόπλυση διάρκειας 15 min. Η πρόπλυση αποσκοπούσε στην διαβροχή των λωρίδων με το διάλυμα wash buffer και γινόταν σε θερμοκρασία 25°C περίπου με συνεχή αργή ανακίνηση του δίσκου. Πριν αρχίσει η πρόπλυση, τοποθετούνταν το ειδικό δοχείο αποβλήτων με υποχλωριώδες νάτριο, σε ειδική θέση στο S. 27 για την υποδοχή των υγρών έκπλυσης.

Κατά την διάρκεια της διαβροχής εγένετο η προετοιμασία των υπολοίπων αντιδραστηρίων. Αρχικά παρασκευαζόταν το blotting buffer, με την διάλυση του συμπυκνωμένου stock διαλύματος σε απεσταγμένο νερό, σε αναλογία 1/10 και σκόνη γάλακτος σε αναλογία 1gr σε 20 ml διαλύματος stock buffer. Γινόταν καλή ανάμειξη σε γυάλινο δοχείο με την χρήση πλαστικού κουταλιού. Ένα μέρος του διαλύματος αυτού εχρησιμοποιείτο για την αραιώση των δειγμάτων και ένα άλλο για την παρασκευή του ενζυμικού συζεύγματος. Το ενζυμικό σύζευγμα παρασκευαζόταν με την διάλυση 10 ml συμπυκνωμένου ενζυμικού συζεύγματος σε 10 ml blotting buffer. Ακολουθούσε καλή ανάμειξη, μεταφορά σε πλαστικό δοχείο (των 125 ml) και τοποθέτηση στην ειδική θέση του S. 27, απ' όπου με ειδικό πλαστικό σωληνάριο, που κατέληγε σε ρύγχος, γινόταν η διανομή της κατάλληλης ποσότητας σε κάθε θέση του δίσκου με τα δείγματα.

Μετά γινόταν μεταφορά του έτοιμου προς χρήση υποστρώματος-χρωμογόνου στο πλαστικό δοχείο με την ένδειξη substrate και το δοχείο ετοποθετείτο στην ειδική θέση του S. 27, απ' όπου διανέμετο στα δείγματα, όπως και τα άλλα αντιδραστήρια. Το S. 27 διαθέτει και μια τέταρτη θέση, όπου ετοποθετείτο ένα από τα πλαστικά δοχεία των 500 ml, με απεσταγμένο νερό.

Μετά το τέλος της πρόπλυσης και την παρασκευή των αντιδραστηρίων, απεμακρύνετο ο πλαστικός δίσκος από το S. 27 και σε κάθε θέση του διανέμεντο 2 ml αραιωτικού διαλύματος blotting buffer και ακολούθως προστίθετο 20 µl από τα δείγματα και τους μάρτυρες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο.

Μετά γινόταν ένας έλεγχος σχετικά με το αν τα αντιδραστήρια ήταν στην σωστή θέση και σωστά τοποθετημένα και ύστερα τοποθετείτο ο δίσκος με τα δείγματα.

Στο S. 27 αυτόματα γινόταν επώαση των δειγμάτων στους 25°C, διανομή κατάλληλης ποσότητας ενζυμικού συζεύγματος σε κάθε δείγμα, έκπλυση τρεις φορές, με το πλυστικό υγρό, διανομή του χρωμογόνου-υποστρώματος, και έκπλυση τρεις φορές με απεσταγμένο νερό. Η όλη διαδικασία διαρκούσε 3 ώρες και 15 λεπτά, στο τέλος της οποίας γινόταν εξαγωγή του δίσκου με τα δείγματα, τα οποία αφηνόταν μισή ώρα περίπου να στεγνώσουν πριν γίνει η ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Ακολουθούσε η διαδικασία έκπλυσης του οργάνου με απεσταγμένο νερό.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γινόταν όπως ακριβώς και στην RIBA 2.0, με διαβάθμιση θετικότητας 1+ ως 4+, σύμφωνα με την ένταση που παρατηρείτο στις θέσεις καθήλωσης των IgG και αντι-IgG. Η ένταση στην θέση καθήλωσης της IgG αξιολογείται ως +, ενώ η ένταση στην θέση καθήλωσης αντι-IgG αξιολογείται ως 3+.

Αρνητικά χαρακτηριζόταν τα δείγματα στα οποία δεν εμφανιζόταν καμία έγχρωμη ταινία στην λωρίδα νιτροκυτταρίνης, στις περιοχές που αντιστοιχούσαν στις πρωτεΐνες του HCV.

Θετικά χαρακτηριζόταν τα δείγματα τα οποία εμφάνιζαν ένταση χρώματος ίση ή μεγαλύτερη του 1+ σε δύο ή περισσότερες θέσεις που αντιστοιχούσαν σε αντιγόνα του HCV.

Εμφάνιση μιας μόνο έγχρωμης ταινίας με θετικότητα  $\geq 1+$ , αποτελούσε αμφίβολο αποτέλεσμα.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 αναγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα προσδιορισμού αντι-HCV αντισωμάτων HBs αντιγόνου και αντι-HBc αντισωμάτων σε 270 πολυμεταγγιζόμενα άτομα. Επίσης στον ίδιο πίνακα περιλαμβάνονται τα αποτελέσματα επιβεβαίωσης των αντι-HCV θετικών περιπτώσεων με τις μεθόδους Western blot 3ης γενιάς και RIBA 2ης γενιάς.

**Πίνακας 1.** Αποτελέσματα προσδιορισμού αντι-HCV αντισωμάτων, HBs Ag και αντι-HBc αντισωμάτων σε 276 πολυμεταγγιζόμενα άτομα.

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
1.	1P	6	A					
2.	2P	2 μην	A					
3.	3P	6	A	+	+	+		
4.	4P	6	Θ					
5.	5P	2	Θ					+
6.	6P	7	Θ					
7.	7P	6	Θ					+
8.	8P	2	Θ					
9.	9P	3	A	+	+	+		
10.	10P	3	A					
11.	11P	3	A					
12.	12P	2	Θ					

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
13.	13P	Θ	+	-	-			
14.	14P	3	Θ					
15.	15P	5	Θ					
16.	16P	4	A					
17.	17P	4	A					
18.	18P	10 μην	A					
19.	19P	14	Θ	+	+	+	+	+
20.	20P	6	Θ	+	+	+		
21.	21P	4	A					
22.	22P	5	Θ					
23.	23P	3	Θ					
24.	24P	7	Θ					
25.	25P	2	A					
26.	26P	14	Θ	+	-	-		
27.	27P	24	A	+	+	+		
28.	28P	12	A	+	-	-		
29.	29P	5	A					+
30.	30P	4	A					
31.	31P	2	A					
32.	32P	17	Θ	+	-	-		
33.	33P	9	Θ					
34.	34P	20	Θ	+	+	+	+	+
35.	35P	5	A	+	+	+		
36.	36P	3	Θ					
37.	37P	1 μην	A					
38.	38P	4	Θ					
39.	39P	2	Θ					
40.	40P	2	Θ					+
41.	41P	3	A					
42.	42P	4	A					
43.	43P	4	A					
44.	44P	2	A					
45.	45P	3	Θ					
46.	46P	5	A					
47.	47P	2	Θ					
48.	48P	5	Θ					
49.	49P	4	Θ					
50.	50P	3	Θ					

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
51.	1Σ	10	A	+	+	+		
52.	2Σ	31	Θ	+	+	+		+
53.	3Σ	26	A	+	+	+		+
54.	4Σ	23	A	+	+	+		+
55.	5Σ	37	Θ	+	+	+		+
56.	6Σ	32	A					
57.	7Σ	25	A	+	-	-		+
58.	8Σ	22	Θ	+	+	+	+	+
59.	9Σ	23	Θ	+	+	+	+	+
60.	10Σ	19	Θ					
61.	11Σ	22	A	+	+	+		+
62.	12Σ	25	A	+	+	+	+	+
63.	13Σ	25	A	+	+	+		+
64.	14Σ	26	Θ	+	+	+		+
65.	15Σ	38	Θ	+	-	-		+
66.	17Σ	17	A	+	+	+		+
67.	18Σ	24	A	+	+	+		+
68.	19Σ	23	Θ					
69.	20Σ	17	Θ	+	+	+		+
70.	21Σ	18	Θ	+	-	-		+
71.	22Σ	37	Θ	+	+	+		+
72.	23Σ	16	Θ				+	+
73.	24Σ	14	A					+
74.	25Σ	26	Θ	+	+	+		+
75.	26Σ	28	A					
76.	27Σ	25	A	+	+	+		+
77.	28Σ	17	Θ					+
78.	29Σ	26	Θ	+	+	+		+
79.	30Σ	27	A	+	+	+		+
80.	31Σ	27	Θ				+	+
81.	32Σ	26	Θ	+	-	-		+
82.	33Σ	10	Θ					
83.	34Σ	18	A					
84.	*35Σ	30	Θ	+	-	Indet		+
85.	36Σ	26	A	+	+	+		+
86.	37Σ	24	A	+	+	+		+
87.	38Σ	22	U	+	+	+	+	+
88.	39Σ	32	U	+	+	+	+	+



A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
89.	41Σ	13	A					
90.	43Σ	28	A	+	+	+		+
91.	44Σ	22	A					+
92.	45Σ	25	A	+	+	+		
93.	*46Σ	15	A	+	Indet	Indet		
94.	47Σ	33	Θ					
95.	48Σ	18	Θ	+	+	+		
96.	49Σ	34	Θ					+
97.	50Σ	18	Θ					+
98.	51Σ	14	A	+	+	+		
99.	52Σ	26	A	+	+	+		
100.	53Σ	16	Θ	+	+	+		+
101.	54Σ	17	Θ	+	+	+		
102.	55Σ	19	A					
103.	57Σ	5	Θ					
104.	58Σ	31	A	+	+	+		
105.	59Σ	28	Θ	+	-	-	+	+
106.	60Σ	13	Θ	+	+	+		
107.	61Σ	10	A					+
108.	62Σ	25	Θ	+	-	-		+
109.	63Σ	22	Θ	+	+	+	+	+
110.	64Σ	16	A	+	Indet	Indet		+
111.	65Σ	37	Θ	+	+	+		+
112.	66Σ	8	Θ					
113.	67Σ	6	Θ					
114.	68Σ	11	Θ	+	+	+		
115.	69Σ	25	A	+	+	+		+
116.	70Σ	22	A					
117.	71Σ	30	A	+	-	-		
118.	72Σ	17	A	+	+	+		
119.	73Σ	25	Θ					
120.	74Σ	5	Θ	+	+	+		
121.	75Σ	24	Θ				+	+
122.	76Σ	26	Θ	+	+	+	+	+
123.	77Σ	37	Θ					
124.	78Σ	5	Θ					
125.	79Σ	28	A					
126.	80Σ	34	A	+	+	+	+	+

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
127.	81Σ	35	Θ	*+	Indet	Indet		
128.	82Σ	28	A	+	+	+	+	+
129.	83Σ	11	Θ					
130.	84Σ	4	Θ					
131.	15 <sub>2</sub>	18	A	+	+	+	+	+
132.	27 <sub>2</sub>	4	Θ					
133.	77 <sub>2</sub>	18	Θ	+	+	+		
134.	109 <sub>2</sub>	28	Θ	+				+
135.	128 <sub>2</sub>	2	A	+			+	+
136.	203 <sub>2</sub>	22	A					+
137.	269 <sub>2</sub>	3	A	+			+	+
138.	270 <sub>2</sub>	12	Θ					
139.	271 <sub>2</sub>	13	A					+
140.	272 <sub>2</sub>	38	A	+				+
141.	273 <sub>2</sub>	4	A					
142.	274 <sub>2</sub>	37	Θ	+	+	+		+
143.	275 <sub>2</sub>	8	A	+	Indet	Indet		
144.	276 <sub>2</sub>	8	A				+	+
145.	277 <sub>2</sub>	8	A	+	+	+		
146.	278 <sub>2</sub>	31	Θ	+				+
147.	279 <sub>2</sub>	16	Θ	+	+	+		
148.	280 <sub>2</sub>	15	Θ				+	+
149.	281 <sub>2</sub>	16	Θ					+
150.	282 <sub>2</sub>	4	Θ					
151.	283 <sub>2</sub>	15	Θ	+	+	+	+	+
152.	284 <sub>2</sub>	14	A	+	+	+		+
153.	285 <sub>2</sub>	18	Θ	+	+	+		+
154.	286 <sub>2</sub>	31	A	+	-	-	+	+
155.	287 <sub>2</sub>	2	Θ	+				+
156.	288 <sub>2</sub>	13	A					
157.	289 <sub>2</sub>	8	A					+
158.	290 <sub>2</sub>	18	Θ	+	+	+	+	+
159.	291 <sub>2</sub>	22	Θ	+	+	+		
160.	292 <sub>2</sub>	5	Θ	+				
161.	293 <sub>2</sub>	9	Θ					
162.	294 <sub>2</sub>	32	Θ	+				
163.	295 <sub>2</sub>	10	Θ	+	Indet	Indet		+
164.	296 <sub>2</sub>	13	A					+

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
165.	297 <sub>2</sub>	23	A	+	Indet	Indet		+
166.	298 <sub>2</sub>	1	A					
167.	299 <sub>2</sub>	15	Θ	+	+	+	+	+
168.	300 <sub>2</sub>	18	Θ	+	+	+		
169.	301 <sub>2</sub>	14	Θ	+	+	+		
170.	302 <sub>2</sub>	25	Θ	+	+	+		+
171.	303 <sub>2</sub>	10	A					+
172.	304 <sub>2</sub>	21	A	+	+	+		+
173.	305 <sub>2</sub>	27	Θ	+	-	-		+
174.	306 <sub>2</sub>	23	A	+	+	+		
175.	307 <sub>2</sub>	9	A	+	-	-		+
176.	308 <sub>2</sub>	11	A					+
177.	309 <sub>2</sub>	16	Θ					+
178.	310 <sub>2</sub>	10	Θ					+
179.	311 <sub>2</sub>	28	Θ				+	+
180.	312 <sub>2</sub>	14	Θ	+	Indet	+		
181.	313 <sub>2</sub>	5	A					
182.	314 <sub>2</sub>	19	Θ	+	+	+		+
183.	316 <sub>2</sub>	17	Θ	+	+	+		+
184.	317 <sub>2</sub>	3	Θ					
185.	318 <sub>2</sub>	16	A					+
186.	319 <sub>2</sub>	15	A					
187.	320 <sub>2</sub>	14	A	+	+	Indet		+
188.	321 <sub>2</sub>	6	Θ	+	+	+		
189.	322 <sub>2</sub>	11	A					+
190.	323 <sub>2</sub>	3	Θ	+	+	+		
191.	324 <sub>2</sub>	9	A					+
192.	325 <sub>2</sub>	7	A	+	Indet	Indet		
193.	326 <sub>2</sub>	8	Θ	+	+	+		
194.	327 <sub>2</sub>	6	Θ					+
195.	328 <sub>2</sub>	28	Θ					
196.	329 <sub>2</sub>	12	A	+			+	+
197.	331 <sub>2</sub>	16	A					+
198.	332 <sub>2</sub>	6	A	+				
199.	333 <sub>2</sub>	18	A					
200.	334 <sub>2</sub>	8	A					
201.	335 <sub>2</sub>	13	A				+	+
202.	336 <sub>2</sub>	18	A				+	+

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
203.	337 <sub>2</sub>	7	Θ	+				
204.	338 <sub>2</sub>	11	A	+				
205.	339 <sub>2</sub>	18	A	+	+	+	+	+
206.	340 <sub>2</sub>	2	A					
207.	341 <sub>2</sub>	7	A					+
208.	343 <sub>2</sub>	23	A					
209.	344 <sub>2</sub>	26	Θ					+
210.	345 <sub>2</sub>	6	Θ					+
211.	346 <sub>2</sub>	13	A					+
212.	347 <sub>2</sub>	9	Θ					+
213.	348 <sub>2</sub>	16	A	+	+	+		
214.	349 <sub>2</sub>	9	Θ	+	+	+		
215.	350 <sub>2</sub>	4	A					
216.	351 <sub>2</sub>	5	Θ					+
217.	352 <sub>2</sub>	10	A	+	+	+	+	
218.	353 <sub>2</sub>	4	Θ					
219.	354 <sub>2</sub>	11	A					+
220.	355 <sub>2</sub>	11	Θ	+	+	+		
221.	356 <sub>2</sub>	4	A					+
222.	357 <sub>2</sub>	12	Θ	+	+	+	+	
223.	358 <sub>2</sub>	4	Θ	+	+	+		
224.	359 <sub>2</sub>	9	Θ					+
225.	361 <sub>2</sub>	22	Θ	+	+	+		+
226.	362 <sub>2</sub>	22	A	+	+	+		
227.	363 <sub>2</sub>	14	Θ				+	+
228.	364 <sub>2</sub>	8	A	+	Indet	Indet		
229.	365 <sub>2</sub>	4	Θ					
230.	366 <sub>2</sub>	35	A					+
231.	367 <sub>2</sub>	15	Θ					
232.	368 <sub>2</sub>	6	A					
233.	369 <sub>2</sub>	28	Θ	+*	Indet	Indet		
234.	370 <sub>2</sub>	14	Θ					+
235.	371 <sub>2</sub>	21	A	+				
236.	372 <sub>2</sub>	26	Θ	+	+	+		
237.	373 <sub>2</sub>	24	Θ	+	+	+		
238.	374 <sub>2</sub>	29	Θ	+	+	+	+	+
239.	375 <sub>2</sub>	14	A	+	Indet	Indet		
240.	376 <sub>2</sub>	7	A	+				

A/A	A/Δ	Ηλικία	Φύλο	Αντι-HCV αντισώματα	Western blot	RIBA	HBsAg	Αντι-HBc
241.	377 <sub>2</sub>	14	A	+	+	+		
242.	378 <sub>2</sub>	7	A				+	+
243.	379 <sub>2</sub>	8	Θ					
244.	380 <sub>2</sub>	17	Θ	+	+	+		
245.	381 <sub>2</sub>	4	Θ	+				
246.	382 <sub>2</sub>	17	Θ	+				+
247.	383 <sub>2</sub>	11	A					+
248.	384 <sub>2</sub>	17	Θ	+	+	+		
249.	385 <sub>2</sub>	10	Θ					
250.	386 <sub>2</sub>	10	A	+				
251.	387 <sub>2</sub>	11	A	+	+	Indet		
252.	388 <sub>2</sub>	9	A					
253.	389 <sub>2</sub>	8	Θ				+	+
254.	390 <sub>2</sub>	9	A	+	+	+		
255.	391 <sub>2</sub>	15	A	+	+	+		+
256.	392 <sub>2</sub>	10	Θ	+	+	+		+
257.	393 <sub>2</sub>	3	Θ					
258.	394 <sub>2</sub>	6	A					
259.	395 <sub>2</sub>	22	Θ	+	+	+		
260.	396 <sub>2</sub>	15	Θ	+				+
261.	397 <sub>2</sub>	2	Θ				+	
262.	398 <sub>2</sub>	19	A	+				
263.	399 <sub>2</sub>	2	A				+	+
264.	400 <sub>2</sub>	12	Θ	+				
265.	408 <sub>2</sub>	32	Θ					
266.	409 <sub>2</sub>	12	Θ	+	+	+		
267.	410 <sub>2</sub>	24	Θ	+				+
268.	411 <sub>2</sub>	22	A	+	+	+		
269.	412 <sub>2</sub>	5	Θ	+	+	+		
270.	413 <sub>2</sub>	15	A	+	+	+		

Ο πίνακας 2 περιλαμβάνει τα συγκριτικά αποτελέσματα επιβεβαίωσης των αντι-HCV θετικών δειγμάτων με τις δύο προαναφερθείσες επιβεβαιωτικές μεθόδους. Όπως προκύπτει από τον πίνακα 2, σε 92 από τα 141 Elisa θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκε η παρουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C και με τις δύο μεθόδους (65,25%), σε 35 από τα 141 δείγματα το

αποτέλεσμα ήταν αρνητικό (24,8%) ενώ σε 10 δείγματα το αποτέλεσμα απέβη αμφίβολο (7,09%).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Συγκριτικά αποτελέσματα επιβεβαίωσης των Elisa θετικών δειγμάτων με τις μεθόδους Western blot 3<sup>ης</sup> γενιάς και RIBA 2<sup>ης</sup> γενιάς

Western blot (+) RIBA (+)	92
Western blot (-) RIBA (-)	35
Western blot (+) RIBA αμφίβολα	2
Western blot αμφίβολα RIBA (+)	1
Western blot (-) RIBA αμφίβολα	1
Western blot αμφίβολα RIBA (-)	0
Western blot αμφίβολα RIBA αμφίβολα	10

Τέλος σε 4 δείγματα το αποτέλεσμα απέβη αμφίβολο με την μια μέθοδο και θετικό ή αρνητικό με την άλλη, ενώ κανένα δείγμα δεν απέβη θετικό με τη μία και αρνητικό με την άλλη μέθοδο.

Στην παρούσα εργασία ως θετικά αξιολογήθηκαν μόνο τα 92 δείγματα στα οποία το θετικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο ELISA επιβεβαιώθηκε και με τις δύο επιβεβαιωτικές μεθόδους RIBA 2<sup>ης</sup> γενιάς και Western blot 3<sup>ης</sup> γενιάς. Τα υπόλοιπα 14 δείγματα με διαφορετικό επιβεβαιωτικό αποτέλεσμα δεν συμπεριλήφθηκαν στην τελική αξιολόγηση, ώστε η περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων να περιορίζεται στους 256 από τους 270 συνολικά εξετασθέντες ορούς.

Στον πίνακα 3 αναγράφονται τα αποτελέσματα προσδιορισμού αντι-HCV, αντι-HBc αντισωμάτων και HBs αντιγόνου κατά πενταετία ηλικίας για τα άτομα 0

έως 25 ετών και συνοπτικά για τα άτομα 26 ως 40 ετών. Τέλος αναγράφονται ενημερωτικά τα αποτελέσματα 6 ατόμων ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Αποτελέσματα προσδιορισμού αντι-HCV αντισωμάτων, HBsAg και αντι-HBc αντισωμάτων κατά ομάδες ηλικιών.

Ομάδες ηλικιών	Αριθμός εξετασθ.	Επιβεβαιωμένα αντι-HCV +		HBsAg +		αντι-HBc +	
		No	%	No	%	No	%
0-5	63	6	9,5	4	6,3	9	14,3
6-10	44	10	22,7	4	8,3	16	36,4
11-15	38	14	37,0	8	18,6	19	50,0
16-20	35	18	51,4	6	16,6	20	57,1
21-25	34	24	70,6	6	17,6	22	64,7
26-40	42	20	47,6	9	21,4	32	76,1
0- 40	256	92	35.94	37	14.45	118	46.09

Όπως προκύπτει απ' αυτόν τον πίνακα παρατηρείται μια αύξηση της συχνότητας των αντι-HCV αντισωμάτων, με την πάροδο της ηλικίας στις πέντε πρώτες ομάδες ηλικιών. Αντίθετα η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε άτομα 26 - 40 ετών εμφανίζεται μειωμένη. Η ίδια αύξηση με την πάροδο της ηλικίας παρατηρείται και για τη συχνότητα αντι-HBc αντισωμάτων με τη διαφορά ότι αυτή συνεχίζει να αυξάνεται και στα άτομα ηλικίας 26-40 ετών. Η συχνότητα προσδιορισμού HBsAg δεν παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των διάφορων ομάδων ηλικιών, πλην των δυο πρώτων ομάδων που εμφανίζεται συγκριτικά χαμηλότερη.

Στον πίνακα 4 αναγράφονται τα συνολικά αποτελέσματα προσδιορισμού αντι-HCV, αντι-HBc αντισωμάτων και HBs αντιγόνου κατά φύλο. Όπως προκύπτει από αυτόν τον πίνακα δεν παρατηρούνται αξιόλογες διαφορές μεταξύ των δύο φύλων.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Συνοπτικά αποτελέσματα προσδιορισμού αντι-HCV αντισωμάτων, HBsAg και αντι-HBc αντισωμάτων κατά φύλο

Αριθμός εξετασθέντων		Επιβεβαιωμένα αντι-HCV +		HBsAg +		αντι-HBc +	
		No	%	No	%	No	%
Άρρενες	119	40	33,1	16	12,3	52	43,70
Θήλεις	137	52	36,9	21	14,4	66	48,18
Σύνολο	256	92	35,94	37	14,45	118	46,09



## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 1 αντι-HCV αντισώματα διαπιστώθηκαν με τη μέθοδο ELISA σε 141 από τα 270 συνολικά εξετασθέντα δείγματα ορών τα οποία ελήφθησαν από πολυμεταγγιζόμενα άτομα (52,22%), πριν από την καθιέρωση του υποχρεωτικού ελέγχου των αιμοδοτών για ηπατίτιδα C.

Από τα 141 ELISA – θετικά δείγματα ορών απέβησαν θετικά και με τις δύο επιβεβαιωτικές δοκιμασίες Western blot 3ης γενιάς και RIBA 2ης γενιάς, τα 92 (65,2%), αμφίβολα τα 10 (7,09%) και αρνητικά τα 35 (24,8%).

Τέλος, μόνο σε 4 από τα 141 δείγματα το αποτέλεσμα μεταξύ των δύο επιβεβαιωτικών δοκιμασιών διέφερε μεταξύ αμφιβόλου και θετικού ή αμφιβόλου και αρνητικού.

Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι κανένα από τα 141 ELISA – θετικά δείγματα δεν απέβη θετικό με τη μία και αρνητικό με την άλλη επιβεβαιωτική μέθοδο.

Από τα αποτελέσματα αυτά σύμφωνα με τα οποία το ELISA θετικό αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώθηκε στο 1/3 περίπου (34,75%) των δειγμάτων, προκύπτει η αναγκαιότητα επιβεβαίωσης όλων των ELISA θετικών δειγμάτων προτού αυτά χαρακτηριστούν οριστικά ως θετικά.

Από τα συγκριτικά αποτελέσματα επιβεβαίωσης των ELISA θετικών δειγμάτων και με τις δυο δοκιμασίες δεν παρατηρήθηκαν, όπως προκύπτει από τον πίνακα 2 αξιόλογες διαφορές οι οποίες να δικαιολογούν την χρησιμοποίηση και των δυο επιβεβαιωτικών δοκιμασιών. Η επιλογή σύμφωνα πάντα με τα παραπάνω αποτελέσματα, εξαρτάται από τον εξοπλισμό, την εμπειρία και τέλος την προτίμηση κάθε εργαστηρίου. Από την διερεύνηση της προσιτής ελληνικής και διεθνούς βιβλιογραφίας δεν ανεβρέθησαν παρόμοιες εργασίες που να αφορούν στην συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δύο δοκιμασιών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκαν μόνο τα 92 δείγματα στα οποία το θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και με τις δύο μεθόδους. Τα υπόλοιπα 14 δείγματα δεν συμπεριλήφθηκαν στην τελική αξιολόγηση, ώστε η περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων να περιορίζεται στους 256 από τους 270 συνολικά εξετασθέντες ορούς (Πίν. 3). Όπως προκύπτει από αυτόν τον πίνακα η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στα 256 πολυμεταγγιζόμενα άτομα ηλικίας από 0 ως 40 ετών ανέρχεται σε 35,94%.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 4 δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων μεταξύ των δύο φύλων (άρρηνες 33,1%, θήλειες 36,9%). Το ίδιο ισχύει και για τη συχνότητα διαπίστωσης HBsAg (άρρηνες 12,3%, θήλειες 14,4%) και αντι-HBc αντισωμάτων (άρρηνες 43,7% και θήλειες 48,18%). Αν και οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές εν τούτοις δεν πρέπει να αποσιωπηθεί η παρατήρηση ότι στα θήλεα άτομα διαπιστώθηκαν υψηλότερες συχνότητες αντι-HCV αντισωμάτων, HBsAg και αντι-HBc αντισωμάτων από ότι στα άρρενα άτομα.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 3 η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας κατά τις πρώτες πέντε πενταετίες ηλικίας από 9,5% σε 70,6%, ενώ στα άτομα ηλικίας 26-40 ετών παρατηρείται μια ελάττωση της συχνότητας οροθετικών ατόμων από 70,6% σε άτομα ηλικίας 21-25 ετών, σε 47,6%. Η ελάττωση αυτή δεν παρατηρείται στις συχνότητες διαπίστωσης

HBsAg και αντι-HBc αντισωμάτων, οι οποίες αυξάνουν σταθερά με την πάροδο της ηλικίας από 6,3% σε 21,4% και 14,3% σε 76,1% στα άτομα ηλικίας 26-40 ετών.

Μια εύλογη εξήγηση για την μείωση της συχνότητας αντι-HCV αντισωμάτων μετά την ηλικία των 25 ετών είναι πιθανώς το μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης αντι-HCV θετικών πολυμεταγγιζόμενων ατόμων, ιδιαίτερα αν αυτά ταυτόχρονα είναι και φορείς του HBsAg.

Πράγματι τα περισσότερα άτομα ηλικίας άνω των 26 ετών το 1986, που έγινε η λήψη των δειγμάτων των ορών, είχαν προφανώς αρχίσει να μεταγγίζονται πριν από την καθιέρωση του υποχρεωτικού ελέγχου και για HBsAg.

Εάν η παραπάνω εξήγηση γίνει αποδεκτή, τότε η ομάδα πολυμεταγγιζόμενων ατόμων ηλικίας 25-40 ετών απαρτίζεται κατά ένα μεγάλο μέρος από επιβιώσαντα προφανώς αντι-HCV οροαρνητικά άτομα, τα οποία δικαιολογούν την παρατηρηθείσα μείωση της συχνότητας διαπίστωσης αντι-HCV αντισωμάτων, στην ομάδα αυτών των ηλικιών.

Παρόμοιες εργασίες στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκαν από τους Γκιώκα Α Καραμπίνη Φ και συν. (1991)· Πολίτη Κ, Βρεπτού Ε και συν. (1992)· Κοκκίνη Γ, Δρόσου Μ και συν. (1992)· Βασιλοπούλου-Καδά Ε, Δρόσου Μ και συν. (1992)· Μανωλάκη Ν (1996). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Γκιώκα Α, Καραμπίνη Φ και συν. η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε 44 πολυμεταγγιζόμενα άτομα βρέθηκε 15.9%. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA με αντιδραστήρια 1<sup>ης</sup> γενιάς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Πολίτη Κ, Βρεπτού Ε και συν. (1992) η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε 554 πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία ήταν 37,4%. Η συχνότητα αυτή κυμαίνεται σε ασθενείς κάτω των 16 ετών από 3,6% έως 8,3% και σε ασθενείς άνω των 16 ετών από 43,3% έως 63,8%. Όλοι αυτοί οι ασθενείς είχαν λάβει πάνω από 400 μονάδες αίματος. Αντίθετα σε ασθενείς αδιακρίτως ηλικίας, όπου είχαν λάβει λιγότερο από 200 μονάδες αίματος η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων κυμαίνοτο από 9,1% έως 19,4%.

Για τη διαπίστωση αντι-HCV αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή η μέθοδος ELISA με αντιδραστήρια 1ης γενιάς, χωρίς να ακολουθήσει επιβεβαίωση των θετικών δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα αυτά αν και δεν είναι απολύτως συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν με την μέθοδο ELISA αντιδραστήρια 2ης γενιάς, τα οποία χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλότερη ευαισθησία και τα θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκαν με τις μεθόδους RIBA 2ης γενιάς και Western blott 3ης γενιάς, εντούτοις συμφωνούν όσον αφορά την υψηλή συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς και την αύξηση της συχνότητας αυτής με την πάροδο της ηλικίας, η οποία κατά κανόνα συνδέεται στις περιπτώσεις μεσογειακής αναιμίας ευθέως ανάλογα με τον αριθμό των μεταγγισθέντων συνολικά μονάδων αίματος.

Σε μια άλλη εργασία (Κοκκίνη Γ, Δρόσου Μ και συν., 1992) η οποία πραγματοποιήθηκε και αυτή με ELISA και αντιδραστήρια 1ης γενιάς, τα θετικά όμως αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με RIBA, η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε 183 πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία ηλικίας 22-29 ετών, ήταν 45,9%.

Επίσης οι Βασιλοπούλου-Καδά Ε, Δρόσου Μ και συν. (1992) με την ίδια μέθοδο και αντιδραστήρια, χωρίς επιβεβαίωση των θετικών δειγμάτων, διαπίστωσαν σε 159 πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, αντι-HCV αντισώματα σε συχνότητα 7 έως 50,9%, ανάλογα με την ηλικία.

Τέλος η Μανωλάκη Ν (1996) σε 466 ασθενείς με μεσογειακή αναιμία, ηλικίας 1-35 ετών διαπίστωσε με την μέθοδο ELISA και αντιδραστήρια 2ης γενιάς, χωρίς επιβεβαίωση των ELISA θετικών δειγμάτων αντι-HCV αντισώματα σε αναλογία 50%.

Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με τα αντίστοιχα της παρούσης εργασίας, όπου πριν από την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, ηλικίας 0-40 ετών, ήταν 52,22%.

Σημειωτέον ότι η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στους Έλληνες αιμοδότες κυμαίνεται κατά κανόνα από 0,41% μέχρι 0,57% (Πολίτη Κ, Richardson SC, Κάλαντζάκης Ι, 1992· Πολίτη Κ, 1994· Ντουράκης ΣΠ. 1994).

Στον αιμοδοτικό πληθυσμό της Ηπείρου η συχνότητα διαπίστωσης αντι-HCV αντισωμάτων ήταν 0.6% (Ζερβού Ε και συν, 1998).

Εξαίρεση αποτελούν ορισμένες περιοχές, όπως η Κρήτη, όπου τοπικά διαπιστώθηκαν μικρότερα ή και μεγαλύτερα από τα προαναφερόμενα ποσοστά αντι-HCV οροθετικών αιμοδοτών με αποτέλεσμα η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στους αιμοδότες αυτής της περιοχής να κυμαίνεται από 0,35 - 1,6% (Κουρουμάλης Η, Μπιζιάγκος Ε, και συν, 1994· Τζαγκαράκης Ν, Κουρούσης Χ, και συν, 1995).

Τέλος σε μια ανασκόπηση της παρουσίας αντι-HCV αντισωμάτων σε αιμοδότες 25 χωρών αναφέρονται για την Ελλάδα ποσοστά οροθετικότητας 0,5 - 1,3% (Χατζηγιάννης ΣΙ. 1992).

Παρόμοιες μελέτες σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλες χώρες. Από την προσιτή σ' εμάς βιβλιογραφία για τέσσερις Ευρωπαϊκές χώρες τα αποτελέσματα συχνότητας αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Στην Ολλανδία οι Van den Poel CL, Reesink HW, et al (1991) διαπίστωσαν σε 213 πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς αντι-HCV αντισώματα με την μέθοδο ELISA και αντιδραστήρια 1ης γενιάς, σε συχνότητα 9%. Μετά την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων με τη μέθοδο RIBA, η συχνότητα αυτή μειώθηκε σε 1%. Σύμφωνα με τους Van den Poel CL, Reesink HW, et al (1991) η διαπιστωθείσα συχνότητα αντι-HCV οροθετικών αιμοδοτών σ' αυτή τη χώρα ήταν 0,1%.

Στην Δανία (Lund BV, Korsgaard N, Peterslund NA, 1991) σε 43 πολυμεταγγιζόμενα άτομα διαπιστώθηκε με την μέθοδο ELISA συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων 4,6%, ενώ η αντίστοιχη συχνότητα σε αιμοδότες σύμφωνα με μια άλλη εργασία ήταν 0,3% (Wantzin PS, Krogsgaard K, Dickmeiss E, 1990).

Στην Ιταλία σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Casopardo B, Russo R, et al (1992) σε 152 πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία, διαπιστώθηκε μετά την επιβεβαίωση των ELISA θετικών αποτελεσμάτων με RIBA συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων 47%. Στα ίδια άτομα η συχνότητα παρουσίας HBsAg ήταν 8%.

Σύμφωνα με τις εργασίες των Sirchia G, Almini D, et al (1990)· Chiaramonte M, Strofolini T, et al (1991)· Malaguti M, Capece R, et al (1992)· Lai ME, Mazzoleni AP, et al (1993)· Ciuffreda M, Terracina GM, et al (1994)· Marranconi F, Fabris P, et al (1994) το ποσοστό οροθετικών αιμοδοτών στην Ιταλία κυμαίνεται από 0,37% στο Τίβολι (Ciuffreda M, Terracina GM, et al, 1994) μέχρι 1,45% στη Σαρδηνία (Lai ME, Mazzoleni AP, et al, 1993).

Τέλος στη Ρουμανία σε μια εργασία των Antipa C, Popescu A, et al (1993) αναφέρεται συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε 61 πολυμεταγγιζόμενα άτομα, εξετασθέντα με την μέθοδο ELISA, 91,8% και σε 116 αιμοδότες 4,3%, ενώ σε μια άλλη εργασία (Ivan A, Azoicai D, et al, 1998) που αναφέρεται σε 51.149 αιμοδότες η διαπιστωθείσα συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων ήταν 2,6%.

Από παρόμοιες έρευνες, που πραγματοποιήθηκαν σε άλλες χώρες της Ευρώπης για τις οποίες δεν προέκυψαν από τη βιβλιογραφία συγκεκριμένα στοιχεία για την συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, αναφέρονται ποσοστά οροθετικών αιμοδοτών τα οποία κυμαίνονται: στη Γερμανία από < 0,1% μέχρι 0,42% (Seidl S, Kuhn P, et al. 1990· Abb J, 1991· Baur P, Roelcke D, 1991· Holzberger G, Seidl S, et al, 1992), στη Γαλλία από 0,26% έως 0,63% (Stuyver L, Fretz C, et al, 1996· Aguelles O, Janot C, 1992), στην Ισπανία από 0,3% μέχρι 1,2% (Sanchez-Tapias JM, Barrera JM, et al, 1990· Pastor JM, Hermosa V, et al, 1990· Martin Y, Marzo L, et al, 1990· Esteban JI, Lopez-Talavera JC, et al, 1991· Martinez JL, del Hierro J, et al, 1991· Esteban JI, Lopez-Talavera JC, et al, 1992· Suarez A, Rodriguez M, et al, 1994· Munoz-Gomez R, Garcia-Monzon C, et al, 1996· Salmeron FJ, Palacios A, et al, 1996), στη Ρωσία από 0,93% σε εθελοντές αιμοδότες μέχρι 7,5% σε επαγγελματίες

αιμοδότες (Abdourakhmanov DT, Hasaev AS, et al, 1998). Τέλος σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Αγγλία, η Σκωτία, η Νορβηγία και η Ουγγαρία (Brind AM, Codd AA, et al, 1990· Crawford RJ, Gillon J, et al, 1994· Hetland G, Skuag K, et al, 1990· Par A, Kantor I, et al, 1991) κυμαίνονται από 0,088% στη Σκωτία (Crawford RJ, Gillon J, et al, 1994) μέχρι 1,6% στην Ουγγαρία (Par A, Kantor I, et al, 1991).

Από παρόμοιες έρευνες σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, που έχουν πραγματοποιηθεί σε χώρες άλλων ηπείρων και περιήλθαν σε γνώση μας από τη διερεύνηση της διεθνούς βιβλιογραφίας συγκεκριμένα στοιχεία, που να αφορούν στη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα και αιμοδότες προκύπτουν για την Ινδία, την Αίγυπτο και τη Βραζιλία.

Στην Κεντρική Ινδία οι (Jaiswal SP, Chitnis DS, et al, 1996) διαπίστωσαν σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων 25,45% και σε αιμοδότες 1,78%. Στο Δελχί οι Aggarwal V, Prakash C, et al (1997) διαπίστωσαν σε πολυμεταγγιζόμενα παιδιά συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων 31,3%. Η συχνότητα αντι-HCV οροθετικών αιμοδοτών σύμφωνα με μια άλλη έρευνα στην ίδια περιοχή (Panigrahi AK, Panda SK, et al, 1997) ήταν 1,85%. Σε αντίστοιχη έρευνα στο Μουμбай οι Gosavi MS, Shah SK, et al (1997) διαπίστωσαν σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων 36,4% και σε εθελοντές αιμοδότες 15,9%. Οι ίδιοι ερευνητές τονίζουν ότι η διαπιστωθείσα υψηλή συχνότητα στους αιμοδότες πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο.

Τέλος στην Γκουαντελούπη (al Karawi MA, Shariq S, et al, 1992), στην Τζαμάϊκα (Naman RE, Mansour I, et al, 1996) και στην Βόρεια Ινδία (Soetjipto, Handajani R, et al, 1996), διαπιστώθηκαν ποσοστά αντι-HCV οροθετικών αιμοδοτών 0,8%, 0,3-0,4% και 1,49% αντίστοιχα.

Στην Αίγυπτο οι Abdel-Wahab MF, Zakaria S, et al (1994) διαπίστωσαν συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενα παιδιά 54,9%, ενώ στην ίδια χώρα οι el Gohary A, Hassan A, et al (1995) διαπίστωσαν συχνότητα 75,6%

σε παιδιά με μεσογειακή αναιμία. Σύμφωνα με τις εργασίες των Darwish NM, Abbas MO, et al (1992)· Darwish NM, Raouf TA, et al (1993)· el Gohary A, Hassan A, et al (1995)· Bassily S, Hyams KC, et al (1995)· Quinti I, Renganathan E, et al (1995), το ποσοστό των οροθετικών αιμοδοτών στην Αίγυπτο κυμαίνεται από 14,4% (Darwish NM, Abbas MO, et al, 1992· el Gohary A, Hassan A, et al, 1995) έως 26,6% (Bassily S, Hyams KC, et al, 1995).

Στη Βραζιλία οι Covas DT, Boturao Neto E, Zago MA (1993) σε 32 πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακή αναιμία διαπίστωσαν συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων 46,8%. Σε τρεις εργασίες, που αναφέρονται στη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε αιμοδότες στην ίδια χώρα διαπιστώθηκαν αντι-HCV αντισώματα σε αναλογία 3,1% (Leite NC, Nogueira CM, et al, 1992), 2,7% (Vanderborght BO, Reis AM, et al, 1993), 1,14% (Vasconcelos HC, Yoshida CF, et al, 1994).

Επιπλέον από τις εργασίες που αφορούν στη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε χώρες της Ασίας, Αφρικής, Αυστραλίας, Αμερικής και Η.Π.Α., για τις οποίες δεν κατέστη δυνατόν να περιέλθουν εις γνώση μας συγκεκριμένα στοιχεία για τη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, αναφέρονται ενημερωτικά τα ποσοστά οροθετικών αιμοδοτών, τα οποία κυμαίνονταν: στην Ιαπωνία από 0,29% έως 3,9% (Boonmar S, Rojanagaroon B, et al, 1990· Tanaka E, Kiyosawa K, et al, 1992· Oguchi H, Miyasaka M, et al, 1992· Tanaka H, Tsukuma H, et al, 1998), στην Κίνα από 0,3% σε εθελοντές αιμοδότες ως 5,7% σε επαγγελματίες αιμοδότες (Zhang YY, Yan XB, Li FH. 1991· Ng YY, Lee SD, et al, 1991· Zhang YY, Guo LS, et al, 1993· Tang S, 1993· Wu X, 1993· Wang Y, Tao QM et al, 1994· Wu RR, Mizokami M, et al, 1995), ενώ στην αυτόνομη Μογγολία το ποσοστό οροθετικότητας ανέρχεται σε 31,86% (Tang S, 1993), στην Taiwan από 0,8% ως 2,2% (Chen DS, Kuo GC, et al, 1990· Wu JS, Lu CF, et al, 1991· Chen DS, Wang JT, et al, 1991· Wu JS, Lu CF, et al, 1992· Sawanpanyalert P, Boonmar S, et al, 1996), στο Ισραήλ από 0,44% ως 0,66% (Bar-Shany S, Green MS, et al, 1995· Stern M, Manny N, et al, 1995), στην



Ινδονησία από 1,6% έως 2,3% (Timan IS, Latu J, et al, 1993· Sulaiman HA, Julitasari, et al, 1995· Soetjipto, Handajani R, et al, 1996) και στη Σαουδική Αραβία από 1,5% έως 3,9% (Ayoola EA, Huraib S, et al, 1991· al Karawi MA, Shariq S, et al, 1992).

Τέλος σε άλλες Ασιατικές χώρες όπως οι Φιλιππίνες, η Κορέα, η Ταϊλάνδη, ο Λίβανος, η Μαλαισία, το Μπαγκλαντές, το Ομάν, το Πακιστάν και η Σιγκαπούρη (Katayama Y, Barzaga NG, et al, 1996· Kim BS, Park YM, 1993· Petchclai B, Srivatanakul P, et al, 1992· 89, 93, 94, Naman RE, Mansour I, et al, 1996· Sinniah M, Ooi BG, 1993· Khan M, Husain M, et al, 1993· al-Dhahry Sh, Aghanashinakar PN, et al, 1993· Kakepoto GN, Bhally HS, et al, 1996· Kuperan P, Choon AT, et al, 1993), ήταν από 0,41% στο Λίβανο (Naman RE, Mansour I, et al, 1996) μέχρι 3,0% στη Μαλαισία (Sinniah M, Ooi BG, 1993).

Σε χώρες της Αφρικής όπως η Αιθιοπία, η Τυνησία, η Ν. Αφρική, η Αλγερία, η Κένυα, το Μαρόκο, (Frommel D, Tekle-Haimanot R, et al, 1993· Tsega E, Nordenfelt E, Hansson BG, 1995· Slama H, Mojaat N, et al, 1991· Abid S, Fkih S, et al, 1997· Ellis LA, Brown D, et al, 1990· Ayez Z, Houinato D, et al, 1995· Ilako FM, McLigeyo SO, et al, 1995· Benjelloun S, Bahbouhi B, et al, 1996· Tucker TJ, Voigt M, et al, 1997· Mwangi JW, 1999) ήταν από 0,18% στην Αλγερία (Ayez Z, Houinato D, et al, 1995) μέχρι 1,8% στην Κένυα (Mwangi JW, 1999).

Στην Αυστραλία ήταν από 0,45% έως 0,55% (Archer GT, Buring ML, et al, 1992· Mison LM, Young IF, et al, 1997). Στις Η.Π.Α. (Stevens CE, Taylor PE, et al, 1990· Hyams KC, Cross ER, et al, 1992· Chuang TY, Brashear R, Lewis C, 1999) από 0,17% (Chuang TY, Brashear R, Lewis C, 1999) μέχρι 1,4% (Stevens CE, Taylor PE, et al, 1990). Στο Μεξικό (Merino-Conde E, Orozco JA, et al, 1994· Hernandez-Perez RE, Frias-Salcedo JA, Del Angel-Guevara O, 1994· Islas S, Yamaguchi K, et al, 1994· Guerrero-Romero JF, Castaneda A, Rodriguez-Moran M, 1996· Mendez-Sanchez N, Baptista-Gonzalez H, et al, 1999) από 0,4% (Mendez-Sanchez N, Baptista-Gonzalez H, et al, 1999) μέχρι 1,47% (Guerrero-Romero JF, Castaneda A, Rodriguez-Moran M, 1996).

Τέλος σε άλλες χώρες της Αμερικής όπως η Βενεζουέλα, η Κούβα και η Χιλή (Muller G, Zabaleta M, et al, 1990· Galban Garcia E, Padron G, et al, 1992· Munoz G, Velasco M, et al, 1998) από 0,3% (Munoz G, Velasco M, et al, 1998) μέχρι 1,5% (Galban Garcia E, Padron G, et al, 1992).

Μια συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών που προκύπτουν από την προσιτή σε μας διεθνή βιβλιογραφία δεν είναι απόλυτα εφικτή, ιδίως σε ότι αφορά τα αποτελέσματα από χώρες των άλλων ηπείρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές τεχνικές, ενώ σε άλλες δεν αναφέρεται καθόλου η χρησιμοποιηθείσα τεχνική, και αν τα αντι-HCV θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκαν και με μια άλλη μέθοδο.

Επίσης η σύνθεση του εξετασθέντος δείγματος, όσον αφορά το φύλο και την ηλικία, ήταν διαφορετική, ή ο αριθμός των εξετασθέντων ατόμων, πολύ μικρός για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Είναι όμως προφανές ότι η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στους αιμοδότες των περισσότερων χωρών αντικατοπτρίζεται στη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων στα πολυμεταγγιζόμενα άτομα. Επιπλέον η συχνότητα αυτή εξαρτάται από το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο των διάφορων χωρών και την υγειονομική τους ανάπτυξη.

Παρά τα αναφερθέντα συγκριτικά μειονεκτήματα, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα, που προκύπτουν, από την ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία, μας επιτρέπουν να καταλήξουμε στα παρακάτω συμπεράσματα.

(1) Ο έλεγχος των αιμοδοτών για αντι-HCV αντισώματα είναι επιβεβλημένος ακόμα και σε χώρες με μικρό επιπολασμό ηπατίτιδας C και κατ' επέκταση με χαμηλά ποσοστά αντι-HCV οροθετικών αιμοδοτών.

(2) Ο έλεγχος αυτός είναι περισσότερο αποτελεσματικός εφ' όσον χρησιμοποιούνται γι' αυτόν αντιδραστήρια δεύτερης και τρίτης γενιάς.

(3) Παρά τη σημειωθείσα βελτίωση των αντιδραστηρίων η επιβεβαίωση των ELISA θετικών δειγμάτων και με άλλη μέθοδο, εξακολουθεί να είναι απαραίτητη.

(4) Αξιόλογες διαφορές στη συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων μεταξύ των δύο φύλων σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, μέχρι σήμερα δεν έχουν διαπιστωθεί. Η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων, τόσο στους αιμοδότες, όσο και σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα, αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας την οποία ακολουθεί και ο αριθμός των μεταγγιζόμενων μονάδων.

Τα ευεργετικά αποτελέσματα του ελέγχου των αιμοδοτών, θα εκτιμηθούν οριστικά σε άτομα τα οποία άρχισαν να μεταγγίζονται μετά την καθιέρωση του προληπτικού ελέγχου.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της εργασίας αυτής υπήρξε η μελέτη της μεταμεταγγισιακής μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C με την προοπτική τα αποτελέσματα να χρησιμοποιηθούν για την διαπίστωση του βαθμού και των παραγόντων που συμβάλλουν στη μεταμεταγγισιακή μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας C.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εξετάσθηκαν 270 δείγματα ορών πολυμεταγγιζόμενων ατόμων. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν στο πλαίσιο μιας άλλης έρευνας προτού καθιερωθεί ο υποχρεωτικός έλεγχος των αιμοδοτών για αντι-HCV αντισώματα.

Οι προσδιορισμοί των αντισωμάτων έγιναν με τη μέθοδο Elisa και αντιδραστήρια δεύτερης γενιάς του οίκου Abbott. Τα θετικά δείγματα ελέγχθηκαν με τη συμπληρωματική μέθοδο EIA supplemental assay και τα θετικά επιβεβαιώθηκαν με τις δοκιμασίες RIBA 2<sup>ης</sup> γενιάς του οίκου Chiron και Western blot 3<sup>ης</sup> γενιάς του οίκου Murex.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε 92 από τα 141 Elisa θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκε η παρουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C και με τις δύο μεθόδους, RIBA 2<sup>ης</sup>

γενιάς και Western blot 3<sup>ης</sup> γενιάς (65.25%), σε 35% από τα 141 δείγματα το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό (24.8%), ενώ σε 10 δείγματα ήταν αμφίβολο (7.09%). Σε 4 δείγματα, το αποτέλεσμα απέβη αμφίβολο με τη μια μέθοδο και θετικό ή αρνητικό με την άλλη, ενώ κανένα δείγμα δεν απέβη θετικό με τη μία ή αρνητικό με την άλλη μέθοδο. Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής το Elisa-θετικό αποτέλεσμα δεν επιβεβαιώθηκε στο 1/3 περίπου των δειγμάτων. Προκύπτει λοιπόν η αναγκαιότητα επιβεβαίωσης όλων των Elisa-θετικών δειγμάτων με μέθοδο ανοσοαποτύπωσης δεύτερης ή τρίτης γενιάς. Από τα συγκριτικά αποτελέσματα επιβεβαίωσης των Elisa-θετικών δειγμάτων και με τις δύο δοκιμασίες δεν παρατηρήθηκαν αξιολογικές διαφορές, οι οποίες να δικαιολογούν τη χρησιμοποίηση και των δύο επιβεβαιωτικών δοκιμασιών. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων (άρρηνες 33.1%, θήλειες 36.9%). Η συχνότητα αντι-HCV αντισωμάτων αυξάνει με την παροδο της ηλικίας κατά τις πέντε πρώτες πενταετίες ηλικίας, ενώ παρατηρείται μια ελάττωση της συχνότητας οροθετικών ατόμων σε άτομα ηλικίας 26-40 ετών.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Συμπερασματικά, ο έλεγχος των αιμοδοτών για αντι-HCV αντισώματα είναι επιβεβλημένος ακόμα και σε χώρες με μικρό επιπολασμό ηπατίτιδας C, είναι πιο αποτελεσματικός όταν χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια δεύτερης και τρίτης γενιάς, η δε επιβεβαίωση των Elisa θετικών δειγμάτων, παρά τη σημειωθείσα βελτίωση των αντιδραστηρίων, εξακολουθεί να είναι απαραίτητη.

# **SUMMARY**

## **Detection of anti-Hepatitis C Virus Antibodies in Mutlitransfused Individuals.**

**Eleftheria Deska**  
**Medical Microbiologist**

### **INTRODUCTION**

The purpose of this study looks into the infection of the Hepatitis C virus through the transfusion, as well as the prospects of using these results to determine the degree and the circumstances which contribute to the infection through transfusion of the Hepatitis C virus.

### **METHODS**

270 serum samples of multitransfused individuals were examined. These samples were collected during the conduction of a research protocol before the application of compulsory tests on blood donors for the detection of anti-HCV antibodies.

Determination of the antibodies was made using the ELISA method and a second generation reactor by Abbott Labs. Positive samples were further examined by carrying out supplementary tests using EIA supplementary assay and to those found positive prior to this examination the Riba 2<sup>nd</sup> generation test

by Chiron and the Western blot 3<sup>rd</sup> generation by Murex were applied for verification.

## **Results**

The presence of particular antibodies to Hepatitis C virus was evident in 92 of the 141 Elisa positive samples in both methods, Riba 2<sup>nd</sup> generation and Western blot 3<sup>rd</sup> generation (65.25%), whereas 35% of the 141 samples had negative results (24.8%) and 10 (7.09%) samples were doubtful. Moreover, 4 samples were indeterminate with one of the methods and positive or negative with the other. The results of this study did not verify the ¼ of the Elisa-positive samples. Evidently, it is necessary to verify all Elisa-positive samples using immunoblotting of 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> generation. The comparative results of the verified by both tests Elisa-positive samples presented no significant differences, which could not, therefore, justify the use of both ascertaining tests. No significant differences were observed between sexes (male 33.1%, female 36.9%). The frequency of anti-HCV antibodies increases with age at the first 5 decades of age, whereas a reduction of serum-positive individuals is evidenced at the age of 26-40.

## **Conclusion**

Retrospecting the results of this study, we come to the conclusion that obligatory screening of blood donors for the detection of anti-HCV antibodies should be performed, even in countries that present a low Hepatitis C prevalence, based on the reliability and efficiency of of 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> generation reactors. Yet, despite the evident improvement of the specificity and sensitivity of these reactors, it is still essential to confirm Elisa-positive samples.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- Aach RD, Kahn RA. Post transfusion hepatitis: current perspectives. *Ann In Med* 1980; 92: 539-546.
- Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Puriell RH, Feistone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion associated hepatitis *Lancet* 1975; 2: 838-841.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to HCV in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-1500.
- Alter HJ. Chronic consequences of non-A, non-B hepatitis. In Seeff LB., Lewis JH (eds). *Current Perspectives in hepatology*. Plenum Medical, New York, 1989: 83-97.
- Alter HJ. Transmission of hepatitis C virus route, dose and titer. *N Engl J Med* 1994; 330: 784-786.
- Arima T, Nagashima H, Murakami S, et al. Cloning of cDNA associated with amfe and chronic hepatitis C infection generated from patients serum RNA. *Gastroenterol Jpn* 1989; 14: 381-388.



- Arima T, Takamizawa A, Mori C, et al. A lambda gt 11 cDNA clone specific for chronic hepatitis C generated from pooled serum presumably infected by hepatitis C virus. *Gastroenterol Jpn* 1989; 24: 545-548.
- Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of HCV polyprotein processing. *J Virol* 1994; 68: 5045-5055.
- Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Yasargil K, Mous J, Jacobsen H. Substrate determinants for cleavage in cis and in trans by the Hepatitis C virus NS<sub>3</sub> proteinase. *J Virol* 1995; 69: 198-205.
- Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Non structural protein 3 of the HCV encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS<sub>3/4</sub> and NS<sub>4/5</sub> junction. *J Virol* 1993; 67: 3835-3844.
- Bi Bisceglie AM, Hoofnagle JH, Krawczynski K. Changes in HCV antigen in liver with antiviral therapy. *Gastroenterology* 1993; 105: 858-862.
- Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weimer AJ, Choo Q-L, Shuster JR, Kuo G, Bonino F, Houghton M, Abrignani ST. T lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 580-587.
- Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zaldis JB. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1276-1280.
- Boyer. In Ackerman's Surgical Pathology The cV Mosby, ST Louis, Toronto-Washington DC. 1989.
- Braddley BW, Cook EH, Maynard JE, και συν. Experimental infection of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979; 3: 253-269.
- Braddley BW, Maynard JE, Cook EH, et al. Non-A/non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees: Cross-challenge and electron microscopic studies. *J. Med Virol* 1980; 6: 185: 201.
- Braddley DW, Krawczynski K, Beach M, Purdy MA. Non-A, non-B hepatitis: toward the discovery of hepatitis C and E viruses. *Sem Liv Dis* 1991, 11: 128-146.

- Braddley DW, Maynard JE. Etiology and natural history of post-transfusion and enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Semin Liver Dis* 1986, p: 56-66.
- Bradley DW, Mc Caustland KA, Cook EH, και συν. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanjees: physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779.
- Cargnel A, Viganò P, Daveli C, Morreli R, Rerna Mc, Mariscotti C. Sporadic acute NANB hepatitis complicated by aplastic anaemia *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 245-247.
- Centers For Disease Control. a. Hepatitis C. *MMWR* 1991; 40: 13-14.
- Centers For Disease Control. b. Organs, Tissues and Semen For Evidence of hepatitis B and hepatitis C, *MMWR* 1991; 40: 8-16.
- Cerny A, McHutchinson JG, Pasquinelli C, Brown ME, Brothers MA, Gradscheid B, Fowler P, Houghton M, Chisari FV. Hepatitis C virus specific cytotoxic T cell response: Identification of multiple HLA-A2 restricted epitopes. *J Clin Invest* 1995; 95: 521-530.
- Champers TJ, Hahy CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990; 688: 649-688.
- Chann SW, Mc Omich F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follet E, Yap PL, Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131-1141.
- Chau KC, Dawson GJ, Mushawer IK, et al. IgM-antibody response to hepatitis C virus antigens in acute and post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *J Virol Meth* 1991; 343-352.
- Chemello L, Cavalletto D, Pontisso P, Bortolotti F, Donada C, Donadon V, Frezza M, et al. Patterns of antibodies to hepatitis C virus in patients with chronic non-A, non-B hepatitis and their relationship to viral replication and liver disease. *Hepatology* 1993; 17: 179-182.
- Choo Q-L, Kuo G, Weiner A, Overby LR, Braddley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-361.

- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Braddley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-2455.
- Choo Q-L, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B, hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46: 423-441.
- Cleares GR, Ryan TE, Schlesinger PW. Identification and characterization of type 2 Dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology* 1981; 111: 73-83.
- Cohen JI: Hepatitis A virus. Insights from molecular biology. *Hepatology* 1989; 9: 889.
- Collet MS, Anderson DK, Retyel E, Comparisons of the pestivirus borine viral diarrhea virus with members of the flaviviridae *J Gen Virology* 1988; 69: 2637-2643.
- Dalekos GN, Zervou E, Merkouropoulos MH, Tsianos EV. Prevalence of hepatitis B and C viruses infection in chronic alcoholics with or without liver disease in Ionnina, Greece: Low incidence of HCV infection. *Eur J Epidemiol* 1996; 12: 21-25.
- Del Prete GF, DeCarli M, Mstromauro C, Piagiotti R, Maccia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivate of *Mycobacterium tyberculosis* and excretorysecretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and poopsite (type I T helper or type II T helper) profile of cytokine prodyction. *J Clin Invest* 1991; 88: 246-352.
- Dhumeaux D, Daffoel M, Galnuche JP. A French consensus conference of hepatitis C screening and treatment. *J Hepatol* 1997; 27: 941-944.
- Dienes HP, Popper H, Arnold W, Lobeck H. Histologic Observations in human NANB. *Hepatology*, 1982; 2: 562-571.
- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierengatonio E, Jung MC, Eichenlaud D, Pape GR. Possible involving T-lymphocyte response to nonstructural protein 3 in viral acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346: 1006-1007.

- Doherty PC, Allan W, Eichelberger M. Roles of T cell subsets in viral immunity. *Am Rev Immunol* 1992; 10: 123-151.
- Elisaf M, Tsianos E, Mavridis A, Dardamanis M, Pappas M, Siamopoulos KC. Antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV) in haemodialysis patients : Association with hepatitis B serological markers. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 476-479.
- Encyclopedia of Virology: Third edition.
- Ezzel C. Candidate lause identified of non-A, non-B hepatitis. Elusive virus isolated after long search. Potential marker for blood screening (news) *Nature* 1988; 331-195.
- Faila C, Tomei L, De Francesco R. Both NS<sub>3</sub> and NS<sub>4</sub>A are required for proteolytic processing of HCV nonstructural proteins. *J Virol* 1994; 68: 3753-3760.
- Farci P, Alter HJ, Goundavajan S. Lack of protective immunity against reinjection with HCV, *Science* 1992; 258: 135-140.
- Feistone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion - associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New England J Med* 1975; 292: 767-770.
- Feistone SM. Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of avirus-like particle associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026.
- Feistone SM. Hepatitis C virus *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991; 3: 572.
- Ferrari C, Vaili A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianchi C, Messale G, Marin MG, Fiaccadori F. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* 1994; 19: 286-295.
- Fong TL, Shindo M, Feistone S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* 1991; 88: 1056-1060.
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown G. (eds) Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international Committee Taxonomy of viruses. *Arch viral* 1991 (Suppl 2): 223.
- Garson JA, Lenzi M, Ring C. HCV viraemia in adults with type 2 autoimmune hepatitis. *J Med Virol* 1990; 34: 223-226.

- Gary L, Davis, Johnson YN, Lau. Hepatitis C. *Gastroenterology* 1993; 109: 2083-2087.
- Gerin JL, Purcell RH and Rizzetto M. The hepatitis Delta virus. N. York: Wiley - Liss. 1991.
- Γκιώκα Α, Καραμπίνη Φ, Ζερβού Ε, Χασιώτου Π, Αναστασόπουλος Δ, Κολαίτης Ν. Οροεπιδημιολογική μελέτη της λοίμωξης από ιό ηπατίτιδας C (HCV) σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα στην Ήπειρο. *Δελτίο Ελλ. Μικροβ. Εταιρείας* 1991; 36: 346-351.
- Goldfield M, Bill J, Black H, Piyutti W, Shihongs S. Hepatitis associated with the transfusion of HB -negative blood. In Vuas GN, Perkins HA, Sahmid RS eds. *Hepatitis and blood transfusion*. New York: Grune and Stratiton, 1972: 353-361.
- Grady GF, Bennet AJE. Risk of posttransfusion hepatitis in the United states: a prospective cooperative study. *JAMA* 1972; 220: 692-701.
- Grakoui A, Mc Court DW, Wychowski C, Feistone SM, Rice CM. Characterization of the HCV- encoded serine proteinase: determination of proteinase - dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993; 67: 2832-2843.
- Grakoui A, McCourt BW, Wychavski C, Feistone SM, Rice CM. A second hepatitis C -encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10583-10587.
- Hadziyannis SJ, Dourakis SP, Papaioannou Ch, Alexopoulou A, Hadziyannis ES, Gioustozi A. Changing epidemiology and spreading modalities in hepatitis delta virus injection in Greece. *Prog Clin Biol Res* 1993; 382: 259-266.
- Hallewell RA, Masiarj FR, Najarian RC, και συν. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesising high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 2017-2034.
- Han JH, Shyamala V, Richman KH, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 1991; 88:1711-1715.
- Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshis, Shimotohno K. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus, *Biochem Biophys. Res Commun* 1991; 175: 220-228.

- Hijikata M, Nizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiushi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67: 4665-4675.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y, et al. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core envelope and NS<sub>3</sub> regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology* 1992; 16: 306-311.
- Hirowatari Y, Hijikata M, Tanji Y, Nyunoya H, Mizushima H, Kimura K, Tanaka T, Kato N, Shimotohno K. Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cell using baculovirus vector. *Arch Virol* 1993; 133: 349-356.
- Hoffman PM, Diepolder HM, Zachoval R, Zwiebel FM, Jung M-C, Scholz S, Nitschko H, Riethmuller G, Pape GR. Mapping of immunodominant CD4<sup>+</sup> T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* 1995; 21: 632-638.
- Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, και ουν. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion - transmitted viruses study Group. *Intervirology* 1978; 10: 60-68.
- Hollinger FB, Mosley JW, Szmunness W, Aach RO, Peters RL, Stevens C. Transfusion-transmitted Viruses Study: experimental evidence for two non-A, non-B hepatitis agents. *J Inf Dis* 1980; 142: 400-407.
- Hollinger FB, Mosley JW, Szmunness W, et al. Non-A, Non-B hepatitis following blood transfusion risk factors associated with donor characteristics. In: Szmunness W., Alter HJ., Maynard JE eds. *Viral hepatitis - 1981 international symposium*. Philadelphia. Franklin institute Press, 1981: 161-176.
- Hoofnagle JH, Genety RJ, Tabor E, et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis. *An Inter Med* 1977; 87: 14-20.
- Hosein B, Fang CT, Propovsky MA, Ye J, Zhang ML, Wang CY. Improved serodiagnosis of HCV infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3647-3651.
- Houghton M, Choo Q-L, Selby A. Hepatitis C viruses. Highly heterogeneous relatives of flaviridae family causing persistent infection, 8<sup>th</sup> Intern Symp.

Viral Hepatitis and Liver Disease, May 10-14, 1994, Tokyo, Abstract vol. p. 41.

Houghton M, Weiner A, Han J, και συν. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-388.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Sujukis, Kohara M, Hepatitis C virus particles detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994; 75: 1755-1760.

Kanazawa Y, Hayashi N, Mita E, et al. Influence of viral quasi-species on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 1994; 20: 1121-1130.

Καραγιάννης σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1995.

Kato M, Ootsuyama Y, Tanaka T, Nakagawa M, Nakagawa T, Muraiso K, Ohkoshi S, Hijikata M, Shimotohno K. Marked sequence diversity in the putative envelope protein of hepatitis C viruses. *Virus Res* 1992; 22: 107-123.

Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, και συν. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9524-9528.

Khuroo MS. Study of an epidemic of NANB hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion, NANB type. *Am J Med* 1980; 68: 818-824.

Kita H, Moriyama T, Kaneko T, Harase I, Nomura M, Miura H, Nakamura I, Yazaki Y, Imawari M. HLA B-44 restricted cytotoxic T lymphocytes recognising an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Hepatology* 1993; 18: 1039-1044.

Koff RS. Problem hepatitis C viruses the mutants. *Am J Med* 1994; 96: 525-565.

Κοσκίνας Ι. Γονότυποι και ορότυποι ηπατίτιδας C, σε Ηπατίτιδα C, Σ.Ι. Χατζηγιάννη, εκδόσεις Πασχαλίδη). 1995.

Koscinas J, Mc Farlane B, Nouri-Aria K et al. Cellular immune responses to hepatitis C -core and GOR peptides in chronic HCV patients. *J Hepatol* 1993; 18 (suppl 1): S28 (Abstract).

- Koziel MJ, Darryll D, Afdhal N, Choo Q-L, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 1993; 67: 7522-7532.
- Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DM, Kuo G, Di Bisceglie AM, Houghton M, Reyes GR, Kim JP, Choo Q-L, Alter JM. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992; 103: 622-629.
- Kyo G, Choo QL, Alter GL, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
- Lasarte J-J, Sarobe P, Gullon A, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Induction of cytotoxic T lymphocytes in mice against the principal neutralising domain of HIV-1 by immunisation with an engineered T-cytotoxic-T-helper synthetic peptide construct. *Cell Immunol* 1992; 141: 561-564.
- Laun TYN, Davis GL, Orito E, Qrito E, Quian K-P, Mizokami M. Significance of antibody to the host cellular gene derived epitope GOR in chronic HCV infection. *J Hepatol* 1992; 17: 253-257.
- Lemon SM. Type A viral hepatitis: new developments in an old disease. *N Engl J Med* 1985; 313: 1059.
- Lemon SM. Hepatitis A virus: current concepts of the molecular virology, immunobiology and approaches to vaccine development. *Rev Med Virol* 1992; 2: 73.
- Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U, Zaudi D, Bianchi FB. Type 2 autoimmune hepatitis and HCV infection. *Lancet* 1990; 335: 258-259.
- Lenzi M, Johnson PT, McFarlane IG, Ballardini G, Smith HM, McFarlane BM, Bridger C, Vergani D, Bianchi FB, Wikkams R. Antibodies to HCV autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity *Lancet* 1991; 338: 277-280.
- Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E<sub>2</sub>-NS<sub>2</sub> region: Identification of p7 and two distinct E<sub>2</sub>-specific products with different C terminus. *J Virol* 1994; 68: 5063-5073.
- Lohr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer Zum Buschenfeldt KH, Fleischer B. The human asialo-glycoprotein receptor is a target antigen for liver -



infiltrating T cells in autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12: 1314-1320.

Lohr HF, Elste C, Diens HP, Michel G, Braum H-B, Meyer zum Buschenfelde K-H, Gerken G. The quantitative humoral immune response to the hepatitis C virus is related to disease activity and the outcome from therapy. *J Hepatol* 1996; 25: 292-300.

Lohr HF, Gerken G, Schlicht H-J, Meyer zum Buschenfelde K-H, Fleischer B. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenously processed surface and core proteins in chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 1993; 168: 1133-1139.

Lohr HF, Schlaak JF, Gerken G, Fleischer B, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde K-H. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* 1994; 14: 161-166.

Lohr HF, Schlaak JF, Kollmannsperger S, Meyer zum Buschenfelde K-H, Gerken G. Liver-infiltrating and peripheral blood T cells in chronic hepatitis C: Immunodominant epitopes, HLA-restriction and functional significance. *Liver* 1995; 24: 172-184.

Long EO, Jacobson S. Pathways of viral antigen processing and presentation to CTL. *Immunol Today* 1986; 10: 45-48.

Lunel F, Loiseau P, Cresta P, et al. Symptomatic cryoglobulinemia in patient with hepatitis C: role of HCV genotypes and viremia. *Hepatology* 1994: 20-253 A (Abstract).

Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. In progress in *Hepatology*. Migyet IP, Dhummeaux D (Eds). Paris 1993; p. 79-88.

Manns MP et al. 36<sup>th</sup> EASL Meeting, Abstract 1624, 2001.

Mast S, Gerberding JL. Factors predicting needle stick infectivity exposure to HCV: An in vitro model. *Clin Res* 1991; 39: 2.

Mc Farlane BM, Mc Sorley CG, Vergani D, Mc Farlane IG, Williams R. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialo-glycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol* 1986; 3: 196-205.

- McHutchison JG. Extended treatment for patients at risk of relapse. Pegintron (Pegylated Interferon Alfa-2b). Optimizing the treatment of HCV. Schering-Plough Conference Newsletter, Madrid, Spain, 2000.
- Michiro S, Hoshi Y, Takeda K, Yoshikawa A, Gotanda T, Takahashi K, Akahane Y, et al Non-A non-B hepatitis specific antibodies directed at host-derived epitope: implication for an autoimmune process. *Lancet* 1990; 336: 1400-1403.
- Minutello MA, Pirelli P, Unutmaz D, Censini S, Kuo G, Houghton M, Brunetto MR, Bonino F, Abrignani S. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: Intrahepatic CD4<sup>+</sup> T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 1993; 178: 17-25.
- Mishiro S, Takeda K, Hoshi Y, Yoshikawa A, Gotanda T, Itoh Y. An autoantibody cross-reactive to HCV core and host nuclear antigen. *Autoimmunity* 1991; 10: 269-273.
- Mishiro S, Hoshi Y, Takeda Y, Yoshikawa A, Gotanda T, Takahashi K, Akahane Y, Yoshizawa H, Okamoto H, Tsudo F, Peterson DA., Muchmore E. Non-A, non-B hepatitis specific antibodies directed at host - derived epitope: implication for an autoimmune process. *Lancet* 1980; 336: 1400-1403.
- Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviours of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
- Mosley JW, Redeker AG, Feistone SM, Puriell RH. Multiple hepatitis viruses in multiple attacks of acute viral hepatitis. *New England Journal of Medicine* 1977; 296: 75-78.
- Mosley JW. Viral hepatitis: a group of epidemiologic entities. *Can Med Assoc J.* 1972; 106: 427-434.
- Muller HM, Praff E, Goeser T, Kallinauski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leucocytes serve as possible extrahepatic site for HCV replication. *J Gen Virol* 1993; 74: 669-676.
- Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Synergism between tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for

the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1992; 22: 301-307.

Nagayama R, Tsuda F, Okamoto H, Wang H, Mitsui T, Tanaka T, Miyakama Y, Mayami M. Genotype dependence of HCV antibodies detectable by the first generation enzyme-linked immunosorbent assay with C100-3 protein. *J Clin Invest* 1993; 92: 1529-1533.

Negro F, Pacchioni D, Shimizu, et al. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C. Virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2247-2251.

Νταλέκος ΓΝ, Μπούμπα Δ, Ζερβού Ε, Χριστοδούλου Δ, Κίστης Κ, Τσιάνος ΕΒ. Αντιστοιχία και κλινική σημασία των ορότυπων και γονότυπων του ΗCV: προκαταρκτική μελέτη, σε ΣΙ Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1997.

Νταλέκος ΓΝ, Μερκουρκόπουλος Μ, Μαυρίδης Α, Ζερβού Ε, Μασαλάς Κ, Τσιάνος ΕΒ. Συχνότητα της ηπατίτιδας C σε τοξικομανείς. *Ιατρική* 1993; 63: 51-54.

Ντουράκης Σπ. Χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση από τον ΗCV, σε ΣΙ Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1994.

Okamoto H, Kojiima M, Okada S. Genetic drift of HCV during an 8,2 year injection in a Chimpanzee variability and stability. *Virology* 1990: 894-899.

Okamoto H, Okada S, Sugiuama Y, και συν. The 5'-terminal sequence of hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med* 1991; 60: 167-177.

Okamoto H, Tsuda F, Machida A, Munecata E, Akahame Y, Sugai Y, Mashiko K, Mitsui T, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of HCV infection. *Hepatology* 1992; 14: 180-186.

Omata M, Iwama S, Sumida M, Ito Y, Okuda K. Clinico-pathological study of acute NANB post-transfusion hepatitis: histological features of liver biopsies in acute phase. *Liver* 1981; 1: 201-208.

Penna A, Chisari FV, Bertoletti A, Missale G, Fowler P, Gluberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2 restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991; 174: 1565-1570.

- Perrillb RP, Phol DA, Roodman ST, Tsai CC. Acute NANB hepatitis with serum sickness-like syndrome and aplastic anaemia. *JAMA* 1981; 245: 494-6.
- PorallaT, Triechel U, Lohr H, Fleisher B. The asialo-glycoproteine receptor as target structure in autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 215-222.
- Purcell RH, Gerin JL. Hepatitis delta virus in Fields BN και συν. (eds). *Virology*, 2<sup>nd</sup> edn, N. York: Raven Press, 1990; p: 225.
- Quian C, Camps J, Maluenda MD, Civeira MP, Prieto J. Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. *J Hepatol* 1992; 16: 380-383.
- Ratzan KR, Gregg MB, Hanson B. Transjusion associated hepatitis in the United States: an epidemiologic analysis. *Am J Epidemiology* 1971; 94: 425-434.
- Rice CM, Strauss EG, Strauss JH. Structure of the flavivirus genome. In: Schlesinger S., Schlesinger MJ eds. *Togaviridae and flaviniridae*. New York: plenum Publishing Corporation, 1986: pp 279-326.
- Rizzeto M και συν. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of delta antigen: An active and progressing disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med* 1983; 98: 437.
- Rizzeto M και συν. Hepatitis delta virus. *Disease Prog Liv Dis* 1986; 8: 417.
- Rotzchke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognised by cytotoxic T cells. *Nature* 1990; 348: 252-255.
- Rubin F. *Pathology*, JB Lippincott Company, Philadelphia 1989: 746-750.
- Rumenapf T, Stark R, Meyers G, Thiel HJ. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus. Further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 1991; 65: 589-597.
- Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe TY, Koi S, Onfi M, Ohta Y, Choo QL, Houghton M, Kuo G. Hepatitis V virus infections is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6547-6549.
- Schupper H, Hayashi P, Scheffel I, Aceituno S, Paglieroni T, Holland PV, Zeldis JB. Peripheral blood mononuclear cell response to recombinant HCV

antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1993; 18: 1044-1060.

Schupper H, Hayashi P, Scheffel J, Aceituno S, Paglieroni T, Holland PV, Zeldis JB. Peripheral-blood mononuclear cell responses to recombinant hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1993; 18: 1055-1060.

Sertaly L, Chagouilleres Q, Pawlotsky JM, et al. Level of viremia, genotype, histological features and effect of interferon therapy in HCV carriers with persistently normal ALT activity. *Hepatology* 1994; 20: 165 A (Abstract).

Shimizu YK, Feistone SM, Purcell RH, et al. Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979.

Shirai M, Ikada H, Nishioka M, Akatsuka T, Wychowski C, Houghton R, Pendleton CD, Feistone SM, Berzofsky JA. An epitope in hepatitis C core region recognised by cytotoxic T cells in mice and humans. *J Virol* 1994; 68: 3334-3342.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. Nomenclature for genotype of hepatitis C virus. Submitted 1994.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS<sub>5</sub> region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399.

Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan S-W, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: Identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* 1993; 74: 66168.

Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, Mc Omish F, Dow BC, Follet EA, Yap PL, Matsden H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in NS<sub>4</sub> region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, 3. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1493-1503.

Σκληρός Ε, Βλάχος Δ, Αργυρόπουλος Θ, Μαροπούλου Δ, Παπούλια Ε, Μυγδάκη Α, Κουρέντη Α, Σωφρονιάδου Κ. Αντισώματα ηπατίτιδας C σε πληθυσμό

παλινοστούντων από την ΕΣΣΔ, 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξ, Μεταδιδόμενων Νοσημάτων, Αθήνα 1994, Τόμος περιλήψεων σελ. 39.

Steenivasan MA, Banerjee K, Pandya PG. Epidemiological investigation of an outbreak of infections hepatitis in Almedabad city during 1975-1976, Indian J Med Res 1978; 67: 197-206.

Stuhler G, Walden P. Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes. Eur J Immynol 1993; 23: 2279-2286.

Tabor E, Drucker JA, Hoojnagle JH και συν. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanjees. Lancet 1978; 1: 463-466.

Tabor E, Geretu RJ, Drucker JA και συν. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanjee. Lancet 1979; 1: 463-466.

Takamatsu K, Okayasu I, Koyanagi Y, Yamamoto N. Hepatitis C virus propagates in salivary glands. J Infect Dis 1992; 165: 973-974.

Takamizawa A, Mori C, Fuke I, και συν. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. J virol 1991; 65: 1105-1113.

Takehara T, Hayashi N, Mita E, Hagwara H, Ueda K, Katayama K, Kasahara A και συν. Detection of the minus strand of HCV 's RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: implications for HCV replication in infected tissue. Hepatology 1992; 15: 387-390.

Tanigushi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, Munekata E, Muchmore EE, Petersen DA, Mishiro S. A structually Mexible and antigemically variable N - terminale domain of hepatitis C virus E<sub>2</sub>/NS<sub>1</sub> protein: implication for an escape from antibody. Virology 1993; 1992: 399-406.

Tibbs C, Tohnson PJ, Mc Faplane IG, Eddleston ALWF, Williams R. Detection of antibodies to core, envelope NS-1, NS-3, NS-5 regions of HCV in patients with chronic viral hepatitis. Hepatology 1991; 14: 68A-82 (Abstract).

Ticehurst et al. Replication of HAV: new ideas from studies with cloned cDNA: In Semler BL and Ehrenfeld E (eds) Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Disease, Washington: American Society for Microbiology. 1989: p. 27.

- Tomei L, Falla C, Sautolini E, De Francesco S, La Mounica N. NS<sub>3</sub> is a serine protease required for processing of HCV polyprotein. *J Virol* 1993; 67: 4017-4026.
- Tran Van Nhieeu J, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, et al. Relationship between genotypes of HCV and histologic liver lesion in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 1994; 20: 247 A (Abstract).
- Tsiquaye VN, Zuckerman AJ. New human hepatitis virus [letter] *Lancet* 1979; 1: 1135-1136.
- Τσότος Αθ. Ιατρική Ιολογία. Αθήνα 1992. Ιατρικές εκδόσεις «Λίτσας».
- Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Maki K, Ohta Y, Miki K, Mizokami M, Ohba K, Tanaka S, Hattori N, Nomoto A. Antigenicities of group I and II HCV polypeptides-malemlat basis of diagnosis. *Virology* 1993; 192: 430-437.
- Ulrich PP, Romeo JM, Lane PK, Kelly I, Daniel LJ, Vyas GN. Detection, semiquantitation and genetic variation in hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase. *J Clin Invest* 1990; 86: 1609-1614.
- Ulrich PP, Romeo JM, Vyas GN. Hepatitis C - the virus as well as antibody. *Gastroenterology* 1991; 100: 1145 (letter).
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl J Med* 1995; 333: 1038-1044.
- Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Grawford K, Bonino F, Saracce G, Choo Q-L, Haughon M, Hom JH. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS<sub>1</sub> proteins and the pertivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.
- Wyke RJ, Tsiquaye KN, Thornton A και συν. Transmission of non-A, non-B hepatitis to chimpanjees by factor-IX concentrates after fatae complications in patients with chronic liver disease. *Lancet* 1979; 1: 520-524.
- Χατζάκης Α. Γονιδιακή οργάνωση, πρωτεΐνες υπότυποι του HCV, σε Ηπατίτιδα C. Σ.Ι. Χατζηγιάννη, εκδόσεις Πασχαλίδη. 1994.

- Χατζάκης Α. Ορότυποι και γονότυποι του HCV, σε ΣΙ Χατζηγιάννη Ηπατίτιδα C, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1994.
- Χατζηγιάννης ΣΙ. Ηπατίτιδα μη-A, μη-B. Η αρχή του τέλους; Ιατρική 1989; 55: 235-247.
- Χατζηγιάννης ΣΙ. Ο ιός της ηπατίτιδας C, Ιατρική 1992 61, 1:24-32.
- Χόρτη Μ. Παθολογοανατομική εικόνα ηπατίτιδα C. Επιθεώρηση Υγείας, 1991: 2 (4).
- Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri S, et al. Demonstration of two different types of non-A; non-B hepatitis by reinfection and cross-challenge studies in chimpanzees. Gastroenterology 1981; 81: 107-113.
- Young RA, Davis RW. Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 1983; 80: 1194-1198.
- Ζερβού Ε, Νταλέκος Γ, Χριστοδούλου Δ, Τσιάνος ΕΒ. Επιπολασμός οροτύπων HCV με τη χρήση ανοσοενζυμικής μεθόδου στην Ήπειρο. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 1997; 42(2): 206-209.
- Ζερβού Ε, Νταλέκος Γ, Γερολυμάτου Α, Μπούμπα Α, Τσιάνος Ε. Δείκτες ηπατίτιδων Β και C σε αιμοδοτικό πληθυσμό της Ηπείρου. Δελτίο Ελλ. Μικροβ. Εταιρείας 1998; 43: 482-489.
- Zignego AL, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzeti M, Foschi M, Maggi E, Omagnani S, Gentilini P, Breschet C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. Hepatology 1992; 15: 382-386.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

- Aach RD, Kahn RA. Post transfusion hepatitis: current perspectives. *Ann In Med* 1980; 92: 539-546.
- Aach RD, Stevens CE, Hollinger BF, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 1325-9 .
- Abuaf N, Johanet C, Chretien P. Characterization of the Liver cytosol antigen type 1 (Lclag) reacting with autoantibodies associated to childhood chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992; 16: 892-898.
- Abuaf N, Lunel F, Giral F, Borotto E, Laperrche S, Poupon R, OpoIon P , Huraux J-M, Homberg JC. Non-organ specific autoantibodies associated to chronic C virus hepatitis. *J Hepatol* 1993; 18: 359-364.
- Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Puriell RH, Feistone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion associated hepatitis *Lancet* 1975; 2: 838-841.
- Alter HJ, Jett BW, Polito AJ, Farci P, MelpolderJC, Shih JW, Shimjzu Y, Purcell R. Analysis of the role of hepatitis C virus in transfusion-associated hepatitis. In: *Viral Hepatitis and Liver Diseases*. Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS (eds). Williams and Wilkins, Baltimore, 1991: 396-402.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to HCV in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321: 1494-1500.
- Alter HJ. Chronic consequences of non-A, non-B hepatitis. In Seeff LB., Lewis JH (eds). *Current Perspectives in hepatology*. Plenum Medical, New York, 1989: 83-97.
- Alter HJ. Hepatitis C: Natural history. *American Association for the Study of Liver Disease: Postgraduate Course 1994: Viral Hepatitis A to F: An update*. Chicago 1994; 225-45.
- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-905.

- Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A,non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990; 264:2231-2235.
- Alter MJ. Transmission of hepatitis C virus route, dose and titer. *N Engl J Med* 1994; 330: 784-786.
- Alter M. Transfusion transmitted hepatitis C and non-A, non-B, non-C. *Vox Sang* 1994; 67, 53: 19-24.
- Alter M, Mast E. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin N Am* 1994; 23: 437-455.
- Arima T, Nagashima H, Murakami S, et al. Cloning of cDNA associated with amfe and chronic hepatitis C infection generated from patients serum RNA. *Gastroenterol Jpn* 1989; 14: 381-388.
- Arima T, Takamizawa A, Mori C, et al. A lambda gt 11 cDNA clone specific for chronic hepatitis C generated from pooled serum presumably infected by hepatitis C virus. *Gastroenterol Jpn* 1989; 24: 545-548.
- Bach N, Bodenheimer HJ: Transmission of hepatitis C. Sexual, vertical or exclusively blood-borne? *Hepatology* 1992; 16: 1497-99.
- Baffis V, Shrier I, Sherk AH. et al. Use of interferon for prevention of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with hepatitis B or hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 1999; 131 :696-701.
- Βαφειάδη-Ζουμπούλη Ε. "Υγιείς" φορείς του ΗCV ή υποκλινικώς νοσούντες; Εις: Χατζηγιάννης ΣΙ, εκδ. Ηπατίτιδα C. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις π.χ. Πασχαλίδη 1994: 121-32.
- Baravelle E, Prieto J, Serum antibodies against porphyric hepatocytes in patients with porphyria cutanea tarda and liver disease. *Gastroenterology* 1983; 84: 1483-1491.
- Bartenschlager R, Ahlborn-Laake, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of HCV polyprotein processing. *J Virol* 1994; 68: 5045-5055.
- Bartenschlager R, Ahlborn-Kaake L, Yasargil K, Mons J, Jacobsen H. Substrate determinants for cleavage in cis and in trans by the Hepatitis C virus NS<sub>3</sub> proteinase. *J Virol* 1995; 69: 198-205.

- Bartenshllager R, Ahlbrorn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Non structural protein 3 of the HCV encodes a serine-type proteinase required for cleavage at thw NS<sub>3</sub>/4 and NS<sub>4</sub>/5 junction. *J Virol* 1993; 67: 3835-3844.
- Βασιλοπούλου-Καδά Ε, Χατζάκης Α, Τασσόπουλος ΝΚ, Πολυχρονάκη Ε, Χατζηβασιλείου Μ, Στρατηγός Ι. Επιπολασμός αντισώματος ηπατίτιδας C (αντι-HCV) σε ομοφυλόφιλους άνδρες. *Ιατρική* 1992; 61: 68-71.
- Βασιλοπούλου-Καδά Ε. Δρόσου Μ. Σωφρονιάδου Κ και συν .Εκτίμηση της μολυσματικότητας του θετικού για αντισώματα ιού ηπατίτιδας c, μεταγγιζόμενου αίματος σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα με συγγενείς αιμολυτικές αναιμίες. *Ιατρική* 1992; 61:60-63.
- Beaumont C, Fauchet R, Phung LN. Porphyria cutanea tarda and HLA-Iinked hemochromatosis: evidence against a systematic association. *Gastroenterology* 1987; 92: 1833-1836.
- Βεργκίζι-Νικολακάκη Σ, Κατσουλίδου Α, Μαλλιώρα Μ, Παπαθεοδωρίδης Γ, Τασσόπουλος ΝΚ, Χατζάκης Α: Η μέτρηση του RNA του ιού ηπατίτιδας C (HCV) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στη διάγνωση της λοίμωξης HCV. *Ιατρική* 1994; 66(Παράρτ): 48-52. 3.
- Berk L, Schalm SW, Heijtkink RA. Severe chronic active hepatitis (autoimmune type) mimicked by coinfection of hepatitis C and human immunodeficiency viruses. *Gut* 1991; 32: 1198-1200.
- Bertolini E, Batterzzati PM, Zermiani P et al: Hepatitis C in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1992; 15: 207-10.
- Bi Biscegle AM, Hoofnagle JH, Krawczynski K. Changes in HCV antigen in liver with antiviral therapy. *Gastroenterology* 1993; 105: 858-862.
- Bonino F et al. Serology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991; 3(8):580-584.
- Bonkovsky HI, Mechanism of iron potentiation of hepatic uroporphyrin: studies in cultured chick embryo liver cells. *Hepatology* 1989; 10: 354-364.
- Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weimer AJ, Choo Q-L, Shuster JR, Kuo G, Bonino F, Houghton M, Abrignani ST. T lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 580-587.
- Botarelli P. T lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104:560-587.

- Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zaldis JB. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1276-1280.
- Boyer. In: Ackerman's Surgical Pathology The CV Mosby; ST Louis, Toronto-Washington DC. 1989.
- Braddley BW, Cook EH, Maynard JE, και συν. Experimental infection of chimpanjees with antihemophilic (gactor VIII) materials: recovery of virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *J Med Viral* 1979; 3: 253-269.
- Braddley DW, Krawcznski K, Beach M, Purdy MA. Non-A, non-B hepatitis: toward the discovery of hepatitis C and E viruses. *Semin Liv Dis* 1991, 11: 128-146.
- Braddley BW, Maynard JE, Cook EH, et al. Non-A/non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees: Cross-challenge and electron microscopic studies. *J Med Virol* 1980; 6: 185: 201.
- Braddley DW, Maynard JE. Etiology and natural history of post-transfusion and enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Semin Liver Dis* 1986, p: 56-66.
- Bradley DW, Mc Caustland KA, Cook EH, και συν. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanjees: physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779.
- Bresters D, Mauser BE, Reesink HW et al. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 343: 210-11.
- Brillanti S et al. Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic and acute hepatitis C. *Hepatology* 1992; 15:998-1001.
- Brillanti S, Levantesi F, Foli M, Masci C, Miglioni M, Barbara L. Need for HCV-RNA detection and Liver biopsy in anti-HCV positive patients with normal ALT. *Hepatology* 1994; 20: 235A.
- Brillanti S, Masci C, Ricci P, Miglioli M, Barbara L. Significance of IgM antibody to hepatitis C in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1992; 15:998-1001.
- Brillanti S, Masci C, Siringo S et al: Serological and histological aspects of hepatitis C virus infection in alcoholic patients. *J Hepatol* 1991; 13: 347-50.

- Brown J, Dourakis S, Karayiannis P, et al. Seroprevalence of hepatitis C virus nucleocapsid antibodies in patients with cryptogenic chronic liver disease. *Hepatology* 1992; 15:175-179.
- Bruguera M. Liver involvement in porphyria. *Semin Dermatol* 1986; 5: 178-185.
- 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; 2: 1004-6.
- Caldweel SH, Li X, Rourk RM et al: Hepatitis C infection by polymerase chain reaction in alcoholics: False positive ELISA results and the influence of infection on a clinical prognostic score. *Am J Gastroenterol.*1993; 88: 1 0 16-21.
- Camps J et al. Pathophysiology of chronic hepatitis C. *Progress in Hepatology* 1993; pp 63-68.
- Camps J, Cordoba J, Rossel M, et al. Prediction of Liver damage in RIBA-2 confirmed asymptomatic blood donors. *Hepatology* 1994; 20: 236A.
- Cargnel A, Vigano P, Daveli C, Morreli R, Rerna Mc, Mariscotti C. Sporadic acute NANB hepatitis complicated by aplastic anaemia *Am J Gasttoenterol* 1983; 78: 245-247.
- Casato M, Taliani G, Pucillo IP, Gofferredo F, Lagana B, Bonomo L. Cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Lancet* 1991; 337: 499-500.
- Castilla A et al. Transforming growth factors
- Causse X, Germanaud J, Barthez J. Prevalence of anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies in health care workers. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstracts, p. 227.*
- Centers For Disease Control. a. Hepatitis C. *MMWR* 1991; 40: 13-14.
- Centers For Disease Control. b. Organs, Tissues and Semen For Evidence of hepatitis B and hepatitis C, *MMWR* 1991; 40: 8-16.
- Cerny A, McHutchinson JG, Pasquinelli C, Brown ME, Brothers MA, Gradscheid B, Fowler P, Houghton M, Chisari FV. Hepatitis C virus specific cytotoxic T cell response: Identification of multiple HLA-A2 restricted epitopes. *J Clin Invest* 1995; 95: 521-530.

- Champers TJ, Hahy CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol* 1990; 688: 649-688.
- Chann SW, Mc Omich F, Holmes EC, Dow B, Peutherer JF, Follet E, Yap PL, Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relation-ship to exiting variants. *J Cen Virol* 1992; 73: 1131-1141.
- Chau KC, Dawson GJ, Mushawer IK, et al. IgM-antibody response to hepatitis C virus antigens in acute and post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *J Virol Meth* 1991; 343-352.
- Chemello L, Cavalletto D, Pontisso P, Bortolotti F, Donada C, Donadon V, Frezza M, et al. Patterns of antibodies to hepatitis C virus in patients with chronic non-A, non-B hepatitis and their relationship to viral replication and liver disease. *Hepatology* 1993; 17: 179-182.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Braddley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA lone derived from a blood-born non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451-2455.
- Choo Q-L, Weiner AJ, Overby LR, et al. Hepatitis C virus: the major causative agents of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 1990; 46: 423-441.
- Cleares GR, Ryan TE, Schlesinger PW. Identification and characterization of type 2 Dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology* 1981; 111: 73-83.
- Cohen JI. Hepatitis A virus. Insights from molecular biology. *Hepatology* 1989; 9: 889.
- Collet MS, Anderson DK, Retyel E, Comparisons of the pestivirus borine viral diarrhea virus with members of the flaviviridae *J Gen Virology* 1988; 69: 2637-2643.
- Coppola RC, Masia G. Epidemiology of hepatitis C in Italy. *J Prevent Med Hyg* 1993; 34:89-95.
- Corloti M, Caporaso N, Morisco F: Intrafamilial spreading of hepatitis C virus infection and of HCV-related chronic liver disease. 2nd International Symposium on HCV 1990; Abstrand E14.
- Cortes JM, Oliva H, Paradinas F, Herdandez Guio C. The pathology of the liver in porphyria cutanea tarda. *Histopathology* 1980; 4: 471-485.

- Crespo JJ, Lozano JL, dela Cruz F et al: Prevalence and significance of hepatitis C viremia in chronic active hepatitis B. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89: 1147-51.
- Crivelli O, Lavarini C, Chiaberge D. Microsomal autoantibodies in chronic infection with the HBsAg associated delta ( $\delta$ ) agent. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 1370-1378.
- Czaja AJ, Manns MP, Homburger HA. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 103: 1290-1295.
- Czaja AJ, Taswell HF, Rakela J. Frequency and significance of antibody to hepatitis C virus in severe corticosteroid treated autoimmune chronic active hepatitis. *Mayo Clin Proc* 1991; 66: 572-582.
- Daikos GL, Lai S, Fischl MA: Hepatitis C virus infection in a sexually active inner city population. The potential for heterosexual transmission. *Infection* 1994; 22: 72-76.
- Davis GL, Esteban Mur R, Rustgi V et al. Interferon  $\alpha$ -2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339:1493-1499.
- Davis GL. Prediction of response to interferon of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1994; 21: 1-3.
- De Castro M, Sanchez J, Herrera JF, Chaves A, Duran A, Garcia-Buey L, Garcia-Monzon C, Sequi J, Moreno-Otero R. Hepatitis C virus antibodies and Liver diseases in patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1993; 17: 551-557.
- De Mitri MS, Poussin K, Baccharini P, et al. Selective persistence of HCV genotype 1b in liver Cancers developing without cirrhosis. *Hepatology* 1994; 20: 200A.
- De Verneuil H, Aitken G, Nordmann Y. Familial and sporadic porphyria cutanea tarda: two different diseases. *Hum Genet* 1978; 44: 145-151.
- Del Prete GF, DeCarli M, Mstromauro C, Piagiotti R, Maccia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivate of Mycobacterium tuberculosis and excretorysecretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human

- T cells with stable and opposite (type I T helper or type II T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991; 88: 246-352.
- Deny P, Nicolas JC, Loisean D, Lefrere JJ: Prevalence of antibodies to hepatitis C in different etiologies of cirrhosis. *J Hepatol* 1990; 11: 393.
- Deny P, Roulot D, Asselot C et al: Low rate of hepatitis C virus (HCV) transmission within the family. *J Hepatol* 1992; 14: 409.
- Dibenetto SP, Ragusa A, Sciacca A et al: Incidence and morbidity of infection by hepatitis C virus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics* 1994; 153: 271-75.
- Dienes HP, Popper H, Arnold W, Lobeck H. Histologic Observations in human NANB. *Hepatology*, 1982; 2: 562-571.
- Dienstag JL. Non-A, Non-B hepatitis. I. Recognition, epidemiology and clinical features. *Gastroenterology* 1983; 85: 439-62.
- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierengatonio E, Jung MC, Eichenlaud D, Pape GR. Possible involvement of T-lymphocyte response to nonstructural protein 3 in viral acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346: 1006-1007.
- Doherty PC, Allan W, Eichelberger M. Roles of T cell subsets in viral immunity. *Am Rev Immunol* 1992; 10: 123-151.
- Durand JM, Lefevre Harle JR. Cutaneous vasculitis and cryoglobulinemia type II associated with hepatitis C virus infection. *Lancet* 1991; 1: 499-500.
- 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: 1160-1161.
- Dusso B, Chickpostiche C, Cantalonde JF et al: Detection of Hepatitis C infection by polymerase Chain reaction among haemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 574-80.
- EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28 February 1999. *J Hepatol* 1999; 30:956-961.
- Ebeling et al. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody as predictor of infectivity. *Lancet* 1990; 335:982-983.
- Ellis IA et al. Prevalence of hepatitis C in South Africa. Detection of anti-HCV in recent and stored sera. *J Med Vir* 1990; 32:249-251.



Encyclopedia of Virology: Third edition.

Erckoris MA et al. Hepatitis C virus specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol* 1993; 151: 4189-4199.

Essel C. Candidate cause identified of non-A, non-B hepatitis. Elusive virus isolated after long search. Potential marker for blood screening (news). *Nature* 1988; 331: 195.

Esteban JL, Estaban A, Viladomiu L, Lopez-Talavera JC, Gonzalez A, Hernandez JM, Roget M. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 334: 294-296.

Esteban JL et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion associated hepatitis. *N Engl J Med* 1990; 323:1107-1112.

Esteban JL. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 11:294-297.

Everhart JE, Di Bisceglie AM, Murray LM et al. Risk for non A, non B (type C) hepatitis through sexual or household contacts with chronic carriers. *Ann Int Med* 1990; 112: 544-45.

Eyster ME, Alter HJ, Aledort LM et al: Heterosexual co-transmission of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Ann. Intern. Med.* 1991; 115: 764-68.

Ezzel C. Candidate cause identified of non-A, non-B hepatitis. Elusive virus isolated after long search. Potential marker for blood screening (news) *Nature* 1988; 331-195.

Faila C, Tomei L, De Francesco R. Both NS<sub>3</sub> and NS<sub>4A</sub> are required for proteolytic processing of HCV nonstructural proteins. *J Virol* 1994; 68: 3753-3760.

Farci P, Alter HJ, Goundavajan S. Lack of protective immunity against reinjection with HCV, *Science* 1992; 258: 135-140.

Fargion S, Piperno A, Cappellini MO, Sampietro M, Frakanzani AI, Romano A, Caldarelli R, Marcelli R, Vecchi L, Fiorelli G. Hepatitis C virus and Porphyria Cutanea Tarda: evidence for a strong association. *Hepatology* 1992; 16: 1322-1326.

Feinman SV et al. Anti-HCV post-transfusion hepatitis: detection from a prospective study. *Hepatology* 1991.

- Feistone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion - associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New England J Med* 1975; 292: 767-770.
- Feistone SM: Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus-like particle associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026.
- Feistone SM: Hepatitis C virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991; 3: 572.
- Feldman ES, Bacon BA, Hepatic mitochondrial oxidative metabolism and lipid peroxidation in experimental hexachlorobenzene-induced porphyria with dietary carbonyl iron overload. *Hepatology* 1989; 9: 686-692.
- Felsher BF, Norris ME, Shin JC. Red-cell uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 1982; 306: 766-769.
- Ferrari C, Vaili A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianchi C, Messale G, Marin MG, Fiaccadori F. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* 1994; 19: 286-295.
- Ferri C, Baicchi U, La Civita L, et al. Hepatitis C virus-related autoimmunity in patients with porphyria cutanea tarda. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 851-855.
- Ferri C, Baicchi U, La Civita L, Greco F, Longiombardo G, Mazzoni A, Carrecia G, Martini A, Zingero AI, Manns MP. Autoimmunity in porphyria cutanea tarda associated with HCV infection. *Hepatology* 1993; 18: 231A.
- Fong TL, Shindo M, Feistone S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* 1991; 88: 1056-1060.
- Fong T, Di Bisceglie A, Wagoner J et al: The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1991; 14: 64-67.
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown G. (eds) Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international Committee Taxonomy of viruses. *Arch viral* 1991 (Suppl 2): 223.
- Frider B, Sookoian S, Castano G, Rebora N, Gutfraind Z, Kina M, Veyretou F, Wainstein C. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in health care workers investigated by 2nd generation enzyme-linked and line immunoassays. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstracts, p. 227.*

- Fried MW, Draguesku JO, Shindo M, Simpson IH, Banks SM, Hoofnagle JH, DiBisceglie AM. Clinical and serological differentiation of autoimmune and hepatitis C virus-related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 631-636.
- Fried MW, Shindo M, Fong TI et al: Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1992; 102: 1306-8.
- Fusconi M, Lenzi M, Ballardini G, Miniero A, Cassani F, Zauli D, Bianchi FB. Anti-HCV testing in autoimmune hepatitis and primary billiary cirrhosis. *Lancet* 1992; 2: 823.
- Gabrielli C, Zannini A, Corradini R, Gafa S: Spread of hepatitis C among sexual partners of HCV Ab positive drug users. *J Infe* 1994; 29: 17-22.
- Garson JA, Lenzi M, Ring C. HCV viraemia in adults with type 2 autoimmune hepatitis. *J Med Virol* 1990; 34: 223-226.
- Garson JA, Lenzi M, Ring C. Hepatitis C viraemia in adults with type 2 autoimmune hepatitis. *J Med Virol* 1991; 34: 223-226.
- 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; 335:1419-1422
- Gary L, Davis, Johnson YN, Lau. Hepatitis C. *Gastroenterology* 1993; 109: 2083-2087.
- Genesca J, Esteban JL, Alter HJ. Blood-born non-A, non-B hepatitis C. *Semin liver Dis* 1991; 11:147-164.
- Gerber MA. Relation of hepatitis C virus to hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1992; 14: 183-7.
- Gerin JL, Purcell RH and Rizzetto M. The hepatitis Delta virus. N. York: Wiley - Liss. 1991.
- Γκορίτσας Κ, Αρβανίτη Α, Αθανασιάδου Α, Λαμπροπούλου-Καρατζά Χ. Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) σε χρόνιους ηπατοπαθείς. *Ελλην Γαστρεντερολ* 1993; 6: 100.
- Γκιώκα Α, Καραμπίνη Φ, Ζερβού Ε, Χασιώτου Π, Αναστασόπουλος Δ, Κολαΐτης Ν. Οροεπιδημιολογική μελέτη της λοίμωξης από ιό ηπατίτιδας C (HCV) σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα στην Ήπειρο. *Δελτίο Ελλ. Μικροβ. Εταιρείας* 1991; 36: 346-351.

- Goldfield M, Bill J, Black H, Piyutti W, Shihongs S. Hepatitis associated with the transfusion of HB -negative blood. In Vuas GN, Perkins HA, Sahmid RS eds. Hepatitis and blood transfusion. New York: Grune and Stratiton, 1972: 353-361.
- Grady GF, Bennet AJE. Risk of post transfusion hepatitis in the United states: a prospective cooperative study. JAMA 1972; 220: 692-701.
- Grakoui A, Mc Court DW, Wychowski C, Feistone SM, Rice CM. Characterization of the HCV- encoded serine proteinase: determination of proteinase - dependent polyprotein cleavage sites. J Virol 1993; 67: 2832-2843.
- Grakoui A, McCourt BW, Wychavski C, Feistone SM, Rice CM. A second hepatitis C-encoded proteinase. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10583-10587.
- Guegen M, Boniface O, Bernard O, Clerc F, Cartwright T, Alvarez F. Identification of the main epitope on human cytochrome P450IID6 recognized by anti-liver microsomal antibody. Autoimmunity 1991; 4: 607-615.
- Hadziyannis S, Papaioannou Ch, Iossifidou M, Avgides C, Urdea M, Wilber J. HCV-RNA Ievels by branched ONA signal amplification as a predictor of sustained response to alpha-interferon treatment. Hepatology 1993; 18:235A.
- Hadziyannis SJ, Dourakis SP, Papaioannou Ch, Alexopoulou A, Hadziyannis ES, Gioustozi A. Changing epidemiology and spreading modalities in hepatitis delta virus injection in Greece. Prog Clin Biol Res 1993; 382: 259-266.
- Hadziyannis SJ, Giannoulis G, Hadziyannis E, Alexopoulou A, Dourakis S and Trichopoulos D. Hepatitis C virus infection in Greece and its role in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. J Hepatol 1993; 17 (Suppl 3): S72-S77.
- Hadziyannis E, Weiner A, Papaioannou C, Psalidaki E, Kuo G, Chien D, Urdea M, Wilber J. Hadziyannis SJ. Antibodies to linear epitopes of HCV and HCV-RNA levels in chronic HCV infection. Hepatology 1992; 16:107A.
- Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, Takehara T, Kasahara A et al: Qauantitive analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. Gastroenterology 1993; 104: 877-83.
- Hallam NF, Fletcher ML, Read SJ et al: Low risk of sexual transmission of hepatitis C virus. J Med Virol 1993; 40: 251-53.
- Hallewell RA, Masiarj FR, Najarian RC, και σuv. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesizing high levels of active or

- inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 2017-2034.
- Han JH, Shyamala V, Richman KH, et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1711-1715.
- Hatzakis A, Polychronaki H, Miriagou V, Yannitsiotis A, Chrispeels J, Troonen H. Antibody responses to hepatitis C virus by second-generation immunoassay in a cohort of patients with bleeding disorders. *Vox Sang* 1992; 63:204-209.
- Hayashi J, Yoshimura E, Nabeshima A et al: Seroepidemiology of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients and the general population in Fukuoka and Okinawa, Japan. *J Gastroenterol* 1994; 29: 276-81.
- Healey CJ, Smith OB, Walker JH et al: Acute hepatitis C infection after sexual exposure. *Gut* 1995; 36: 148-50.
- Herrero C, Vicente A, Bruguera M, Ercilla MG, Barreta JM, Vidal J, Teres J, Mascaro JM, Rodes J. Is hepatitis C virus infection a trigger of porphyria cutanea tarda? *Lancet* 1993; 341: 788-789.
- Hijikata M, Kato M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 220-228.
- Hijikata M, Nizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiushi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67: 4665-4675.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Haruna Y, et al. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus infected hepatocytes in chronic liver disease with monoclonal antibodies to core envelope and NS<sub>3</sub> regions of the hepatitis C virus genome. *Hepatology* 1992; 16: 306-311.
- Hirawatari Y, Hijikata M, Tanji Y, Nyunoya H, Mizushima H, Kimura K, Tanaka T, Kato N, Shimotohno K. Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cell using baculovirus vector. *Arch Virol* 1993; 133: 349-356.

- Hoffman PM, Diepolder HM, Zachoval R, Zwiebel FM, Jung M-C, Scholz S, Nitschko H, Riethmuller G, Pape GR. Mapping of immunodominant CD4<sup>+</sup> T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* 1995; 21: 632-638.
- Hollinger FB, Gitnick GL, Aach RD, και συν. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion - transmitted viruses study Group. *Intervirology* 1978; 10: 60-68.
- Hollinger FB, Mosley JW, Szmuness W, Aach RO, Peters RL, Stevens C. Transfusion-transmitted Viruses Study: experimental evidence for two non-A, non-B hepatitis agents. *J Inf Dis* 1980; 142: 400-407.
- Hollinger FB, Mosley JW, Szmuness W, et al. Non-A, Non-B hepatitis following blood transfusion risk factors associated with donor characteristics. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE eds. *Viral hepatitis - 1981 international symposium*. Philadelphia. Franklin institute Press, 1981: 161-176.
- Holsen DS, Harthug S, Myrmel H: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus and association with intravenous drug abuse and tattooing in a National prison in Norway. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 673-76.
- Homma S, Toshima K, Shima H et al: HCV viremia immediately after accidental needle stick. *Int Hepatol Commun* 1994; 2: 166-69.
- Hoofnagle JH, Genetry RJ, Tabor E, et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis. *An Inter Med* 1977; 87: 14-20.
- Hosein B, Fang CT, Propovsky MA, Ye J, Zhang ML, Wang CY. Improved serodiagnosis of HCV infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3647-3651.
- Houghton M, Choo Q-L, Selby A. Hepatitis C viruses. Highly heterogenous relatives of flaviridae family causing persistent infection, 8<sup>th</sup> Intern Symp. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, May 10-14, 1994, Tokyo, Abstract vol. p. 41.
- Houghton M, Weiner A, Han J, και συν. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-388.
- Houghton M, Choo Q-L, Selby A et al. Hepatitis C viruses: Highly heterogeneous relatives of the flaviviridae family causing persistent infection. 8th Intern

Symp Viral Hepatitis and Liver Disease. May 10-14, Tokyo J Abstract vol, p 41.

Ikeda K, Salton S, Koida I, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 47-53.

Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Kurokawa K. Antibody to superoxide dismutase autoimmune hepatitis and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335: 1345-1346.

Imawari N et al. Establishment of a human T cell clone cytotoxic for both autologous and allogenic hepatocytes from chronic hepatitis nonA-nonB. *Proc Natl Ac Sci* 1989; 87:9524-9528.

Inman RD, Hodge M, Johnston MEA, Wright J, Heathcote J. Arthritis, vasculitis and cryoglobulinemia associated with relapsing hepatitis A infection. *Ann Intern Med* 1986; 105: 700-703.

Inoue Y, Miyamura T, Unayama T, Takahashi K, Saito A. Maternal transfer of HCV. *Nature* 1991; 353:609.

Irie Y, Hayashi H, Yokojeki K et al: Hepatitis C infection unrelated to blood transfusion in haemodialysis patients. *J Hepatol* 1994; 20: 557-5.

Islas S, Yamaguchi K, Kawano F, Nishimura Silva A, Revilla C, Takatsuki K. Role of hepatitis C infection in health-care workers from Mexico City. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstracts, p. 228.*

Jori GP, Buonanno G, D'Orofrío F, Tirelli A, Gonella F, Gentile S. Incidence and immunochemical features of serum cryoglobulin in chronic Liver disease. *Gut* 1977; 18: 245-249.

Juanes J, Lago E, Arrazola P, Andres A, Jean F, Gutierrez A. HCV: a risk for health-care workers. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstracts, p. 228.*

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Sujuki, Kohara M, Hepatitis C virus particles detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994; 75: 1755-1760.

Kaklamani E, et al. Hepatitis B and C viruses and their interaction in the origin of hepatocellular carcinoma. *J Am Med Ass* 1991; 265:1974-1976.

- Kamel MA, Kuhns MC, DeWolfe F, McNamara AI, Gagnier SE, Chaffar V A, Troonen H. High hepatitis C seroprevalence and serum viremia with normal alanine aminotransferase levels among blood donors and rural villagers in Egypt. *Hepatology* 1993; 18:85A.
- Kanazawa Y, Hayashi N, Mita E, et al. Influence of viral quasi-species on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 1994; 20: 1121-1130.
- Kaneko, et al. *J Med Virol* 1992; 37:278.
- Kao J-H, Chen P-J, Lai M-Y, Chen D-S. Superinfection of heterologous hepatitis virus in a patient with chronic type C hepatitis. *Gastroenterology* 1993; 105: 583-7.
- Kao JH, Chen PJ, Lei MY et al: Sexual transmission of hepatitis C. *Lancet* 1993; 342: 626.
- Kato M, Ootsuyama Y, Tanaka T, Nakagawa M, Nakagawa T, Muraiso K, Ohkoshi S, Hijikata M, Shimotohno K. Marked sequence diversity in the putative envelope protein of hepatitis C viruses. *Virus Res* 1992; 22: 107-123.
- Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, και συν. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9524-9528.
- Kato N et al. Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Inv* 1990; 86:878-879.
- Καραγιάννης Π. Ο ιός που ακόμα δεν είδαμε: Τι νεότερο στη γενετική οργάνωσή του, την έκφραση και τους αντιγονικούς επιτόπους του. Στο τόμο αυτό 1995.
- Καραγιάννης σε Σ. Χατζηγιάννη, Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Πασχαλίδη, 1995.
- Κατσουλίδου Α: Ανίχνευση του RNA του ιού ηπατίτιδας C (HCV RNA) με την τεχνική του συνθετικού διακλαδιζόμενου DNA (bdNA): Σε: Ηπατίτιδα C. Σ. Χατζηγιάννης. Εκδ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1994.
- Katsoulidou A, Psychogiou M, Vaindirli E, Skoutelis G, Boletis J, Becker K et al. Prolonged viremia before seroconversion to anti-HCV in hemodialysis patients. *J Hepatol* 1994; 21 (Suppl. 1): S65.
- Khuroo MS. Study of an epidemic of NANB hepatitis: possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion, NANB type. *Am J Med* 1980; 68: 818-824.



- Kita H, Moriyama T, Kaneko T, Harase I, Nomura M, Miura H, Nakamura I, Yazaki Y, Imawari M. HLA B-44 restricted cytotoxic T lymphocytes recognising an epitope on hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Hepatology* 1993; 18: 1039-1044.
- Kiyosava K, Tanaka E, Sodeyama T, Yoshizawa K, yabu K, Furuta K, Imai H, Nakano Y, Usuda S, Vemura K, Futura S, Watanabe Y, Watanabe J, Fukuda Y, Takayama T and the South Kiso Hepatitis Study Group. Transmission of hepatitis C in an isolated area in Japan: Community-acquired infection. *Gastroenterology* 1994; 106: 1596-1602.
- Kiyosawa K, Furuta S. Transmission and prevention of hepatitis C infection. Fourth International Symposium on HCV. Tokyo, Japan. May 7-9, 1993. Abstracts p. 30.
- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Interrelationship of blood transfusions, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma. Analysis by detection of antibodies to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 12: 671-5.
- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in Japan. *J Med Virol* 1991; 33: 114-116.
- Koff RS. Problem hepatitis C viruses the mutants. *Am J Med* 1994; 96: 525-565.
- Koff RS. Problem hepatitis viruses: The mutants. *Am J Med* 1994; 96:525-565.
- Κοκκίνη Γ, Τσελίκης Β, Παπαναστασόπουλος Β και συν. Αντισώματα έναντι του ιού της ηπατίτιδας C σε ασθενείς σε χρόνια αιμοκάθαρση. Συσχέτιση με μεταγγίσεις. *Ιατρική* 1992; 61:85-88.
- Κοκκίνη Γ, Τσελίκης Β, Παπαναστασόπουλος Β, Προκοπίου Χ, Ελληνας Χ, Διγενής Π. Αντισώματα έναντι του ιού της ηπατίτιδας C σε ασθενείς σε χρόνια αιμοκάθαρση. Συσχέτιση με μεταγγίσεις. *Ιατρική* 1992; 61: 85-88.
- Koretz AI, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. Non-A, Non-B posttransfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med* 1993; 119: 110-5.
- Korrel MJ et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992; 149: 3339-3344.
- Κοσκίνας Ι. Γονότυποι και ορότυποι ηπατίτιδας C, σε Ηπατίτιδα C, Σ.Ι. Χατζηγιάννη, εκδόσεις Πασχαλίδη). 1995.

- Κοσκίνας Ι. Η παθογένεια της ηπατικής βλάβης στη λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C. Εις: Χατζηγιάννης ΣΙ, εκδ. Ηπατίτιδα C. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις π.χ. Πασχαλίδη 1994: 84-91.
- Koscinas J, Mc Farlane B, Nouri-Aria K et al. Cellular immune responses to hepatitis C -core and GOR peptides in chronic HCV patients. *J Hepatol* 1993; 18 (suppl 1): S28 (Abstract).
- Κουρούμαλης Η, Μπιζιάγκος Ε, Ψιστάκης Μ, Μανούσος Θ και η Ομάδα Μελέτης της Ηπατίτιδας στην Κρήτη. Ηπατίτιδα C στην Κρήτη. Επιδημιολογικά και Θεραπευτικά δεδομένα. ΣΙ Χατζηγιάννη: Ηπατίτιδα C. Εκδ. Πασχαλίδη, Αθήνα, 1994: 170-175.
- Koziel MJ, Darryll D, Afdhal N, Choo Q-L, Houghton M, Ralston R, Walker BD. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol* 1993; 67: 7522-7532.
- Koziel MJD et al. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 1992; 149:3339.
- Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DM, Kuo G, Di Bisceglie AM, Houghton M, Reyes GR, Kim JP, Choo Q-L, Alter JM. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992; 103: 622-629.
- Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DW, Kuo GK, Di Bisceglie AM, Houghton M et al. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992; 103: 622-29.
- Kuo G, Choo QL, Alter GL, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
- Kushner JP, Edwards CQ, Dadone MM. Heterozygosity for HLA-linked hemechromatosis as a likely cause of the hepatitis siderosis associated with sporadic porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology* 1985; 88: 1232-1235.
- Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K, et al. HLA DR 13 is a marker for low activity of hepatitis in hepatitis C carriers in Japan. *Hepatology* 1994; 20: 237A.
- Kwok S, Higachi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.

- Lasarte J-J, Sarobe P, Gullon A, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Induction of cytotoxic T lymphocytes in mice against the principal neutralising domain of HIV-1 by immunisation with an engineered T-cytotoxic-T-helper synthetic peptide construct. *Cell Immunol* 1992; 141: 561-564.
- Laskus T, Radkowski M, Lupa E et al. Prevalence of markers of hepatitis viruses in outpatients alcoholics. *J Hepatol* 1992; 15: 174-78.
- Lau J, Davis G, Kniffen J. et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993; 341:1501-1504.
- Lau J, Davis GL, Orito E, Quian K-P, Mizokami M. Significance of antibody to the host cellular gene derived epitope GOR in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1992; 17: 253-257.
- Laun TYN, Davis GL, Orito E, Qrito E, Quian K-P, Mizokami M. Significance of antibody to the host cellular gene derived epitope GOR in chronic HCV infection. *J Hepatol* 1992; 17: 253-257.
- Lee MI, Courter SG, Tait D, Kingdom MS. Long-term evaluation of intravenous immunoglobulin preparations with regard to non-A, non-B hepatitis safety. In: Zuckerman AS (ed) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R. Liss, New York, 1988: 596-599.
- Lefkowitz JH, Grossman ME. Hepatic pathology in porphyria cutanea tarda. *Liver* 1983; 3: 19-29.
- Lemon SM. Type A viral hepatitis: new developments in an old disease. *N Engl J Med* 1985; 313: 1059.
- Lemon SM. Hepatitis A virus: current concepts of the molecular virology, immunobiology and approaches to vaccine development. *Rev Med Virol* 1992; 2: 73.
- Lennartz L, Kamel M, Troonon H, Simpson B, Pelzer C, Sutherland R. Prevalence of IgG and IgM antibodies against hepatitis C virus (HCV) in Egyptian blood donors. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstracts, p. 212.
- Lentzi M, Johnson PJ, McFarlane IG. Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune Liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet* 1991; 338: 277-280.

- Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U, Zaudi D, Bianchi FB. Type 2 autoimmune hepatitis and HCV infection. *Lancet* 1990; 335: 258-259.
- Lenzi M, Tohnson PT, Mc Farlane IG, Ballardini G, Smith HM, Mc farlane BM, Bridger C, Vergani D, Bianchi FB, Wikkiams R. Antibodies to HCV autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity *Lancet* 1991; 338: 277-280.
- Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Selleri L, Volta U, Zauli D, Bianchi FB. Type 2 autoimmune hepatitis and HCV virus infection. *Lancet* 1990; 335: 258-259.
- Lenzi M, Johnson PJ, Mc Farlane IG et al: Antibodies to hepatitis C virus in autoimmune liver disease: evidence for geographical heterogeneity. *Lancet* 1991; 338: 1370-78.
- Levo Y, Goreic PO, Kassad HJ, Zucker-Franklin DD, Franklin EC. Association hepatitis B virus and essential mixed cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1977; 246: 1501-1504.
- Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, Mc Courr DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E<sub>2</sub>-NS<sub>2</sub> region: Identification of p7 and two distinct E<sub>2</sub> - specific products with different C termin. *J Virol* 1994; 68: 5063-5073.
- Lindsay KL. Chronic Hepatitis C: Issues and problems with current therapy. Postgraduate course: New and Evolving Therapies for Hepatic and Biliary Diseases. AASLD. November 4-5, 1993: 131-150.
- Lindsay KL. Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology* 1997; 26(Suppl1):S71-S77.
- Lobato MN, Berger TG, Porphyria cutanea tarda associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1009-1010.
- Loeper J, Descatoire V, Maurice M. Cytochrome P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autotibodies. *Gastroenterology* 1993; 104: 203-216.
- Lohr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer Zum Buschenfelda KH, Fleischer B. The human asialo-glycoprotein receptor is a target antigen for liver - infiltrating T cells in autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12: 1314-1320.

- Lohr HF, Elste C, Diens HP, Michel G, Braum H-B, Meyer zum Buschenfelde K-H, Gerken G. The quantitative humoral immune response to the hepatitis C virus is related to disease activity and the outcome from therapy. *J Hepatol* 1996; 25: 292-300.
- Lohr HF, Gerken G, Schlicht H-J, Meyer zum Buschenfelde K-H, Fleischer B. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenously processed surface and core proteins in chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 1993; 168: 1133-1139.
- Lohr HF, Gerken G, Michel G, Meyer Zum Buschenfelde K-H. In vitro secretion of anti-GOR protein and anti-hepatitis C virus antibodies in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107:1443-1448.
- Lohr HF, Schlaak JF, Gerken G, Fleischer B, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde K-H. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* 1994; 14: 161-166.
- Lohr HF, Schlaak JF, Kollmannsperger S, Meyer zum Buschenfelde K-H, Gerken G. Liver-infiltrating and peripheral blood T cells in chronic hepatitis C: Immunodominant epitopes, HLA-restriction and functional significance. *Liver* 1995; 24: 172-184.
- Lohr H, Fleischer B, Michel G et al: Hepatitis C virus antibody secretion in vitro by peripheral blood lymphocytes. *J Hepatol* 1992; 14: 112-17.
- Long EO, Jacobson S. Pathways of viral antigen processing and presentation to CTL. *Immunol Today* 1986; 10: 45-48.
- Λουίζου Κ, Λιλής Δ, Κραββαρίτης Α, Δούμας Α, Χατζηκωνσταντίνου Β. Αντισώματα έναντι του ιού της ηπατίτιδας C σε αιμοδιυλιζόμενους ασθενείς. *Ιατρική* 1992; 61: 76-79.
- Lundvall O, Weinfeld A, Lundin P. Iron storage in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand* 1970; 188: 37-53.
- Lundvall O. The effect of phlebotomy therapy in porphyria cutanea tarda. *Acta Med Scand* 1971; 189: 33-49.
- Lunel F, Abuat N, Frangeul L, Gripon P, Perrin M, Coz YL, Valla D, Borggta E, Yamamoto AM, Hurax JM, Opolon P, Homberg JG. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992; 16: 630-636.

- Lunel F, Aduaf N, Frangeul L et al: Liver Kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992; 16: 630-36.
- Lunel F, Loiseau P, Cresta P, et al. Symptomatic cryoglobulinemia in patient with hepatitis C: role of HCV genotypes and viremia. *Hepatology* 1994: 20-253 A (Abstract).
- Mac Farlane IG et al. Hepatitis C antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor of false positive result. *Lancet* 1990; 754-757.
- Mackay IR, Frazer IH, Toh BH, Pedersen JS, AIter HJ. Absence of autoimmune serological reactions in chronic non-A, non-B viral hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1985; 61: 39-43.
- Magrin S, Craxi A, Fiorentino G. Is autoimmune chronic active hepatitis an autoimmune disease? *J Hepatol* 1991; 13: 56-60.
- Μαλλιώρα και συν. Αδημοσίευτες παρατηρήσεις.
- Μάνεσης Ε. Σχέση ηπατοκυπαρικού καρκίνου και ιού της ηπατίτιδας C. Εις: Χατζηγιάννης ΣΙ, εκδ. Ηπατίτιδα C. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις π.χ. Πασχαλίδη 1994: 111-20.
- Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IIO6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88: 1370-1378.
- Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. In *Progress in Hepatology*. Miguet JP, Dhumeaux D. (Eds). Paris 1993: 79-88.
- Mantero G, Zonaro A, Albertini A, Bertolo P, Primi D. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem* 1991; 37:422-429.
- Μαραντίδου Ο, Αυγερίδης Κ, Αλεξανδροπούλου Ζ, Πέτρου Α, Τσιλεδάκη Μ, Κουτούγκου Ε, Θεοδώρου Ε, Μανιάτη Α. Συχνότητα δεικτών μεταδοτικών νοσημάτων στο αίμα εθελοντών αιμοδοτών και αιμοδοτών συγγενικού ή φιλικού περιβάλλοντος. Abstract: Αιματολογικό Διήμερο, Λάρισα, Νοέμβριος 1994.
- Marcellin P, Boyer N, Gervais A, et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-α therapy. *Ann Intern Med* 1997; 127:875-881.

- Margin S, Craxi A, Fabiano C, Fiorentino G, Almasio P, Palazzo U, Prinzello G, Provenzano G, Pagliaro L, Choo QL, Kou G, Polito A, Han J, Houghton M. Hepatitis C virus replication in autoimmune chronic hepatitis. *J Hepatol* 1991; 13: 364-367.
- Margolis H. Epidemiology and control of viral hepatitis AASLD. Postgraduate Course: New and Evolving Therapies for Hepatic and Biliary Diseases. Chicago. November 4-5, 1993: 125-130.
- Marinho R, Ramalho F, Velosa J, Moura MC. Risk of infection in hepatitis C in health care workers. *J Hepatology* 1991; 13:50.
- Martell M et al. Hepatitis C virus HCV circulates as a population of different but closely related genomes: quasi-species nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66:3225.
- Mason PW et al. Japanese encephalitis virus vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 1991; 180:294-305.
- Mast S, Gerberding JL. Factors predicting needle stick infectivity exposure to HCV: An in vitro model. *Clin Res* 1991; 39: 2.
- Mast EE, Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Semin Virol* 1993, 4:273-283.
- Matsuda Y, Takase S, Sawada M et al. Effect of alcohol abuse on HCV replication. Proceeding 8th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo, Japan 1993; abst. 558.
- Mc Chesney MB et al. Viruses perturb lymphocyte function: selected principles characterizing virus induced immunosuppression. *Ann Rev Immunol* 1987; 5:279.
- Mc Farlane BM, Mc Sorley CG, Vergani D, Mc Farlane IG, Williams R. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialo-glycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol* 1986; 3: 196-205.
- McFarlane IG. Autoimmunity and hepatotropic viruses. *Semin Liver Dis* 1991; 11:223-233.

- McFarlane JG, Smith HM, Johnson PJ, Bray GP, Vergani D, Williams R. Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false positive results? *Lancet* 1990; 335: 754-757.
- McGuinness PH, Bishop A, Lien A, Willey B, Parsons C, McCaughan GW. Detection of serum hepatitis C virus RNA in HCV antibody-seropositive volunteer blood donors. *Hepatology* 1993; 18: 485-90.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schuf EA, et al. Interferon a-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-1492.
- Melbye M, Biggar RJ, Wantzin P, Krogsgaard K, Ebbesen P, Becker NG. Sexual transmission of hepatitis C virus: cohort study (1981-9) among European homosexual men. *BR Med J* 1990; 301:210-212.
- Meltzer M, Franklin EC, Elias K, Mc Cluscey AT, Cooper N. Cryoglobulinemia: a clinical and laboratory study. II. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med* 1966; 40: 837-856.
- Mendenhall CL, Seef L, Diehl AM et al: Antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus in alcoholic hepatitis and cirrhosis. Their prevalence and clinical relevance. *Hepatology* 1991; 14: 581-89.
- Mergener K, Michel G, Braun H-B, Thome-Kromer B, Korn A, Myller R, Manns M. Anti-GOR titers in chronic hepatitis C in relation to interferon therapy. *J Hepatol* 1992; 16: 4A.
- Michel G, Ritter A, Gerken G et al: Anti-GOR and Hepatitis C virus in autoimmune Liver disease. *Lancet* 1992; 339: 267-69.
- Michel G, Ritter A, Gerken GJ, Zum Buschefelde KH, Decker R, Manns MP Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune Liver disease. *Lancet* 1992; 339: 267-269.
- Michiro S, Hoshi Y, Takeda K, Yoshikawa A, Gotanda T, Takahashi K, Akahane Y, et al Non-A non-B hepatitis specific antibodies directed at host-derived epitope: implication for an autoimmune process. *Lancet* 1990; 336: 1400-1403.
- Mimus LT, Mosley JW, Hollinger FB et al: Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *BMJ* 1993; 307: 1095-96.



- Minutello MA, Pireli P, Unutmaz D, Censini S, Kuo G, Houghton M, Brunetto MR, Bonino F, Abrignani S. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: Intrahepatic CD4<sup>+</sup> T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* 1993; 178: 17-25.
- Mishiro S, Takeda K, Hoshi Y, Yoshikawa A, Gotanda T, Itoh Y. An autoantibody cross-reactive to HCV core and host nuclear antigen. *Autoimmunity* 1991; 10: 269-273.
- Mishiro S, Hoshi Y, Takeda Y, Yoshikawa A, Gotanda T, Takahashi K, Akahane Y, Yoshizawa H, Okamoto H, Tsudo F, Peterson DA, Muchmore E. Non-A, non-B hepatitis specific antibodies directed at host - derived epitope: implication for an autoimmune process. *Lancet* 1980; 336: 1400-1403.
- Mishiro S, Takeda K, Hoshi Y, Yoshikawa A, Gotanda T, Itoh Y. An autoantibody cross-reactive to hepatitis C virus virus and host nuclear antigen. *Autoimmunity* 1991; 10: 269-273.
- Mishiro S. Hepatitis C virus in the Eastern Hemisphere populations. Fourth International Symposium on HCV. Tokyo, Japan, May 7-9, 1993. Program and Abstracts p. 19.
- Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviours of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
- Mitchel LS, Jeffers LJ, Reddy KA, Cheinquer H, Coelho-Little E, Moreda A, Parker T, Silva M, Li XM, de Medina M, Coelho-Morges S, Hill M, Altman R, Manns MP, Schiff ER. Detection of hepatitis C virus antibody by first-and second generation assays and polymerase chain reaction in patients with autoimmune chronic active hepatitis types I, II and III. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1027-1034.
- Mohler M, Tox U, Kallinowski L, Goeser T. Influence of interferon a and ursodesoxycholic acid on anti-HCV IgM and HCV-RNA. *Hepatology* 1994;20: 169A.
- Mondetti M et al. Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBv core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 1983; 129:2773-2778.

- Mosley JW, Redeker AG, Feistone SM, Puriell RH. Multiple hepatitis viruses in multiple attacks of acute viral hepatitis. *New England Journal of Medicine* 1977; 296: 75-78.
- Mosley JW. Viral hepatitis: a group of epidemiologic entities. *Can Med Assoc J* 1972; 106: 427-434.
- Μπολέτης Α, Σταθάκης χ, Μυριαγκού Β και συν. Επιπολασμός αντισώματος του ιού ηπατίτιδας C σε αιμοκαθαιρόμενους και σε ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού. *Ιατρική* 1992; 61:80-84.
- Muller HM, Praff E, Goeser T, Kallinauski B, Solbach C, Theilmann L. Peripheral blood leucocytes serve as possible extrahepatic site for HCV replication. *J Gen Virol* 1993; 74: 669-676.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 1987; 155:335-350.
- Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Synergism between tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1992; 22: 301-307.
- Muratori L, Lenzi M, Cataleta M, Giostra F, Cassani F, Ballardini G, Zauli D, Bianchi FB. Interferon therapy in liver/kidney microsomal antibody type 1-positive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21: 199-203.
- Mutsutori Sh et al. Induction of cytotoxic T cells to a cross reactive epitope in the hepatitis C virus non-structural RNA polymerase line protein. *J Virol* 1992; pp 4098-4106.
- Nagayama R, Tsuda F, Okamoto H, Wang H, Mitsui T, Tanaka T, Miyakama Y, Mayami M. Genotype dependence of HCV antibodies detectable by the first generation enzyme-linked immunosorbent assay with C100-3 protein. *J Clin Invest* 1993; 92: 1529-1533.
- Naito M, Hayashi N, Moribe T, et al. Hepatitis C virus quasispecies in various stages of chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994; 20: 232A.
- Nalpas B, Thiers V, Pol S et al: Hepatitis C viremia and anti-HCV antibodies in alcoholics. *J Hepatol* 1992; 14: 381-84.

- Nalto M, Hayashi N, Hagiwara H, et al. Serum hepatitis C virus ANA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *Hepatology* 1994; 19: 871-5.
- Naplas B, Driss F, Pol S et al: Association between HEV and HBV infection in hepatocellular carcinoma and alcoholic Liver disease. *J Hepatol* 1991; 12: 70-74.
- Naumov NV et al. Relationship between expression of hepatitis B antigens in isolated hepatocytes and autologous lymphocytes cytotoxicity in patients with chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 1984; 4:63-68.
- Negro F, Pacchioni D, Shimizu, et al. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C Virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2247-2251.
- Nin MT, Coleman PJ, Alter MJ: Multicenter Study of Hepatitis C virus infection in chronic Hemodialysis patients and Hemodialysis Center Staff members. *Am J Kidney Dis* 1993; 22: 168-73.
- Nishiguchi S, Kuroki T, Ukeda T, Fukuda K, Takeda T, Nakajima S, Shiomi S, Kobayashi K, Otani S, Hayashi N, Shikata T. Detection of hepatitis C virus antibody in the absence of viral RNA in patients with autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1992; 116: 21-25.
- Nishiguchi S, Kuroki T, Yabusako T et al: Detection of hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus RNA in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1991; 14: 985-89.
- Nishioka M: Nuclear antigens in autoimmune hepatitis. In Meyer zum Buschenfelde KH, Manns MP and Hoofnagle JR (eds): *Immunology and the Liver*. MTP Press Ltd. Lancaster. England 1993.
- Nousbaum JB, Pol S, Gigou M, et al. Evidence for take over of HCV type II on type I among European patients with cirrhosis with and without HCC. *J Hepatol* 1993; 18 (Suppl) S17.
- Ντουράκης Σ, Χατζηγιάννης Σ. Ηπατίτιδα C και μεταμόσχευση ήπατος. Στο: Σ.Ι. Χατζηγιάννη: Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Π. Πασχαλίδης, Αθήνα 1994.
- Ντουράκης Σ. Κλινική σημασία θετικών αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C σε ασυμπτωματικά άτομα. *Ελληνική Γαστρεντερολογία* 1993; 1:74-81.

Ντουράκης Σπ. Ιατρική 2000; 77(1): 25-29.

Ντουράκης ΣΠ. Χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση από τον ΗCV. Εις: Χατζηγιάννης ΣΙ:  
Ήπατίτιδα C. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη 1994: 97-110.

Ogata NR, Alter HJ, Miller RH, et al. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 3392-6.

Ogata N et al. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:3392.

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N. et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. N Engl J Med 1994; 330:744-756.

Okamoto H, Kojiima M, Okada S. Genetic drift of HCV during an 8,2 year injection in a Chimpanzee variability and stability. Virology 1990: 894-899.

Okamoto H, Okada S, Sugiuama Y, και συν. The 5'-terminal sequence of hepatitis C virus genome. Jpn J Exp Med 1991; 60: 167-177.

Okamoto H, Tsuda F, Machida A, Munecata E, Akahame Y, Sugai Y, Mashiko K, Mitsui T, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of HCV infection. Hepatology 1992; 14: 180-186.

Okamoto H, Kojima M, Okada S et al. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. Virology 1992; 190: 894-899.

Oldstone MBA. Viral persistence. Cell 1989; 56:517

Omata M, Iwama S, Sumida M, Ito Y, Okuda K. Clinico-pathological study of acute NANB post-transfusion hepatitis: histological features of liver biopsies in acute phase. Liver 1981; 1: 201-208.

Oshita M, Hayashi N, Kasahara A et al: Prevalence of hepatitis C virus in family members of patients with hepatitis C. J Med Virol 1993; 41: 251-55.

Osmond DH, Padian NS, Sheppard NW et al: Risk factors for hepatitis C virus seropositivity in heterosexual couples. JAMA 1993; 269: 361-65.

Overby IA. Hepatitis C: looking at a virus that hasn't been seen. Gut 1993; 34: 6-S9.

Παπαθεοδωρίδης ΓΒ, Δελλαδέτσιμα Ι, Αγγελοπούλου Β και συν. Επιπολασμός αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C σε χρόνιες ηπατοπάθειες. Ιατρική 1993; 63: 570-574.

Παπαθεοδωρίδης ΓΒ, Τασσόπουλος ΝΚ. Η επιδημιολογία του ιού της ηπατίτιδας C. Ιατρική 1993; 64:504-512.

Παπαϊωάννου Χ, Μάνεσης Ε, Σάββας Σ, Ντουράκης Σ, Παρασκευάς Ε, Τσιόπου Μ, Χατζηγιάννης Σ. Σύγκριση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας 6 και 12 μηνών με α-ιντερφερόνη στη χρόνια ηπατίτιδα C. Στο: Σ.Ι. Χατζηγιάννη: Ηπατίτιδα C, εκδόσεις Π. Πασχαλίδης, Αθήνα 1994.

Pares A, Barrera JM, Caballeria J et al: Hepatitis C virus antibodies in chronic alcoholic patients: association with severity of liver injury. Hepatology 1990; 12: 1295-99.

Paro T, Marcellin P, Bernuau J, Durand F, Poynard T, Benhamou JP. Autoimmune chronic hepatitis exacerbated by alpha-interferon. Ann. Intern. Med. 1992; 116: 51-53.

Parsteriacu MS. Cytotoxic lymphocytes. Ann Int Med 1988; 33: 17-44.

Pasquariello A, Ferri C, Moriconi L et al. Cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus. Am J Nephrol 1993; 13:300-304.

Pawlofsky JM, Roudot-Thoraval F, Simmonds P, Mellor J, BenHayahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Zafrani ES, Dunal J, Dhumeaux D. Extra-hepatic immunological manifestations in chronic hepatitis C: role of HCV serotypes. Hepatology 1994; 20: 385A.

Pawlotsky J-M, Deforges L, Bretagne S, Andre C, Metreau J-M, Thiers V, Zafrani E-S, Goosens M, Duval J, Mavrier J-P, Dhumeaux D. Hepatitis C virus infection can mimic type 1 (antinuclear antibody positive) autoimmune chronic active hepatitis. Gut 1993; Suppl e: S66-S68.

Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, Missale G, Fowler P, Gluberti T, Fiaccadori F, Ferrari C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2 restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. J Exp Med 1991; 174: 1565-1570.

Percita L, Barreto M, Spinelli V, Medeiros L, Mizokami M, Saleh M, Tibbs C, McFarlane I, Williams R. Hepatitis C without viremia in Brazilian blood donors. International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstract, p. 212.

- Pereira BJJ, Milford EI, Kirkman RL, Lavery AS. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 1991; 325:454-460.
- Perrillb RP, Phol DA, Roodman ST, Tsai CC. Acute NANB hepatitis with serum sickness-like syndrome and aplastic anaemia. *JAMA* 1981; 245: 494-6.
- Phillips AE et al. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991; 354:453.
- Plate et al. Retrovirus antigens recognized by cytolytic T lymphocytes activate tumor rejection in vivo. *Cell* 1987; 48:231-140.
- Pohjanpetto PM, Tallgren M, Farkklia M. Iovv prevalence of hepatitis C antibodies in chronic liver disease in Finland. *Scand J Infect Dis* 1991; 23:139-142.
- Polish L, Tong M, Co R, Coleman P, Alter M. Risk factors for hepatitis C virus transmission among health care personnel in a community hospital. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Japan, May 10-14, 1993. Abstracts, p. 212.
- Πολίτη Κ, Βρετού Ε, Richardson SC και συν. Η ηπατίτιδα C στη μεσογειακή αναιμία. *Ιατρική* 1992; 61: 48-53.
- Πολίτη Κ. Ηπατίτιδα C και Αιμοδοσία. ΣΙ Χατζηγιάννη: Ηπατίτιδα C. Εκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα 1994: 143-151.
- Pontisso P, Ruvoletto M, Fattorich G, et al: Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections. *Gastroenterology* 1993; 105: 1529-33.
- PorallaT, Triechel U, Lohr H, Fleisher B. The asialo-glycoproteine receptor as target structure in autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 215-222.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomized trial of interferon a-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon a-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352:1426-1432.
- Prince AM et al. Immunity in hepatitis C infection. *J Inf Dis* 1992; 165:438-443.
- Purcell RH, Gerin JL. Hepatitis delta virus. in Fields BN et al. (eds). *Virology*, 2<sup>nd</sup> edn, N. York: Raven Press, 1990; p: 225.

- Popp JW, Dienstag JL, Wands JR, Block KJ, essential mixed cryoglobulinemia without evidence for hepatitis B virus infection. *Ann Intern Med* 1980; 92:379-383.
- Quián C, Camps J, Maluenda MD, Civeira MP, Prieto J. Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. *J Hepatol* 1992; 16: 380-383.
- Raffm et al. Role of thymus derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature* 1970; 226: 1257-1259.
- Ραμπούλου-Γιγή Μ, Ζαραφείδου Ε, Ορφανού-Κουμερκερίδου Ε, Κυζιρίδης Ι, Τσακίρη Ι, Γουλής Γ. Επιπολασμός αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C και δεικτών λοιμώξεως με τον ιό ηπατίτιδας B σε νοσοκομειακό προσωπικό. *Ιατρική* 1992; 61: 104-106.
- Ratzan KR, Gregg MB, Hanson B. Transfusion associated hepatitis in the United States: an epidemiologic analysis. *Am J Epidemiology* 1971; 94: 425-434.
- Rice CM, Strauss EG, Strauss JH. Structure of the flavivirus genome. In: Schlesinger S., Schlesinger MJ eds. *Togaviridae and flaviviridae*. New York: plenum Publishing Corporation, 1986: pp 279-326.
- Rise PS, Smith OB, Simmonds P, Holmes E: Heterosexual transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 342: 1052-53.
- Rizzeto M και συν. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of delta antigen: An active and progressing disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med* 1983; 98: 437.
- Rizzeto M και συν. Hepatitis delta virus. *Disease Prog Liv Dis* 1986; 8: 417.
- Rizzeto M, Esteban R, Weilando Trepo C. Hepatitis C. Prevalence and incidence of both infection and disease. *Seminar on Hepatitis C*. Edited by European Commission, Luxembourg, 1994: 11-4-9.
- Rocchi E, Gibertini P, Casanelii M, Pietrangello A, Jensen J, Ventura E. Hepatitis B virus infection in porphyria cutanea tarda. *Liver* 1986; 6: 153-157.
- Rossini A, Ravaggi A, Biasi L, et al. HCV infection with normal ALT and chronic hepatitis: Long-term follow-up and genomic characterization of HCV-RNA. *Hepatology* 1994; 20: 242A.

- Roth D, Fernandez JA, Babisckin S, et al. Detection of hepatitis C virus infection among cadaver organ donors: evidence of low transmission of disease. *Ann Intern Med* 1992; 117:470-475.
- Rotzchke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognised by cytotoxic T cells. *Nature* 1990; 348: 252-255.
- Rotzschne O et al. Naturally occurring peptide antigens derived from MHC-class I restricted processing pathway. *Immunol Today* 1991; 12:447.
- Ρουμελιώτου Α, Κοτσιανοπούλου Μ, Παπουτσάκης Γ, Παπαευαγγέλου Γ. Σεξουαλική μετάδοση του HCV. *Ιατρική* 1992; 61:72-75.
- Rowan BP, Smith A, Gleeson D, Hunt IP, Warnes TW. Hepatitis C virus in autoimmune Liver disease in the UK: aetiological agent of artifact. *Gut* 1994; 35: 542-546.
- Rubin Farber: Pathology, JB Lippincott Company, Philadelphia 1989: 746-750.
- Rumenapf T, Stark R, Meyers G, Thiel HJ. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus. Further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 1991; 65: 589-597.
- Saiki AK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-491.
- Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe TY, Koi S, Onfi M, Ohta Y, Choo QL, Houghton M, Kuo G. Hepatitis V virus infections is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6547-6549.
- Salata H, Cortes JM, Enriquez de Salamanca R. Porphyria cutanea tarda and hepatocellular carcinoma-frequency of occurrence and related factors. *J Hepatol* 1985; 1: 477-487.
- Sanchez-Pescador R, Sheridar PJ, Detmer JJ, et al. Quantitative detection of HCV ANA in human sera using a chemiluminescence signal amplification oligonucleotide probe assay. *Hepatology* 1992; 16:588 (abst 299).
- Schmilovitz-Weiss H, Levy N, Thompson N, Dusheiko G. Viral markers in the treatment of hepatitis B and C. *Gut* 1993; 34:S26-S35.



- Schrumpft E, Eigjo K, Fausa O. The significance of anti-hepatitis C virus antibodies measured in chronic Liver disease. *Scand J Gastroentrol* 1990; 25:1169-1174.
- Schupper H, Hayashi P, Scheffel J, Aceituno S, Paglieroni T, Holland PV, Zeldis JB. Peripheral-blood mononuclear cell responses to recombinant hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1993; 18: 1055-1060.
- Seeff LB and the NHLBI Study Group. Mortality and morbidity of transfusion-associated type C hepatitis: An NHLBI multi-center study. *Hepatology* 1994; 20: 204A.
- Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ. et al. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1992; 327: 1906-11.
- Sertaly L, Chagouilleres Q, Pawlotsky JM, et al. Level of viremia, genotype, histological features and effect of interferon therapy in HCV carriers with persistently normal ALT activity. *Hepatology* 1994; 20: 165A (Abstract).
- Σφουριδάκη Α, Αθανασάκη Φ, Κουρούσης Χ, Σκορδιλάκη Α, Μουντράκη Μ, Μαλλιαράκη Ε, Γεωργούλιας Β. Τυφλός ανώνυμος έλεγχος για τους ιούς HIV και ηπατίτιδας C (HCV) και HTLV -1 στην Κρήτη. 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων. Αθήνα, 1994. Τόμος Περιλήψεων σελ. 37.
- Shapiro C. Epidemiology of viral hepatitis. AASLD, 45th Annual Meeting Chicago, November 1994.
- Shimizu YK, Feistone SM, Purcell RH, et al. Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979.
- Shimotohno K. HepatoceIIular carcinoma in Japan and its linkage to infection with hepatitis C virus. *Semin Virol* 1993; 4:305-312.
- Shin CM Lo SJ, Miyamura T et al: Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis B virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993; 67: 5823-32.

- Shindo M, Yoshimoto Y, Arai K, Sokawa Y, Okuno T. The virological state of asymptomatic subjects with positive anti-HCV and normal liver biochemical values. *Hepatology* 1994; 20: 234A.
- Shirai M, Ikada H, Nishioka M, Akatsuka T, Wychowski C, Houghton R, Pendleton CD, Feistone SM, Berzofsky JA. An epitope in hepatitis C core region recognised by cytotoxic T cells in mice and humans. *J Virol* 1994; 68: 3334-3342.
- Silva E, Sallie A, Tibbs C, McFallane A, Johnson P, Williams R. Absence of hepatitis C virus in British patients with type 1 autoimmune chronic active hepatitis-a polymerase chain reaction and serological study. *J Hepatol* 1993; 19: 211-215.
- Silverman AI, Puccio JE, Kulesza GW et al: HCV RNA in the menstrual blood of women with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89: 1201-1202.
- Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. Nomenclature for genotype of hepatitis C virus. Submitted 1994.
- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS<sub>5</sub> region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399.
- Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan S-W, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: Identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J Gen Virol* 1993; 74: 66168.
- Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan SW, Mc Omish F, Dow BC, Follet EA, Yap PL, Matsden H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in NS<sub>4</sub> region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, 3. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1493-1503.
- Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, et al. Hepatitis C virus infection as a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a case-control study. *Ann Intern Med* 1992; 116: 97-102.
- Skidmore SJ, Collingham KE, Drake SM: Sexual transmission of hepatitis C. *J Med Virol* 1994; 42: 247-48.

- Σκληρός Ε, Βλάχος Δ, Αργυρόπουλος Θ, Μαροπούλου Δ, Παπούλια Ε, Μυγδάκη Α, Κουρεντή Α, Σωφρονιάδου Κ. Αντισώματα ηπατίτιδας C σε πληθυσμό παλινοστούντων από την πρώην ΕΣΣΔ. 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων. Αθήνα, 1994. Τόμος Περιλήψεων σελ. 39.
- Smith HM, Daniels CJ, Tibbs JYN et al: HCV in non replicative chronic HCV infection. *J Hepatol* 1992; 14: 405.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503.
- Steenivasan MA, Banerjee K, Pandya PG. Epidemiological investigation of an outbreak of infections hepatitis in Almedabad city during 1975-1976, *Indian J Med Res* 1978; 67: 197-206.
- Stevens CE, Taylor PE. Perinatal and sexual transmission of hepatitis C virus: a preliminary report. In: *Viral Hepatitis and Liver Diseases*. Hollinger AB, Lemon SM, Margolis H (eds). Williams and Wilkins, Baltimore, 1990: 407-410.
- Stroffolini T. The epidemiology of hepatitis B and delta in Italy. *J Prevent Med Hyg* 1993; 34:37 -39.
- Stuhler G, Walden P. Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2279-2286.
- Tabor E, Drucker JA, Hoojnagle JH και συν. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzees. *Lancet* 1978; 1: 463-466.
- Tabor E, Geretu RJ, Drucker JA και συν. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1979; 1: 463-466.
- Takamatsu K, Okayasu I, Koyanagi Y, Yamamoto N. Hepatitis C virus propagates in salivary glands. *J Infect Dis* 1992; 165: 973-974.
- Takamizawa A, Mori C, Fuke I, και συν. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105-1113.
- Takehara T, Hayashi N, Mita E, Hagwara H, Ueda K, Katayama K, Kasahara A και συν. Detection of the minus strand of HCV 's RNA by reverse transcription and polymerase chain reaction: implications for HCV replication in infected tissue. *Hepatology* 1992; 15: 387-390.

- Tanaka E et al. Significance of antibody to hepatitis C virus in Japanese patients with viral hepatitis: relationship between anti-HCV antibody and the prognosis of nonA-nonB post transfusion hepatitis. *J Med Vir* 1991; 33:117-122.
- Tanaka E, Kiyosawa K, Sodeyama T, Hayata T, Ohike Y, Nakano Y, Yoshizawa K, Furuta S, Watanabe Y, Watanabe J, Nishioka K. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Japanese school children: comparison with adult blood donors. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 460-464.
- Tanigushi S, Okamoto H, Sakamoto M, Kojima M, Tsuda F, Tanaka T, Munekata E, Muchmore EE, Petersen DA, Mishiro S. A structurally flexible and antigenically variable N - terminal domain of hepatitis C virus E<sub>2</sub>/NS<sub>1</sub> protein: implication for an escape from antibody. *Virology* 1993; 1992: 399-406.
- Τασσόπουλος ΝΚ, Χατζάκης Α, Δελλαδέτσιμα Ι, Βασιλοπούλου-Καδά Ε, Κουτελού Μ, Κουρουμπέσης Χ. Ιός ηπατίτιδας C και οξεία μη-Α,μη-Β ηπατίτιδα. *Ιατρική* 1992; 61: 39-43.
- Τασσόπουλος ΝΚ. Η εξέλιξη της οξείας τύπου C ηπατίτιδας. Εις: Χατζηγιάννης ΣΙ: Ηπατίτιδα C. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη 1994: 93-6.
- Tassopoulos NC, Dimopoulou IC, Sotirellos C, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of acute hepatitis B surface antigen negative hepatitis in Greek adults. *Hell J Gastroenterol* 1988; 1: 136-40.
- Tassopoulos NC, Hatzakis A, Delladetsima I, Koutelou MG, Todoulos A, Miriagou V. Role of hepatitis C virus in acute non-A. non-B hepatitis in Greece: A 5-year prospective study. *Gastroenterology* 1992; 102: 969-72.
- Tassopoulos NC, Hatzakis AE, Papatheodoridis GV. Kanvountzis G, Troonen H, Lennartz L. Early prediction of successful alpha-interferon therapy of chronic hepatitis C by core IgM antibodies. *J Hepatol* 1994; 20: 305-6.
- Tassopoulos N, Hatzakis A, Kuhns M, Miriagou V, Delladetsima I, Koutelou M. et al. Clinical and Laboratory features of acute community -acquired non-A, non-B, non-C hepatitis. Σε: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Eds K. Nishioka, H Suzuki, S. Mishiro, T. Oda. Springer-Verlang 1994: 80-84.
- Thaler MM, Park CK, Landers DV, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1991; 33:17-18.

- Tibbs C, Tohson PJ, Mc Faplane IG, Eddleston ALWF, Williams R. Detection of antibodies to core, envelope NS-1, NS-3, NS-5 regions of HCV in patients with chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1991; 14: 68A-82 (Abstract).
- Ticehurst et al. Replication of HAV: new ideas from studies with cloned cDNA: In Semler BL and Ehrenfeld E (eds) *Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Disease*, Washington: American Society for Microbiology. 1989: p. 27.
- Todros L, Touscoz G, D'Urso N. Hepatitis C virus-related chronic Liver disease with autoantibodies to Liver kidney microsomes (IKM). Clinical characterization from idiopathic LKM-positive disorders. *J Hepatol* 1991; 13: 128-131.
- Tog J, Libre JM, Carbonell M, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus and its relation with hepatitis B virus and HIV. *Br Med J* 1990; 301: 1130-1133.
- Tomei L, Falla C, Sautolini E, De Francesco S, La Mounica N. NS<sub>3</sub> is a serine protease required for processing of HCV polyprotein. *J Virol* 1993; 67: 4017-4026.
- Tran Van Nhieeu J, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, et al. Relationship between genotypes of HCV and histologic liver lesion in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 1994; 20: 247 A (Abstract).
- Treppo C et al. Diagnostic markers of viral hepatitis B and C. *Gut* 1993; (suppl 5) 20: 5-25.
- Τσελίκης Β, Ιγνατιάδης Θ, Γιαννοπούλου Μ, Σοφράς Σ, Κουρουπάκης Δ, Τσαντούλας Δ, Κοκκίνη Γ, Δημόπουλος Κ. Αντι-HCV οροθετικότητα σε ασθενείς τακτικού εξωτερικού ιατρείου. Ημερίδα για την Ηπατίτιδα C. Αθήνα, Ιανουάριος 1995.
- Tsiquaye VN, Zuckerman AJ. New human hepatitis virus [letter] *Lancet* 1979; 1: 1135-1136.
- Τσότος Αθ. Ιατρική Ιολογία. Αθήνα 1992. Ιατρικές εκδόσεις «Λίτσας».
- Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Maki K, Ohta Y, Miki K, Mizokami M, Ohba K, Tanaka S, Hattori N, Nomoto A. Antigenicities of group I and II HCV polypeptides-male mlat basis of diagnosis. *Virology* 1993; 192: 430-437.
- Uehava S, Abe Y, Saito T et al: Incidence of transmission of hepatitis C virus. *Tohokh J Exp Med* 1993; 171: 195-202.

- Ueno N, Sugaya H, Harada T et al: High rate of hepatitis C virus transmission to spouses from hepatitis patients with a history of transmission. *Int Hepatol Commun* 1994; 2: 250-56.
- Ulrich PP, Romeo JM, Lane PK, Kelly I, Daniel LJ, Vyas GN. Detection, semiquantitation and genetic variation in hepatitis C virus sequences amplified from the plasma of blood donors with elevated alanine aminotransferase. *J Clin Invest* 1990; 86: 1609-1614.
- Ulrich PP, Romeo JM, Vyas GN. Hepatitis C - the virus as well as antibody. *Gastroenterology* 1991; 100: 1145 (letter).
- Urdea MS, Horn T, Fultz T J, et al. Branched ONA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis virus. *Nucl Acids Res Symp Ser* no 24, Oxford University Press 1991: 197-200.
- Valls V, Enriquez de Salamanca R, Lapena I, Campos A, Ena J, Guera P, Rebollar JL. Hepatitis B serum markers in porphyria cutanea tarda. *J Dermatol* 1986; 13: 24-29.
- Van de Stouwe RA, Attia AA, Karanas A, Ciavarella D, Greco MH. Transient agranulocytosis associated with NANB hepatitis. *Gastroenterology* 1983; 89: 186-189.
- Van der Pool et al. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet* 1990; 335:558-560.
- Vyas GN, Ulrich PP. Molecular characterization of genetic variants of hepatitis B virus. In: Hollinger BF, Lemon SM, Margolis H (eds) *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Williams and Wilkins. Baltimore, 1991: 135-148.
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl J Med* 1995; 333: 1038-1044.
- Weiner AJ et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3468-3472.
- Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Grawford K, Bonino F, Saracce G, Choo Q-L, Haughon M, Hom JH. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus

envelope and NS<sub>1</sub> proteins and the pertivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991; 180: 842-848.

Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted disease. *J Am Med Assoc* 1993; 269:392-394.

Wolfsen HC, Ng CS, Craja AJ. Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: a newly recognized association. *Gastroenterology* 1993; 104: 1019A.

Wyke RJ, Tsiquaye KN, Thornton A και συν. Transmission of non-A, non-B hepatitis to chimpanjees by factor-IX concentrates after fatae complications in patients with chronic liver disease. *Lancet* 1979; 1: 520-524.

Χατζάκης Α. Γονιδιακή οργάνωση, πρωτεΐνες υπότυποι του HCV, σε Ηπατίτιδα C. Σ.Ι. Χατζηγιάννη, εκδόσεις Πασχαλίδη. 1994.

Χατζάκης Α. Γονότυποι και ορότυποι HCV. Σε: Ηπατίτιδα C. Σ. Χατζηγιάννης. Εκδ. Πασχαλίδη 1994.

Χατζηγιάννης Σ και συν. Αδημοσίευτες παρατηρήσεις.

Χατζηγιάννης Σ, Μπράμος Α, Ρηνιώτης Κ, Τέρπου Χρ, Γκιουστόζι Α, Άθανασόπουλος Δ, Βλάχου Α, Τσούρα Χ. Εστία υπερενδημικότητας HCV λοιμώξεως σε περιοχή της Ελλάδας. Ημερίδα για την Ηπατίτιδα C. Αθήνα, Ιανουάριος 1995.

Χατζηγιάννης Σ. Ηπατίτιδα C: Μια συχνή πάθηση -ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας. ΣΙ Χατζηγιάννη: Ηπατίτιδα C. Εκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα 1994: 11-29.

Χατζηγιάννης Σ. Ο ιός της ηπατίτιδας C. *Ιατρική* 1992; 61 :24-32.

Χατζηγιάννης ΣΙ. Ελεγχος των αιμοδοτών για αντισώματα έναντι του ιούς της ηπατίτιδας C. Πέντε σύγχρονα ερωτήματα. *Ιατρική* 1992; 61 :98-103.

Χατζηγιάννης ΣΙ. Ηπατίτιδα μη-A, μη-B. Η αρχή του τέλους; *Ιατρική* 1989; 55: 235-247.

Χατζηγιάννης ΣΙ. Ο ιός της ηπατίτιδας C. *Ιατρική* 1992; 61(1):24-32.

Χόρτη Μ. Παθολογοανατομική εικόνα ηπατίτιδα C. *Επιθεώρηση Υγείας*, 1991: 2 (4).

Yano M, Yatsushashi H, Jnone O, Inocuchi K, Koga M. Epidemiology and long term prognosis of hepatitis C virus infection in Japan. *Gut* 1993; 34: S13-S16.

- Yasukuki H et al. Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus in vivo. *Virology* 1993; 197:659-668.
- Yoshizawa H, Itoh Y, Iwakiri S, et al. Demonstration of two different types of non-A; non-B hepatitis by reinfection and cross-challenge studies in chimpanzees. *Gastroenterology* 1981; 81: 107-113.
- Yoshizawa H, Nojiri N, Takahashi K, Measurement of anti-GOR antibodies in prevention of postransfusion non-A, non-B, hepatitis. *Lancet* 1991; 337: 47-48.
- Young RA, Davis RW. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 1983; 80: 1194-1198.
- Zavitsanos X, Hatzakis A, Kaklamani E, et al. Association between hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma using assays based on structural hepatitis C virus peptides. *Cancer Res* 1992; 52: 5364-7.
- Zeldis JB, Dienstag JL, Gale RP. Aplastic anemia and NANB hepatitis. *Am J Med* 1983; 74: 64-68.
- Zerkl A, Sol C, Attia M, et al. High prevalence of HCV seropositivity with diverse patterns of core and non-structural protein recognition in Egyptian cancer patients and blood donors. VI International Symposium on Viral Hepatitis. Madrid, Spain, February 3-5, 1993. Book of Abstracts p. 37.
- Ζερβού Ε, Νταλέκος Γ, Γερολυμάτου Α, Μπούμπα Δ, Τσιάνος Ε. Δείκτες ηπατίτιδων Β και C σε αιμοδοτικό πληθυσμό της Ηπείρου. *Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας* 1998; 43(5): 482-489.
- Zignego AI, Macchia D, Monti M, Thiers V, Mazzetti M, Foschi M, Maggi E, et al. Infection of peripheral blood cells by hepatitis C virus. *J Hepatol* 1992; 15: 382-386.
- Zignego AL, Macchia, Monti M, Thiers V, Mazzeti M, Foschi M, Maggi E, Omagnani S, Gentilini P, Breschot C. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 15: 382-386.
- Zignego AI, Monti M, Mazzaro C et al. Hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia and B cell lymphoma. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 89-90.
- Zuckerman J, Clewley G, Griffiths P, Cockcroft A. Prevalence of hepatitis C antibodies in clinical health-care workers. *Lancet* 1994; 343: 1618-20.