EVALUACION DE UN SISTEMA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA UN ANTIGENO SINTETICO DEL CORE DEL VIRUS DE HEPATITIS C Y SU PREVALENCIA EN DONANTES DE SANGRE

Guillermo J. Padrón[1], Gilda Lemos[1], Giselle Sánchez[1], Enrique Arús[2], Roberto Domínguez[1], Glay Chinea[1], Belkis Tórres[3], Luis Rivera[4], Marlén Pérez[2], Vilma Blanco[1], Orlando Alfonso[5], Nancy Carrazana[5], Luisa López [5], Zoraida Rodríguez[5]

[1]Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162. Ciudad de La Habana, CP 10600 Cuba. [2]Hospital "Luis Díaz Soto", Ave. Monumental km. 3, Habana del Este, Ciudad de La Habana, Cuba. [3]Centro Nacional de Biopreparados, Bejucal. La Habana, Cuba. [4] Hospital "Carlos J. Finlay", Calle 114 y ave. 41, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. [5] Banco de Sangre Docente de Marianao, Calle 102 entre 31 y 31B, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en septiembre de 1993. Aprobado en abril de 1994

Key words: Hepatitis C, HCV, EIA, antibody, blood donors, Non A-Non B Hepatitis

SUMMARY

We evaluate the sensitivity and specificity of a diagnostic system for the detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV). The assay is based on a chemically synthesized antigen from the *core* of the virus and it works as an indirect microELISA for human sera or plasma samples. We studied the prevalence of the antibodies to this antigen among blood donors of Havana City. Sensitivity (96.5%) and specificity (99.6%) of the system were calculated on the basis of results of samples from different risk groups and blood donors, using second generation systems as reference. The external evaluations as well as the performance with a low titer reference panel confirmed the high sensitivity and specificity of the assay. The global prevalence found on the ground of 6 132 blood donors was 1.01%. We did not find any significant relation between anti-HCV positivity and sex, race or age.

RESUMEN

Se evaluó la sensibilidad y la especificidad de un sistema de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (VHC) basado en un antígeno del núcleo (*core*) de este virus, sintetizado quimicamente, y se estudió la prevalencia de anticuerpos contra este antígeno entre donantes de sangre de Ciudad de La Habana. Este sistema diagnóstico funciona según el principio de ensayo inmuno-enzimático indirecto tipo microELISA empleando como muestra suero o plasma humanos. La sensibilidad y la especificidad del sistema calculados globalmente según los resultados obtenidos con muestras de personas de diferentes grupos de riesgo y donantes, empleando como referencias sistemas de segunda generación, fueron de 96.5 y 99.6%, respectivamente. Tanto las evaluaciones externas como los resultados obtenidos ante un panel de referencia de bajo título corroboraron la alta sensibilidad y especificidad del sistema. La prevalencia global encontrada en 6 132 donantes estudiados fué de 1.01%, no encontrándose que el sexo, raza o edad influyera de manera significativa en la positividad a anti-VHC.

INTRODUCCION

El virus de la hepatitis C (VHC) es la principal causa de hepatitis no-A, no-B (HNANB) post transfusional y representa más del 90% de los casos de hepatitis asociados a las transfusiones. Se ha estimado que hasta el 10% de las transfusiones resultan en HNANB (Stevens *et al.*, 1990) y que, como mínimo, la mitad de ellas dan por resultado hepatitis crónica, que puede llegar a la cirrosis en más del 20% de los casos (Kuo *et al.*, 1989; Alter *et al.*, 1989).

Está reportado que entre el 1 y el 4% de los receptores de sangre en los Estados Unidos desarrollan HNANB (CDC, 1990) y un alto porciento de estos casos mueren eventualmente por disfunciones hepáticas (Alter, 1990). Estas cifras son aún más alarmantes para otros países como Japón, donde se calcula que alrededor del 16% de los pacientes transfusionados adquieren esta afección (Swinbanks, 1989). Katayama *et al.* (1990) afirman que los portadores de esta infección son generalmente asintomáticos. Por otra parte, los hemoderivados de administración parenteral también pueden transmitir el VHNANB (Habibi y Garetta, 1990; Finlayson y Tankersley, 1990), por lo que los grupos de riesgo de infección por el VHC están constituídos por todos aquellos individuos expuestos de una forma u otra al contacto parenteral con sangre o sus derivados.

El diagnóstico de laboratorio de la infección por el VHC se hizo posible sólo en 1989, con la descripción del virus mediante técnicas de ingeniería genética (Choo *et al.*, 1989). Los sistemas de primera generación, basados en una proteína recombinante de

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

362 aminoácidos fusionada a una molécula de superóxido dismutasa (SOD) denominada C-100-3, mostraron baja sensibilidad (Miyamura *et al.*, 1990; Mosley *et al.*, 1990; Van der Poel *et al.*, 1990) y especificidad (Mac Farlane *et al.*, 1990; Theilmann *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1990; Ikeda *et al.*, 1990). Esto motivó el desarrollo de sistemas diagnósticos de segunda generación que incluyen antígenos del *core* del virus y de otras regiones no estructurales (NS3 y NS5). Se ha comprobado que alrededor del 93 al 95% de las personas infectadas desarrollan anticuerpos contra la proteína del *core* (Muraiso *et al.*, 1990; Chiba *et al.*, 1991; Marcellin *et al.*, 1991; Chaudari y MacLean, 1991; Van der Poel *et al.*, 1991; Hosein *et al.*, 1991; Courouce y Janot, 1991; Beach *et al.*, 1992) los que aparecen más temprano y continúan presentes por más tiempo (Marcellin *et al.*, 1991; Courouce y Janot, 1991; Ebeling *et al.*, 1991; Claeys *et al.*, 1992; Yatsuhashi *et al.*, 1992). Alrededor de un 3-5% de los casos presentan una reacción preferencial por la proteína C33 (NS3) y sólo en una pequeña proporción la reacción se hace evidente exclusivamente mediante la proteína C-100-3. También es alta la correlación entre la presencia de anticuerpos contra el *core* y la infectividad del individuo (Garson *et al.*, 1990a; Garson *et al.*, 1990b; Kaneko *et al.*, 1990).

A pesar de los avances alcanzados en el diagnóstico de esta etiología, el uso de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos continúa siendo la única opción para el desarrollo de sistemas diagnósticos, debido a la imposibilidad actual de obtener antígenos naturales hasta tanto no se logre aislar o cultivar este virus.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la sensibilidad y la especificidad de un sistema de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra el VHC basado en un antígeno sintético del *core* del virus de la hepatitis C y estudiar la prevalencia de anticuerpos contra este antígeno entre donantes de sangre de Ciudad de La Habana.

MATERIALES Y METODOS

Sistema serológico utilizado

Las muestras diluidas 1:5 en tampón fosfato salino con 0.05% de Tween-20 se incubadron durante 30 minutos a 37°C en los pocillos de las placas de microELISA recubiertos previamente con el antígeno sintético. Los anticuerpos no específicos se eliminaron mediante lavados sucesivos empleando tampón fosfato salino con 0.05% de Tween-20. A continuación se añadió el conjugado de peroxidasa-anti-IgG humana (obtenida en carnero) y se incubó 30 minutos a 37°C. Después de los correspondientes lavados, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución compuesta por el sustrato específico de la enzima (H_2O_2) y un indicador (o-parafenilenediamina). La reacción se cuantificó mediante lectura fotométrica en un lector de placas a 492 nm. Se consideraron positivas aquellas muestras cuyos valores de densidad óptica resultaron repetidamente superiores al valor de corte y éste fue definido como el producto del promedio de los valores de densidad óptica de tres controles negativos por el coeficiente 1.8.

Evaluación del sistema ANTI-VHC

La sensibilidad y la especificidad del sistema se calcularon en base a los resultados obtenidos con muestras de personas de diferentes grupos de riesgo y donantes. Se emplearon como referencias los sistemas de segunda generación Abbott HCV EIA (Wiessbaden, Alemania) y UBI HCV EIA (Organon Teknika, Boxtel, Holanda). Para los estudios con muestras de donantes de sangre se tomaron todas las muestras positivas por el sistema estudiado para su confrontación con los sistemas comerciales, así como una selección de muestras negativas, incluyendo siempre aquellas que mostraron valores elevados de alanino aminotransferasa (ALAT).

Los resultados discrepantes entre el sistema ANTI-VHC y los sistemas comerciales fueron derimidas empleando el sistema suplementario LIA TEK HCV (Organon Teknika, Boxtel, Holanda).

La sensibilidad ante muestras de bajo título se determinó mediante el ensayo con el panel de sueros de bajo título PHV101 (Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA, USA).

Estudio de prevalencia en donantes

El estudio de la prevalencia de anticuerpos específicos contra el antígeno del *core* estudiado se realizó mediante el análisis de muestras de suero de 6 132 donantes que concurrieron al Banco Docente de Sangre de Marianao, Ciudad de La Habana, entre los meses de abril y septiembre de 1992.

El valor de ALAT de cada muestra de donante se determinó mediante la técnica colorimétrica empleando el sistema ultramicroanalítico SUMA (Centro de Inmunoensayo, Ciudad de La Habana).

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Wilcoxon para la comparación de muestras pareadas y la prueba de chi-cuadrado, con la corrección de Yates, para la comparación de proporciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación del sistema ANTI-VHC

La presencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis C mediante el sistema **ANTI-VHC** se basa en el empleo de un antígeno del *core* del VHC constituído por un péptido sintético diseñado en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Este péptido se escogió mediante una predicción teórica basada en la alineación de las secuencias nucleotídicas conocidas del VHC y otros flavivirus,así como en el análisis de los perfiles de hidrofilicidad, flexibilidad y exposición de las regiones de mayor interés para el diagnóstico.

Al estudiarse 599 muestras de personas de diferentes grupos de riesgo (114 pacientes con diferentes hepatopatías, 236 hemodialisados y 149

Tabla 1
Resultados de la evaluación del sistema **ANTI-VHC** con muestras de individuos de diferentes grupos de riesgo.

GRUPO ESTUDIADO	ANTI-VHC			TOTAL	SENSIBLIDAD	ESPECIFICIDAD
	COMERCIAL	CIGB				
		+	-			
PACIENTES CON HEPATOPATIAS	+	101	232	103	97.4	100.0
	-	0	111	111		
PACIENTES EN HEMODIALISIS	+	103	6	109	94.5	99.2
	-	1	126	127		
DONANTES POR PLASMAFERESIS	+	70	3	73	95.9	98.7
	-	1	75	76		
TOTAL	+	274	11	285	96.1	99.4
	-	2	312	314		

donantes por plasmaféresis), de ellas 285 anti-VHC positivas por sistemas comerciales de segunda generación, se obtuvo una sensibilidad del sitema **ANTI-VHC** de 96.1% y una especificidad de 99.4% (tabla 1).

En cuanto al estudio empleando muestras de donantes de sangre, tanto las 31 encontradas positivas entre las 3 780 muestras del estudio paralelo en tres bancos de sangre de Ciudad de La Habana durante el mes de febrero de 1992, como las 23 positivas del estudio de 1 571 donaciones del estudio realizado en el Banco Docente de Sangre de Marianao en septiembre de ese año, se confirmaron como positivas con los sistemas comerciales.

Sólo tres de las 304 muestras negativas al epítope del *core* estudiado que se seleccionaron para ser evaluadas por sistemas comerciales análogos resultaron positivas por alguno de ellos, pero no fueron confirmadas con el sistema suplementario LIATEK HCV (tabla 2).

En general, el nivel de concordancia con sistemas comerciales fue de 96.5% entre las muestras positivas y de 99.6% entre las muestras negativas.

Los resultados del sistema **ANTI-VHC** ante un panel de sueros y plasmas de bajo título fueron superiores a los obtenidos con dos sistemas homólogos (Ortho y Abbott), según los datos aportados por los suministradores del panel (tabla 3). Los resultados de los sistemas ELISA se expresan mediante la relación entre la densidad óptica (DO) de cada muestra (absorbancia a 492 nm de longitud de onda) y el valor de corte de dicho ensayo. La prueba suplementaria de segunda generación RIBA 2.0 (Ortho) se empleó como referencia de positividad. Como se observa el sistema ANTI-VHC es el único que concuerda 100% con el sistema suplementario RIBA 2.0. Por otra parte, es el que posee la mayor relación de positividad (p), expresado por el

Tabla 2
Resultados del estudio de muestras de donantes de sangre de Ciudad de La Habana.

GRUPO ESTUDIADO	ANTI-VHC			TOTAL	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
	COMERCIAL	CIGB				
		+	-			
FEBRERO DE 1992*	+	31	0	31	100.0	100.0
	-	0	242	242		
SEPTIEMBRE DE 1992**	+	23	0	23	100.0	100.0
	-	0	62	62		
TOTAL	+	54	0	54	100.0	100.0
	-	0	304	304		

* Las muestras negativas evaluadas por sistemas comerciales se seleccionaron a partir del total de muestras estudiadas. Ocho muestras anti-HCV positivas no pudieron ser recuperadas para este estudio.

** Las muestras negativas evaluadas por sistemas comerciales se seleccionaron a partir del total de muestras estudiadas.

Tabla 3

Resultados obtenidos por el sistema ANTI-HCV y dos sistemas análogos (Ortho y Abbott) y un sistema confirmatorio (RIBA 2.0) ante un panel de referencia compuesto por sueros de bajo título

MUESTRA No.	TIPO DE MUESTRA	ABBOTT HCV EIA	ORTHO HCV EIA	ABBOTT RIBA 2.0	CIGB ANTI-VHC
PHV101-01	PLASMA	3.717	0.964	POSITIVO	1.188
PHV101-02	PLASMA	0.167	0.268	NEGATIVO	0.620
PHV101-03	SUERO	1.880	1.323	NEGATIVO	0.472
PHV101-04	SUERO	1.757	3.076	POSITIVO	6.395
PHV101-05	SUERO	3.404	2.169	NEGATIVO	0.769
PHV101-06	SUERO	1.640	1.642	POSITIVO	6.783
PHV101-07	SUERO	2.281	1.624	POSITIVO	3.327
PHV101-08	SUERO	3.009	1.588	POSITIVO	5.342
PHV101-09	SUERO	1.855	1.119	POSITIVO	4.735
PHV101-10	SUERO	3.649	3.098	POSITIVO	5.788
PHV101-11	PLASMA	0.662	1.820	POSITIVO	1.105
PHV101-12	SUERO	3.018	2.205	POSITIVO	3.443
PHV101-13	SUERO	2.805	2.770	POSITIVO	3.043
PHV101-14	SUERO	1.912	0.846	POSITIVO	3.127
PHV101-15	SUERO	3.686	3.240	POSITIVO	3.514
RELACION DE POSITIVIDAD		2.656[a]	1.999[a]		3.983[b]

[a] $p > 0.05$ [a,b] $p < 0.02$

promedio de la relación del valor de DO de la muestra y el valor de corte, para cada uno de los tres sistemas ELISA comparados.

Estudio de prevalencia

Los resultados de la utilización del sistema propuesto en el pesquisaje de las 6 132 donaciones de sangre entre abril y septiembre de 1992 en el Banco Docente de Sangre Docente de Marianao indicaron una prevalencia de anticuerpos contra el antígeno del *core* empleado en el sistema **ANTI-VHC** DE 1.01% (tabla 4), sin que se encontrara que el sexo, raza o edad influyera de manera significativa en la positividad a anti-VHC.

Estas cifras no difieren de otro estudio realizado en estas mismas unidades con sistemas de primera generación (ELISA HCV, Ortho y Hepanostika C, Organon Teknica, Bélgica) en que la positividad fué de 1.2 y 1.6%, respectivamente (Padrón *et al.*, 1992). Sobre la base de estudios realizados en Cuba se cuenta con una evaluación preliminar de la prevalencia de anticuerpos contra el VHC en los principales grupos de interés (Padrón *et al.*, 1992) lo que, junto a los datos presentes, demuestra la alta incidencia de esta etiología en Cuba, y el grave problema de salud que la misma constituye.

En el caso del sistema **ANTI-VHC** empleado en el presente estudio, la sensibilidad y especificidad alcanzadas ratifican el importante papel de los antígenos del *core* del virus. Por su parte, la alta prevalencia de anticuerpos contra este antígeno sintético encontrada en donantes de Ciudad de La Habana corroboran este hecho y ofrece evidencias adicionales del grado de conservación de los epítopes virales de esta proteína del VHC.

Una alta sensibilidad (94%) fue también encontrada para este sistema en una evaluación realizada por el Laboratorio de Referencia para Virus Hepatotropos del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria de España, perteneciente al Instituto de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo de ese país empleando paneles en el que se incluyeron sueros

Tabla 4
Datos de la población de donantes estudiada. Banco de Sangre Provincial Docente (BSPD). Ciudad de La Habana, abril-septiembre de 1992.

RAZGO	DONANTES		DONANTES ANTI-VHC+	
	TOTAL	%	TOTAL	%
SEXO				
Masculino	5 623	91.7	59	1.05
Femenino	509	8.8.	3	0.59
RAZA				
Blanca	3 783	61.7	41	1.08
Mestiza	914	14.9	13	1.44
Negra	1 435	23.4	8	0.56
EDAD				
18-24	1 318	21.5	11	0.83
25-34	2 791	45.5	27	0.97
35-44	1 343	21.9	16	1.19
45-54	576	9.4	6	1.04
más de 55	104	1.7	2	1.92
TOTAL	6 132	100.0	62	1.01

reactivos a diferentes proteínas, así como 50 sueros de donantes clasificados inicialmente como indeterminados por el sistema RIBA-2 (Ortho Diagnostics, Nueva Jersey) y reclasificados como positivos posteriormente al ser analizados por otros sistemas confirmatorios (RIBA-3, Ortho Diagnostics y/o Matrix, Abbott Laboratories, Illinois) (datos no publicados).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la firma Organon Teknika (Boxtel, Holanda) por haber facilitado los sistemas de detección de anticuerpos contra el VHC UBI HCV EIA y LIA TEK HCV y a la firma Abbott (Wiesbaden, Alemania) por suministrar el sistema de segunda generación Abbott HCV.

REFERENCIAS

ALTER, H.J.; R.H. PURCELL; J. W. SHIH; J. C. MELPOLDER, M. HOUGHTON; Q. L. CHOO and G. KUO (1989). Detection of antibody to hepatitis-c virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic Non-A-Hepatitis, Non-B-Hepatitis. *N.Engl.J. Med.* **321**:1494-1500.

ALTER, M.J. (1990). The epidemiology of Non-A, Non-B Hepatitis in the United States. *Update testing in the Blood Banks* **3**:2-3.

BEACH, M.J.; E.L. MEEKS; L.T. MIMMS; D. VALLARI; L. DUCHARME and J. SPELBRING (1992). Temporal relationship of Hepatitis C Virus RNA and antibody responses following experimental infection of chimpanzees. *J. Med. Virol.* **36**:226-237.

CDC. (1990). Morbility and Mortality Weekly Repport **40** (RR-4)

CHAUDARI, R.K. and C. MAC LEAN (1991). Evaluation of first- and second generation RIBA kits for detection of antibody to Hepatitis C Virus. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2329-2330.

CHIBA, J.; H. OHBA; Y. MATSUURA; Y. WATANABE; K. TOHRU and S. KIKUCHI (1991). Serodiagnosis of Hepatitis C Virus (HCV) infection with HCV *core* protein molecularly expressed by a recombinant baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4641-4645.

CHOO, Q. L.; G. KUO; A. WEINER; L. R. OVERBY; D. W. BRADLEY and M. HOUGHTON (1989). Isolation of a cDNA clon derived from a blood borne non-A, non-B, viral hepatitis genome. *Science* **244**:359-362.

CLAEYS, H.; A. VOLCKAERTS; H. DE BEENHOUWER and C. VERMYLEN (1992). Association of Hepatitis C virus carrier state with the occurrence of Hepatitis C virus *core* antibodies. *J. Med. Virol.* **36**:259-264.

COUROUCE, A.M. and C. JANOT (1991). Recombinant immunoblot assay first and second generation on 732 blood donors reactive for antibodies to Hepatitis C Virus by ELISA. *Vox Sang* **61**:177-180.

EBELING, F.; R. NAUKKARINEN; G. MYLLYLA and J. LEIKOLA (1991) Second generation RIBA to confirm diagnosis of HCV infection. *Lancet* **337**:912-913.

FINLAYSON, J.S. and D.L. TANKERSLEY (1990). Anti-HCV screening and plasma fraccionation: the case against. *Lancet* **335**:1274-1275.

GARSON, J.A., F.I. PRESTO; M. MAKRIS; P. TUKE; C. RING; S.J. MACHING and R.S. TEDDER (1990a). Detection by PCR of hepatitis C virus in factor VIII concentrates. *Lancet* **335**:1473.

GARSON, J. A.; R.S. TEDDER; M. BRIGGS; P. TUKE; J.A. GLAZEBROOK; A. TRUTE; D. PARKER and J.A.J. BARABARA (1990b). Detection of HC viral sequences in blood donation by "nested" PCR and prediction of infectivity. *Lancet* **335**:1419-1422.

GRAY, J.J.; T.G. WREGHITT; P.J. FRIEND; D.G.D. WIGHT, V. SUNDARESAN and R.Y. CALVE (1990). Differentiation between specific and non-specific hepatitis C antibodies in chronic liver disease. *Lancet* **335**:609-610.

HABIBI, B. y M. GARETTA (1990). Screening for HCV antibodies in plasma for fraccionation. Lancet 335: 855-856.

HOSEIN, B.; C.T. FANG; M. A. POPOVSKY; J. YE; M. ZHANG and C.Y. WANG (1991). Improved serodiagnosis of Hepatitis C Virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3647-3651.

IKEDA, Y.; G. TODA; N. HASHIMOTO and K. KUROKAWA (1990). Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis and antibody test for hepatitis C virus. *Lancet* **335**:1345-1346.

KANEKO, S.; M. UNOURA; K. KOBAYASHI; K. KUNO; S. MURAKAMI and N. HATTORI (1990). Detection of serum Hepatitis-C Virus RNA. *Lancet* **335**:976.

KATAYAMA, T., S. KIKUCHI, Y. TANAKA, I. SAITO, T. MIYAMURA, Q.L. CHOO, M. HOUGHTON and G. KUO (1990). Blood screening for Non-A, Non-B Hepatitis by Hepatitis C Virus antibody assay. *Transfusion* **30**: 363- 367.

KUO, G.; Q.L. CHOO; H.J. ALTER; G.I. GITNIK, A.G. REDEKER; R.H. PURCELL; T. MIYAMURA, J.L. DIENSTAG; M.J. ALTER; C.E. STEVENS; G.E. TEGTMEIER; F. BONINO; M. COLOMBO; W.S. LEE; C. KUO; K. BERGER; J. R. SHUSTER; J.R. OVERBY; D.W. BRADLEY and M. HOUGHTON (1989). An assay for circulating antibodies to major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**:362-364.

Mac FARLANE, I.G.; H.M. SMITH; P.J. JOHNSON; G.P. GRAY; D. VERGANI and R. WILLIAMS (1990). HCV antibodies in chronic active Hepatitis: patogenic factor or false positive result? *Lancet* **335**:754-757.

MARCELLIN, P.; M. MARTINOT-PEIGNOUX; N. BOYER; M. POUTEAU; P. AUMONT; S. ERLINGER and J.P. BENHAMOU (1991). Second generation (RIBA) test in diagnosis of chronic hepatitis C. *Lancet* **337**:552.

MIYAMURA, T.; I. SAITO; T. KATAYAMA; S. KIKUCHI; A. TAKEDA; M. HOUGHTON; Q. L. CHOO and G. KUO (1990). Detection of antibody against antigens expressed by moleculary cloned hepatitis C virus cDNA: Application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:983-987.

MOSLEY, J.W.; R.D. AACH; F.B. HOLLINGER; C.E. STEVENS; L.H. BARBOSA; G.H. NEMO y P.V. HOLLAND (1990). Non-A, Non-B Hepatitis and antibody to Hepatitis-C Virus. *JAMA* **263**:77-78.

MURAISO, K.; M. HIJIKATA; S. OKHOSHI; M.J. CHO, M. KIKUCHI; N. KATO and K. SHIMOTOHNO (1990). A structural protein of Hepatitis C Virus expressed in *E. coli* facilitates accurate detection of Hepatitis C Virus. *Biochem and Biophys Res Comm* **172**:511-516.

PADRON, G.; E. ARUS y Y. TAQUECHEL (1991). Caracterización epidemiológica del VHC en Cuba: Pacientes hemodialisados. XXII Congreso Panamericano de Enfermedades Digestivas, C. Habana, octubre de 1991 (resumen). Ed. Palacio de Convenciones, Ciudad de la Habana, pp48.

PADRON, G.; E. ARUS; J. ROCA, G. LEMOS; J. RIVERO (1992). El virus de la Hepatitis C en Cuba (Resumen). *Gen* **46**:256.

STEVENS, C.E.; P.E. TAYLOR; J. PINDYCK; Q.L. CHOO; D.W. BRADLEY; G. KUO and M. HOUGHTON (1990). Epidemiology of Hepatitis-C Virus - A preliminary study in volunteer blood donors. *JAMA* **263**:49-53.

SWINBANKS, D. (1989). Hepatitis viruses - blood donors to be screened. *Nature* **342**:467.

THEILMANN, L.; M. BLAZAK; T. GOESSER; K. GMELIN; B. KOMMEREL and W. FIEN (1990). False positive anti-HCV test in rheumatoid arthritis. *Lancet* **335**:1346.

VAN DER POEL, C. L., H. W. REESINK, W. SCHAASBERG, A. LEENTVAAR-KUYPERS, E. BAKKER and P. J. EXEL-OEHLERS (1990). Infectivity of blood seropositive for HCV antibodies. *Lancet* **335**:558-560.

VAN DER POEL, C. L.; H.T.M. CUYPERS; H.W. REESINK; A.J. WEINER; S. QUAN y R. DI NELLO (1991). Confirmation of hepatitis C infection by new four- antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* **337**:317-319.

YATSUHASHI, H.; O. INOUE; M. KOGA; S. NAGATAKI; K. MIZUNO and J. KOLBERG (1992). Comparison of hepatitis C virus markers in patients with NANB hepatitis. *J. Virol. Methods* **37**:13-22.