

# Uspješnost liječenja kroničnog hepatitisa C kombinacijom pegiliranog interferona alfa-2 i ribavirina u bolesnika s niskom viremijom i genotipom 1

Ivan KURELAC<sup>1)</sup>, dr. sc., dr. med.,  
specijalist infektolog  
Neven PAPIĆ<sup>1)</sup>, dr. med.,  
specijalizant infektologije  
Snježana ŽIDOVEC LEPEJ<sup>1)</sup>, dr. sc.,  
molekularni biolog  
Davorka DUŠEK<sup>1)</sup>, dr. med.,  
specijalist infektolog  
Vjeran ČAJIĆ<sup>1)</sup>, dr. med.,  
specijalist infektolog  
Adriana VINCE<sup>1,2)</sup>, prof. dr. sc., dr. med.,  
specijalist infektolog

<sup>1)</sup>Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

<sup>2)</sup>Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

## Ključne riječi

hepatitis C  
terapija pegiliranim interferonom alfa-2 i ribavirinom  
niska viremija  
genotip 1  
stadij fibroze  
SVR  
prediktor ishoda terapije

## Key words

hepatitis C  
peginterferon alfa-2 and ribavirin treatment  
low viral load  
genotype 1  
fibrosis stage  
SVR  
therapy outcome predictors

**Primljeno:** 2013-02-19

**Received:** 2013-02-19

**Prihvaćeno:** 2013-03-29

**Accepted:** 2013-03-29

Znanstveni članak

Trajni virusološki odgovor nakon 48 tjedana liječenja kombinacijom pegiliranog interferona alfa-2 i ribavirina u bolesnika s kroničnim hepatitisom C inficiranih genotipom 1 postiže se u oko 55 % bolesnika. Prethodne studije pokazale su da je kraća, 24-tjedna terapija u bolesnika s niskom početnom viremijom (<600 000 IU/mL) jednako učinkovita, ali uz praćenje rane virusne kinetike. Naša studija pokazuje da su bolesnici s niskom početnom viremijom veoma heterogena skupina bolesnika kod kojih trajni virusološki odgovor na liječenje nije bolji u odnosu na bolesnike s visokom viremijom (niska viremija SVR 53,2 % (n = 94), visoka viremija SVR 50,8 % (n = 122)). Bolesnici s niskom početnom viremijom u kojih nije postignut trajni virusološki odgovor imali su statistički značajno viši stupanj fibroze (stadij fibroze po Ishaku 3,47 u non-SVR grupi prema 2,94 u SVR+ grupi, p = 0,004) i bili su značajno starije životne dobi (46,4 godina u non-SVR grupi prema 39,6 godina u SVR+ grupi, p = 0,008). Od bolesnika s niskom početnom viremijom i cirozom jetre (n = 6) nitko nije postigao trajni virusološki odgovor, dok su oni sa stadijem fibroze 4/6 po Ishaku u 48 % slučajeva bili non-responderi, tako da se stadij fibroze 4 nije pokazao kao značajan prediktivni faktor. Naši rezultati govore da su osim visine viremije na početku liječenja, značajni prediktivni faktori za uspjeh liječenja i stadij fibroze, naročito prisustvo ciroze, te starija životna dob.

## Efficacy of treatment with peginterferon alfa-2 plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia

Scientific paper

About 55 % of patients with genotype 1 chronic hepatitis C infection have sustained response to 48-week therapy with pegylated interferon alfa-2 and ribavirin. Previous studies have shown that patients with low pretreatment viremia (< 600 000 IU/mL) can be treated for 24 weeks with similar efficacy as with 48-week therapy, when early viral kinetic is measured. Our study showed that patients with low pretreatment viral load (< 600 000 IU/mL) are very heterogenous group and sustained viral response to pegylated interferon alfa-2 and ribavirin therapy is not better than in high viral load group (low viremia patients SVR 53.2 % (n = 94), high viremia patients SVR 50.8 % (n = 122)). Pretreatment low viral load patients that did not achieve SVR (n = 44) had a significantly higher fibrosis stage (non-SVR fibrosis stage 3.47 Ishak score vs. SVR+ fibrosis stage 2.94; p = 0,004), and they were significantly older (non-SVR patients 46.4 years, SVR+ patients 39.6 years, p = 0.008). Low initial viremia patients with cirrhosis (n = 6) did not achieve SVR at all, while among patients with fibrosis stage 4/6, 52 % achieved SVR. Our results suggest that apart from viral load at the beginning of treatment, fibrosis stage is also a predicting factor for therapy outcome, particularly in older patients and patients with cirrhosis.

## Uvod

Kronična HCV-infekcija povezana je sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, s mogućnosti razvoja ciroze i hepatocelularnog karcinoma te u konačnici potrebom za

transplantacijom jetre u bolesnika u terminalnom stadiju bolesti [1]. Stoga je liječenje kronične HCV-infekcije u svrhu sprečavanja komplikacija bitno za sve bolesnike [2], no uspjeh 48-tjedne terapije mjerene trajnim virusološkim odgovorom (SVR, od engl. *sustained viral re-*

sponse) kombinacijom pegiliranog interferona alfa-2 i ribavirina kod genotipa 1 još uvijek ne prelazi 55 %. Brojne su studije pokazale da bolesnici s niskom viremijom (<400 000–800 000 IU/mL) mogu biti liječeni kraćim protokolom kroz 24 tjedna uz podjednako dobar učinak ukoliko tijekom terapije uslijedi brzi pad viremije (RVR, od engl. *rapid viral response*) odnosno negativizacija HCV RNA nakon 4 tjedna terapije [3]. Kratkotrajna terapija se od 2006. preporučuje u brojnim smjernicama o liječenju kronične HCV-infekcije samo na osnovi visine viremije te brzini virusološkog odgovora [4]. S druge strane, identificirani su brojni faktori multifaktorijalno povezani s težinom bolesti kao i ishodom liječenja (dob, stadij fibroze, polimorfizam IL-28B, koncentracija CXCL10 te statoza i BMI) [5]. Ostaje klinički upitno koliko su sama visina viremije prije liječenja te odgovor na liječenje nakon 4 tjedna presudni u izboru optimalog algoritma, odnosno odluke o trajanju liječenja 24 ili 48 tjedana.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati imaju li bolesnici s nižom viremijom (<600 000 IU/mL prije početka liječenja) zaista značajno bolju šansu izlječenja koja opravdava kraće trajanje liječenja od 24 tjedna. Kraće trajanje liječenja preporuča većina smjernica za liječenje kronične HCV-infekcije [8, 9, 10]. Smjernice HZZO-a također predviđaju kraće liječenje za bolesnike s niskom viremijom koji postignu RVR, ali bez obzira na stadij fibroze ili dob bolesnika [11]. S druge strane, neuspjeh 24-tjedne terapije povezan je s perzistiranjem infekcije, progresijom bolesti i potrebom primjene novih skupljih terapijskih postupaka. Cilj je ispitati da li je niska viremija kod bolesnika s cirozom i značajnije uznapređovalom fibrozom, kao i u bolesnika starije životne dobi, također povoljan prognostički faktor, ili su ciroza i starija dob neovisno o visini viremije povezani s lošim ishodom liječenja.

## Materijali i metode

Retrospektivna studija obuhvatila je 216 bolesnika s kroničnim hepatitisom C, genotipom 1. Od njih je 94 (43 %) bolesnika imalo početnu viremiju <600 000 IU/mL, a 122 (57 %) viremiju >600 000 IU/mL HCV RNA. Bolesnici su liječeni kombinacijom pegiliranog interferona alfa-2a (180 mcg jednom tjedno) i ribavirina (1000 mg u osoba teških <75 kg, 1200 mg u osoba teških >75 kg dnevno) ili kombinacijom pegiliranog interferona alfa-2b (1,5 mcg/kg tjelesne težine jednom tjedno) i ribavirina (doziran prema tjelesnoj težini). Kod bolesnika je prije liječenja učinjena biopsija jetre, a patohistološki nalaz analiziran je prema Ishak-Knodellovom indeksu stadija fibroze F 1–6, te indeksu histološke aktivnosti hepatitisa HAI 1–18 [6].

Liječenje je provedeno kroz 24 tjedna, a u bolesnika koji su nakon 4 tjedna bili HCV RNA PCR pozitivni (RVR) produljeno je na 48 tjedana. Liječenje je prekinuto u slučaju izostanaka ranog virusnog odgovora (EVR, od

engl. *early viral response*) odnosno pada HCV RNA za 2 log nakon 12 tjedana liječenja.

Nakon 24 tjedna od završetka liječenja bolesnici su podijeljeni prema nalazu HCV RNA PCR na one s postignutim trajnim odgovorom (SVR+) i one bez njega (non-SVR). Bolesnici koji su izgubljeni iz praćenja isključeni su iz studije, kao i oni s prijevremenim prekidom liječenja zbog nuspojava [7].

HCV RNA u serumu bolesnika kvantificirana je primjenom kvantitativnog testa lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) u realnom vremenu (engl. *real-time PCR*) COBAS AmpliPre/COBAS TaqMan HCV uz automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina primjenom instrumenta COBAS AmpliPrep Instrument te analizatora COBAS TaqMan 48 Analyzer (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, USA). Linearni raspon COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV testa iznosi od 43 HCV RNA IU/mL do  $6,90 \times 10^7$  HCV RNA IU/mL. Genotip HCV u ispitanika određen je primjenom testa Versant HCV Genotyping assay (LiPA, Bayer Diagnostics, Puteaux, Cedex, France) koji se temelji na kombinaciji PCR i hibridizacije.

Statistička analiza izvršena je t-testom i hi-kvadrat testom za vrijednosti stadija fibroze i dobi bolesnika u grupi s dobrim i lošim trajnim odgovorom na liječenje.

## Rezultati

Od 216 bolesnika koji su proveli liječenje kombinacijom pegiliranog interferona i ribavirina, 112 (51,8 %) bolesnika je postiglo SVR. U daljnjoj analizi bolesnici su podijeljeni u dvije skupine ovisno o visini početne viremije. Među skupinama nije bilo statistički značajne razlike u dobi, spolu, tjelesnoj težini, stupnju fibroze i histopatološkoj aktivnosti bolesti. U skupini od 94 bolesnika s niskom viremijom, 50 (53,2 %) bolesnika je postiglo SVR, dok je 44 (46,8 %) bilo bez trajnog odgovora na liječenje. Kontrolna skupina je uključivala 122 bolesnika s visokom viremijom, od kojih je 62 (50,8 %) postiglo SVR. Nije bilo statistički značajne razlike u postizanju SVR između ove dvije skupine ispitanika ( $p = 0,7841$ , hi-kvadrat test) (Tablica 1).

Kako se podatak o visini viremije nije pokazao pozitivnim prediktivnim čimbenikom postizanja SVR, bolesnici s niskom viremijom su podijeljeni u skupine ovisno o virusološkom odgovoru (non-SVR i SVR).

Kod bolesnika s početnom niskom viremijom koji nisu postigli trajni odgovor (*non SVR*) prosječna vrijednost fibroze po Ishak-Knodellovom indeksu bila je 3,47 dok je kod bolesnika s postignutim SVR stadij fibroze bio 2,94 što predstavlja statistički značajnu razliku ( $p = 0,004$ , t-test) (Tablica 2).

**Tablica 1.** Trajni uspjeh liječenja pegiliranim interferonom alfa-2 i ribavirinom bolesnika s kroničnim hepatitisom C (genotip 1) obzirom na početnu viremiju

**Table 1.** Sustained viral response to pegylated interferon alfa-2 and ribavirin therapy in patients with chronic HCV infection (genotype 1) with regards to pretreatment viral load

Početa viremija / pretreatment viral load	<600 000 IU/mL HCV RNA	>600 000 IU/mL HCV RNA
Broj izliječenih bolesnika SVR+ / Number of patients SVR+	50 (od ukupno 94)	62 (od ukupno 122)
Postotak sa SVR+ / Percentage with SVR+	53,2%	50,8%
P vrijednost / P value	P = 0,7841 hi kvadrat test	

**Tablica 2.** Stadij fibroze u bolesnika s dobrim i lošim trajnim odgovorom na liječenje pegiliranim interferonom alfa-2 i ribavirinom (kod bolesnika s HCV infekcijom, genotip 1, viremija <600 000 IU/mL)

**Table 2.** Fibrosis stage in patients with SVR and without SVR to standard pegylated interferon alfa-2 and ribavirin therapy (patients with HCV genotip 1, low viral load <600 000 IU/mL)

Rezultat liječenja / Therapy outcome	Dobar trajni odgovor (n 50) SVR	Bez trajnog odgovora (n 44) non-SVR
Stadij fibroze po Ishaku / Fibrosis stage (Ishak)	2,94	3,47
SD	0,85818	0,9019
Standard Error	0,12017	0,13597
T test (two tailed)	P = 0,004	

Kod bolesnika s niskom HCV-viremijom, a bez trajnog odgovora na liječenje pegiliranim interferonom alfa-2 i ribavirinom, prisutan je statistički značajno viši stadij fibroze ( $p = 0,004$ ).

In patients with low pretreatment HCV viral load, and without achieved SVR after pegylated interferon alfa-2 and ribavirin treatment, a significantly higher fibrosis stage was present ( $p = 0,004$ ).

**Tablica 3.** Dob bolesnika s dobrim i lošim trajnim odgovorom na liječenje pegiliranim interferonom alfa-2 i ribavirinom (bolesnici s HCV-infekcijom, genotip 1, viremija <600 000 IU/mL).

**Table 3.** Age of patients with SVR and without SVR to pegylated interferon alfa-2 and ribavirin therapy (patients with HCV G1 infection, low viral load <600 000 IU/mL).

Rezultat liječenja / Therapy outcome	Dobar trajni odgovor (n 50) SVR	Bez trajnog odgovora (n 44) non-SVR
Dob bolesnika / Patients' age, years	39,6	46,4
SD	13,09445	11,62475
Standard Error	1,81587	1,7525
T test (two tailed)	P = 0,008	

Bolesnici s niskom HCV-viremijom, a bez trajnog odgovora na liječenje pegiliranim interferonom alfa-2 i ribavirinom, statistički su značajno starije životne dobi ( $p = 0,008$ ).

Patients with low pretreatment HCV-viremia, who did not achieve SVR after pegylated interferon alfa-2 and ribavirin treatment were significantly older ( $p = 0,008$ ).

Dob bolesnika s početnom niskom viremijom koji nisu postigli trajni odgovor bila je prosječno 46,4 godina, dok je u bolesnika s postignutim trajnim odgovorom na liječenje bila 39,6 godina, ( $p = 0,0078$ , t-test) (Tablica 3).

Bolesnici sa stadijem fibroze F4/6 po Ishaku i niskom viremijom bili su u 48 % slučajeva bez trajnog odgovora i u 52 % slučajeva s postignutim trajnim odgovorom, dakle pri tom stadiju fibroze statistički još uvijek bez značajne

razlike u odgovoru na liječenje. Bolesnici sa stadijem fibroze F5 ili F6 po Ishaku (dakle cirozom jetre) i niskom viremijom, njih šest, nisu imali trajni odgovor u 100 % slučajeva.

## Rasprava

Ovaj rad pokazuje mogućnosti i ograničenja individualnog doziranja trajanja liječenja ovisno o početnoj HCV RNA viremiji. Limit za nisku viremiju u našim uvjetima je izabran kao vrijednost od 600 000 IU/mL, koji je inkorporiran u smjernice HZZO-a, dok literaturni podaci za nisku viremiju podrazumijevaju onu od 400 000–800 000 IU/mL ovisno o studiji. Očito je da bolesnici čija se viremija u startu nalazi blizu arbitrarno izabrane granične vrijednosti imaju mogućnost da budu liječeni sa dva bitno različita modaliteta liječenja, čak dvostruko dužom ili kraćom terapijom. Bolesnici s takvom graničnom viremijom trebali bi imati u kraćem periodu u dva navrata izmjerenu visinu viremije kako bi se izbjegla kriva procjena i njene posljedice (kraća terapija i mogući relaps bolesti). Ovaj rad pokazuje da je moguće definirati i druge prognostički značajne čimbenike za loš odgovor koji kod bolesnika zahitiavaju liječenje punih 48 tjedana.

Drugi faktor koji determinira trajanje liječenja je RVR, tj. negativan HCV RNA nakon 4 tjedna liječenja. Međutim, osjetljivost tog testa tijekom godina se mijenjala, te je napretkom dijagnostičkih postupaka padala od 43 IU/mL prema 30 IU/mL te napokon na 15 IU/mL. To znači da je određeni broj bolesnika s manje osjetljivim testom proglašen negativnima, ali bilo je riječ o niskoj viremiji [12, 13]. Kod takvih bolesnika primijenjena je kraća terapijska opcija tj. 24-tjedno liječenje, makar bi po rezultatu osjetljivijeg testa koji tada nije bio na raspolaganju možda bila indicirana dulja 48-tjedna terapija.

Kraće liječenje s druge strane povezano je s manje nuspojava te izbjegavanjem nepotrebnih troškova u dobrih respondera. Radovi koji su implicirali uvođenje kraćeg liječenja u terapijske protokole zapravo su konstatali podjednaku učinkovitost 24-tjednog liječenja (oko 55 %) u osoba s niskom viremijom, a ne bitno bolji odgovor na liječenje. U cijelom postupku 24-tjednog liječenja bitno je praćenje rane virusne kinetike i produljenje terapije u slučaju sporijeg pada viremije [14, 15].

S druge strane, bolesnici s uznapredovalom cirozom često imaju relativno nisku HCV RNA viremiju. U smjernicama EASL (*European Association for Study of the Liver*) bolesnicima s cirozom preporuča se liječenje u trajanju od 48 tjedana bez obzira na viremiju, te je i u našim smjernicama (Hrvatska konsenzus konferencija iz 2009. godine) stadij fibroze inkorporiran u tu odluku [10]. Međutim, prema propozicijama koje su prisutne na listi lijekova HZZO-a, samo visina viremije i rana virusna kinetika odlučujući su kriterij za trajanje terapije svih bolesnika s

genotipom 1, pa tako i onih sa cirozom [11]. Rezultati liječenja naših bolesnika s cirozom pokazuju izrazito nepovoljan odgovor na liječenje unatoč početnoj niskoj viremiji, što znači da bi se kod takvih bolesnika liječenje trebalo provoditi u startu 48 tjedana, i uz klasičnu kombinaciju pegiliranog interferona i ribavirina po mogućnosti započeti trojnu terapiju inhibitorima proteaza. Za razliku od bolesnika sa stadijem fibroze 5/6 i 6/6 po Ishaku, stadij fibroze 4/6 ipak se nije pokazao toliko presudan u ishodu liječenja, jer nalazimo podjednak broj bolesnika sa stadijem fibroze 4 i među onima s dobrim i lošim trajnim odgovorom. Sigurno da bi se u takvoj situaciji kod bolesnika sa stadijem fibroze 4 mogli koristiti dodatno prediktori kao što su životna dob, polimorfizam IL28B i koncentracije CXCL10 [14, 15, 16].

Što se tiče dobi bolesnika, naše ispitivanje pokazalo je da je starija životna dob bolesnika vrlo jasno povezana s lošijim ishodom liječenja.

## Zaključak

Rezultati liječenja bolesnika s kroničnim hepatitisom C i niskom viremijom (<600 000 IU/mL) nisu značajno bolji od rezultata liječenja bolesnika s višom viremijom (53,2 % SVR vs 55 % kod historijske kontrole). Viši stadij fibroze povezan je s izostankom trajnog odgovora na liječenje (stadij fibroze 3,47 non SVR u usporedbi sa stadijem fibroze 2,94 kod SVR;  $p = 0,004$ ). Starija dob povezana je s izostankom trajnog odgovora na terapiju (kod non SVR prosječna dob je 46,4 godina, a kod SVR 39,6 godina) što je statistički značajna razlika ( $p = 0,0078$ ).

Liječenje za nisku viremiju u trajanju od 24 tjedna nije se pokazalo efikasno za bolesnike s cirozom te one starije životne dobi, čak ni u slučaju produljenja liječenja na 48 tjedana u slučaju izostanka RVR.

Ova studija je pokazala da su bolesnici s HCV infekcijom, genotipom 1 i niskom viremijom heterogena skupina bolesnika, te da oni, ako se ne uzmu u obzir drugi prognostički parametri, nemaju bolji rezultat liječenja od bolesnika s visokom viremijom i 48-tjednom terapijom.

Viši stadij fibroze (F5 i F6) povezani su s izrazito lošim odgovorom na liječenje, kao i starija životna dob, te bi ti čimbenici trebali biti implementirani u naše terapijske algoritme za liječenje bolesnika s niskom HCV-viremijom. Tako bi se tim bolesnicima odmah trebala pružiti mogućnost efikasnijeg liječenja koje bi povećalo mogućnost liječenja i izbjegla potreba za daljnje retarapije i druge terapeutske postupke.

## Literatura

- [1] Bruno S, Faccioto C. The natural course of HCV infection and the need for treatment. *Ann Hepatol* 2008; 7: 114–9.

- [2] WHO. The global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium *J Viral Hepat* 1999; 6: 35–47.
- [3] Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen N, Mauss S, et al. Expert opinion on the treatment of the patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2009; 16(2): 75–90.
- [4] Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, Sperl J, Horsmans Y, Cianciar J, et al. Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotyp 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol* 2006; 44: 97–103. Epub 2005 Nov 7.
- [5] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347(13): 975–982.
- [6] Vucelić B, Hrستیć I. Viral hepatitis: clinical and histological assessment. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 397–404.
- [7] European Association For The Study Of The Liver EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 55: 245–264.
- [8] Manns et al. Peginteron alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958–65.
- [9] Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alfa-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* 2006; 43(5): 954–960.
- [10] Ostojić R i sur. Virusni hepatitis. Hrvatska konsenzus konferencija 2009. *Acta Med Croatica* 2009; 63: 349–357.
- [11] Lista lijekova HZZO-a. <http://www.hzzo-net.hr>
- [12] Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brilllet R, Pawlotsky JM. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology* 2007; 46: 22–31.
- [13] Halfon PG, Penaranda M, Bourliere H, et al. Assessment of early virological response to antiviral therapy by comparing four assays for HCV RNA quantitation using the international unit standard: implications for clinical management of patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2006; 78: 208–215.
- [14] Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, et al. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alfa-2a (40 kd)/ribavirin therapy. *Hepatology* 2006; 43(5): 954–960.
- [15] Sulkowski M, Lawitz E, Shiffman ML, et al. Final results of the IDEAL (individualized dosing efficacy versus flat dosing to assess optimal pegylated interferon therapy) Phase IIIB study. *J Hepatol* 2008; 48(Suppl.2): S370–S371.
- [16] Poynard T, Schiff E, Terg R, et al. HCV RNA negativity after 12 weeks of therapy is the best predictor of sustained virological response (SVR) in the re-treatment of previous interferon alfa/ribavirin non-responders (NR): results from the EPIC3 program. *Hepatology* 2006; 44: 606.