

NOVOSTI U SEROLOŠKOJ I MOLEKULARNOJ DIJAGNOSTICI HEPATITISA B I C

MARIO POLJAK, SNJEŽANA ŽIDOVEC LEPEJ¹ i OKTAVIJA ĐAKOVIĆ RODE¹

*Medicinski fakultet Sveučilišta u Ljubljani, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Ljubljana, Slovenija i
¹Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska*

Opisali smo glavne novosti u dijagnostici hepatitisa B i C kao dio hrvatskih smjernica za dijagnostiku i liječenje virusnih hepatitisa 2013. Dijagnostika akutnog i kroničnog hepatitisa B započinje određivanjem HBsAg, anti-HBc i anti-HBs. Ostale serološke biljege hepatitisa B treba određivati tek u drugom koraku ako su nalazi HBsAg i/ili anti-HBc pozitivni. Pozitivan nalaz samo na anti-HBc potrebno je obvezno nadopuniti određivanjem HBV DNK. Kvantitativno određivanje HBsAg treba se koristiti komplementarno s određivanjem HBV DNK za: (i) razlikovanje inaktivnog nositelja HBsAg od aktivnog kroničnog HBeAg-negativnog hepatitisa B u bolesnika sa HBV DNK nižom od 2.000 IU/mL te za (ii) praćenje tijeka liječenja kroničnog hepatitisa B s pegiliranim interferonom-alfa. Metoda PCR-a u stvarnom vremenu ostaje i dalje metoda izbora za detekciju i kvantifikaciju HBV DNK. Testiranje za HCV započinje određivanjem specifičnih protutijela probirnim enzimskim imunotestovima ili brzim testovima. Sve osobe s pozitivnim probirnim anti-HCV testom treba testirati na prisutnost HCV RNK ili antigena virusne kapside. Potvrđne anti-HCV testove treba koristiti samo kao dodatne testove koji će potvrditi ili isključiti značenje reaktivnih rezultata probirnih enzimskih imunotestova u osoba koje su HCV RNK negativne. U praćenju virusne kinetike tijekom trojne terapije hepatitisa C preporučuje se korištenje molekularnih testova s identičnom donjom granicom detekcije (LLOD) te donjom granicom kvantifikacije. Određivanje rezistencije HCV-a na inhibitore proteaze nije dio obveznog dijagnostičkog praćenja bolesnika liječenih s trojnom terapijom. Ne postoje dostatni dokazi o potrebi uvođenja subtipizacije HCV-a u obveznu preterapijsku obradu bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Genotip IL-28 je važan prediktor SVR-a u bolesnika liječenih kombinacijom IFN i ribavirina kao i u bolesnika zaraženih genotipom 1 liječenih trojnom terapijom. Genotipizacija IL-28B preporučuje se u preterapijskoj obradi bolesnika s kroničnim hepatitisom C. Posebno je značajan dijagnostički parametar u terapijski-naivnih bolesnika s kroničnim hepatitisom C prilikom dvojbe dvojnja vs. trojna terapija.

Ključne riječi: hepatitis B, hepatitis C, dijagnostika

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Mario Poljak, dr. med.
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Ljubljani
Zaloška 4
1000 Ljubljana, Slovenija
E-pošta: mario.poljak@mf.uni-lj.si

UVOD

Virusni hepatitis se ne mogu klinički razlikovati prema etiologiji bolesti. Obično započinju prodromalnom fazom s nekarakterističnim simptomima, manifestiraju se povećanjem jetre i povišenjem jetrenih enzima, a samo dio bolesnika razvije vidljivu žuticu. Česta je i subklinička slika bolesti. Poznajemo pet primarnih virusa hepatitisa A-E. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti i druge moguće uzročnike virusnih hepatiti-

sa kao što su Epstein Barrov virus i citomegalovirus te ostale neinfektivne razloge upale jetre.

Utvrđivanje etiologije virusnih hepatitisa temelji se na serološkoj dijagnostici odnosno na određivanju specifičnih protutijela i/ili antigena u krvi bolesnika i rjeđe uporabom molekularne dijagnostike odnosno određivanjem prisutnosti virusnih nukleinskih kiselina u krvi. Za dokazivanje aktivnosti virusa te za praćenje tijeka i liječenja kroničnih hepatitisa danas upotrebljavamo uglavnom molekularne metode.

Prve hrvatske nacionalne smjernice o serološkoj dijagnostici virusnih hepatitisa objavljene su 2005. g. u tematskom broju časopisa *Acta Medica Croatica* (1). Prve hrvatske nacionalne smjernice o molekularnoj dijagnostici infekcije virusom hepatitisa C (HCV) i virusom hepatitisa B (HBV) objavljene su 2009. g. u tematskom broju časopisa *Acta Medica Croatica* posvećenom 1. hrvatskoj konsenzus konferenciji o virusnim hepatitisima koja je održana u Zagrebu (2). S obzirom na nedavni razvoj novih metoda za dijagnostiku te praćenje tijeka i liječenja virusnih hepatitisa, te uvođenje novih načina liječenja postoji potreba dopune postojećih smjernica uz rekapitulaciju najvažnijih postupnika. U članku smo na kratko opisali glavne novosti u dijagnostici hepatitisa B i C predstavljene na sastanku Radne skupine za izradu hrvatskih smjernica za dijagnostiku i liječenje virusnih hepatitisa 2013. održanom 28. veljače 2013. u Zagrebu. U članku su predstavljene samo novosti u dijagnostici infekcije s HBV-om i HCV-om, a za klasični dijagnostički postupnik potrebno je konzultirati prethodne članke (1,2).

HEPATITIS B

Novosti u serološkoj dijagnostici

U serološkoj dijagnostici infekcije s HBV-om nema novih parametara ili biljega koji bi značajnije unaprijedili dijagnostički postupak detaljno opisan u postupniku 2005. godine (1). Od klasičnih seroloških biljega u posljednje su se dvije godine pojavile nove indikacije samo za kvantitativno određivanje HBsAg (3-6). Kvantitativno određivanje HBsAg odnosno određivanje koncentracije HBsAg (u IU/mL seruma/plazme) ne može zamijeniti određivanje koncentracije HBV DNK u krvi, ali se preporučuje koristiti zajedno s određivanjem koncentracije HBV DNK za dvije indikacije.

Prva indikacija je razlikovanje statusa inaktivnog nositelja HBsAg od aktivnog kroničnog HBeAg-negativnog hepatitisa B u bolesnika s koncentracijom HBV DNK manjom od 2.000 IU/mL (3,4). U bolesnika s koncentracijom HBV DNK nižom od 2.000 IU/mL i koncentracijom HBsAg nižom od 1.000 IU/mL najvjerojatnije se radi o inaktivnom nositelju HBsAg te pri koncentraciji HBsAg višom od 1.000 IU/mL najvjerojatnije se radi o kroničnom HBeAg-negativnom hepatitisu B. Unatoč maloj koncentraciji HBV DNK u krvi bolesnika, što je viša koncentracija HBsAg, veća je vjerojatnost kroničnog HBeAg-negativnog hepatitisa B (3,4).

Druga indikacija za kvantitativno određivanje HBsAg je praćenje tijeka liječenja kroničnog hepatitisa B

(KHB) s pegiliranim interferonom-alfa (PEG IFN-alfa) (5,6). Tako se danas smatra da je najbolji pokazatelj pozitivne prediktivne vrijednosti za izlječenje (gubitak HBsAg) s PEG IFN-alfa u bolesnika s HBeAg-pozitivnim hepatitisom B koncentracija HBsAg niža od 1.500 IU/mL u 12. tjednu liječenja te u bolesnika s HBeAg-negativnim hepatitisom B pad koncentracije HBsAg za barem 0.5 log u 12. tjednu liječenja. Kao najbolji pokazatelj negativne prediktivne vrijednosti za izlječenje s PEG IFN-alfa u bolesnika s HBeAg-pozitivnim hepatitisom B smatra se koncentracija HBsAg viša od 20.000 IU/mL u 12. tjednu liječenja te u bolesnika s HBeAg-negativnim hepatitisom B pad koncentracije HBsAg manji od 0.5 log u prvih 12 tjedana liječenja (5,6).

PREPORUKE

Inicijalna dijagnostika za dokazivanje akutnog i kroničnog hepatitisa B započinje određivanjem HBsAg, anti-HBc i anti-HBs. Ostale serološke biljege hepatitisa B treba određivati tek u drugom koraku; ako su nalazi HBsAg i/ili anti-HBc pozitivni, dijagnostika se proširuje na određivanje anti-HBc IgM, HBeAg i anti-HBe te po potrebi i koncentracije HBV DNK.

Nakon reaktivnog rezultata HBsAg testa, njegovu prisutnost je uvijek potrebno potvrditi potvrdnim testom neutralizacije.

Pozitivan nalaz samo anti-HBc potrebno je obvezno nadopuniti određivanjem HBV DNK. Laboratoriji koji rade hitnu predtransplantacijsku dijagnostiku trebali bi imati mogućnost hitnog određivanja HBV DNK.

Za rizične populacije, u koje spadaju i zdravstveni radnici, nakon provedenog cijepljenja za HBV treba obvezno odrediti koncentraciju anti-HBs.

Kvantitativno određivanje HBsAg treba se koristiti komplementarno određivanjem HBV DNK za (i) razlikovanje statusa inaktivnog nositelja HBsAg od aktivnog kroničnog HBeAg-negativnog hepatitisa B u bolesnika s koncentracijom HBV DNK manjom od 2.000 IU/mL te za (ii) praćenje tijeka liječenja KHB s PEG IFN-alfa.

Novosti u molekularnoj dijagnostici

Smjernice za molekularnu dijagnostiku infekcije HBV-om iz 2009. godine opisuju izbor metoda za kvantifikaciju HBV DNK, genotipizaciju HBV-a i određivanje rezistencije HBV-a na antivirusne lijekove (2). U razdoblju od 2009. do 2013. godine nije bilo značajnijih promjena u molekularnoj dijagnostici HBV infekcije.

PREPORUKE

Metoda PCR-a u stvarnom vremenu ostaje i dalje metoda izbora za detekciju i kvantifikaciju HBV DNK.

Metode izbora za određivanje rezistencije HBV-a na lamivudin, telbivudin, entekavir, adefovir i tenofovir i dalje su: (1) metoda sekvenciranja nukleinskih kiselina i (2) standardizirani test koji se temelji na kombinaciji PCR-a i reverzne transkripcije (2,7). Pri određivanju rezistencije HBV-a na antivirusne lijekove preporučuje se analiza minimalne skupine mutacija: M204V/I, L180M, A181T/V, N236T, I169T, V173L, M250V, T184G i S202I/G (8).

S obzirom na visoku prevalenciju genotipa D u Hrvatskoj te na činjenicu da genotip HBV-a ne utječe na terapijski algoritam, genotipizacija HBV-a se za sada ne preporučuje kao obvezni dio preterapijske obrade bolesnika (8).

HEPATITIS C

Novosti u serološkoj dijagnostici

Smjernice za serološku dijagnostiku infekcije HCV-om iz 2005. godine opisuju izbor metoda za serološku dijagnostiku, postupnik i najčešće dileme i probleme u serološkoj dijagnostici HCV (1). U razdoblju od 2005. do 2013. godine nije bilo značajnijih promjena, ali zbog dugog razdoblja i značenja što ranijeg otkrivanja zaraženih osoba, u članku navodimo detaljne preporuke za serološku dijagnostiku HCV.

Jedini važniji pomak u posljednjih nekoliko godina je razvoj novih tehnologija koje omogućavaju brzu dijagnostiku HCV izvan standardnih zdravstvenih ustanova, tzv. testova *point-of-care* (POC) (9,10). Testovi su jednostavni za korištenje, rezultat je dostupan za dvadesetak minuta i izvoditi ih mogu i nezdravstveni djelatnici koji su prošli osnovnu edukaciju o izvođenju tih testova (11). Prednost im je brzo dobivanje rezultata koje je dostupno na mjestu izvođenja čime se smanjuje broj testiranih osoba koje ne dolaze po svoj nalaz. Brzi test za određivanje protutijela anti-HCV odobren od američke *Food and Drug Administration* (FDA) *OraQuick HCV Rapid Antibody Test* (*OraSure Technologies Inc, Bethlehem, PA, USA*) dostupan je i u Hrvatskoj. Izvoditi se može iz različitih uzoraka krvi (venska krv, kapljica krvi iz prsta, serum, plazma), ali i iz oralne tekućine koja se dobije uzimanjem obriska područja uz gingivu pripremljenim testnim jastučićem. Osjetljivost testa *OraQuick* je 98-99 %, a specifičnost 98-100 % (10). Ovi testovi, kao i standardni anti-HCV testovi

smatraju se probirnim i zahtijevaju dodatnu potvrdu ako se radi o reaktivnom rezultatu.

PREPORUKE

Testiranje za HCV trebalo bi preporučiti svim osobama s povećanim rizikom za HCV infekciju kao što su osobe rođene između 1945. i 1965. godine, intravenskim korisnicima droga, ali i onima koji su sporadično koristili drogu intravenski (makar samo jedanput), osobama koje su dobile koncentrate trombocita prije 1987. godine, primateljima transfuzije ili solidnih organa prije 1992., osobama koje su bilo kada bile na hemodijalizi, osobama s poznatom ekspozicijom za HCV kao što su zdravstveni radnici nakon ubodnog incidenta s HCV-pozitivnom krvi, primateljima organa za koje je kasnije utvrđeno da je darovatelj HCV-pozitivan, svim osobama zaraženim HIV-om i HBV-om, bolesnicima sa znacima oštećenja jetre te djeci HCV-pozitivnih majki.

Testiranje za HCV započinje određivanjem specifičnih protutijela probirnim enzimskim imunotestovima. Probirni serološki testovi najnovije generacije osim anti-HCV prepoznaju i antigen virusne kapside. Kao probirni testovi mogu se koristiti i brzi testovi za dijagnostiku HCV izvan zdravstvenih ustanova. Lažno negativan nalaz probirnog testa iznimno je moguć u imunokompromitiranih ispitanika te kod akutnog hepatitisa C, u kojih je ponekad potrebno odrediti i HCV RNK.

*Pozitivan anti-HCV probirni test ukazuje da je osoba bila u kontaktu s HCV, ali samo na temelju anti-HCV protutijela ne može se razlučiti je li riječ o aktivnom ili preboljelom hepatitisu C. Stoga je potrebno u takvih bolesnika odmah učiniti testiranje na prisutnost HCV RNK, bez prethodnog potvrđnog testiranja na anti-HCV. Dokaz HCV RNK u serumu bolesnika odraz je aktivne replikacije virusa u jetri, dakle znak aktivne infekcije. Za dokaz preboljelog hepatitisa C, anti-HCV pozitivnog bolesnika potrebno je testirati na prisutnost HCV RNK najmanje dva puta tijekom 8-12 mjeseci. Ako je u oba određivanja HCV RNK negativna, podrazumijeva se da je HCV infekcija spontano eliminirana. U svim spomenutim kliničkim indikacijama moguće je umjesto HCV RNK upotrebljavati i određivanje antigena virusne kapside (engl. *core antigen*) ali je u slučaju negativnog rezultata, potrebno napraviti dodatno testiranje na HCV RNK (12).*

Metode za dokazivanje HCV RNK (ili antigena virusne kapside) također se upotrebljavaju kao probirne metode pri testiranju davatelja krvi u nekim razvijenim zemljama, za dokazivanje HCV infekcije u bolesnika na hemodijalizi te u dojenčadi anti-HCV pozitivnih majki.

Potvrđne anti-HCV (RIBA, imunoblot) testove treba koristiti samo kao dodatne testove koji će potvrditi ili isključiti značenje reaktivnih rezultata probirnih enzimskih imunotestova u osoba koje su HCV RNK negativne.

Novosti u molekularnoj dijagnostici

Nacionalne smjernice iz 2009. godine opisuju kliničku značajnost i metodologiju genotipizacije HCV-a, te detekcije i kvantifikacije HCV RNK (2). Odobrenje prvih DAA (engl. "direct acting antivirals"), tj. inhibitora NS3/4A proteaze HCV-a boceprevira i telaprevira za kliničku primjenu 2011. g. značajno je utjecalo na područje molekularne dijagnostike HCV infekcije, posebice u smislu potrebe preciznog definiranja granica detekcije i kvantifikacije molekularnih testova koji se koriste u praćenju virusne kinetike tijekom liječenja. Određivanje mutacija povezanih s rezistencijom HCV-a na boceprevir i telaprevir novo je područje molekularne analize HCV-a koje ima važnu ulogu u kliničkim i biomedicinskim istraživanjima.

Tijekom 2009. i 2010. g. objavljeni su i rezultati četiri GWAS istraživanja (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) koja su pokazala biološku i kliničku značajnost polimorfizama lokaliziranih u blizini gena koji kodira sintezu IL-28B. Rezultati navedenih istraživanja ukazali su na potrebu uvođenja prvog farmakogenomskog testa u preterapijsku obradu bolesnika s kroničnim hepatitisom C (KHC).

Zbog svega navedenog nedvojbeno postoji potreba osuvremenjivanja hrvatskih smjernica o molekularnoj dijagnostici HCV. Nove nacionalne smjernice sadrže preporuke o: (i) izboru metode za kvantifikaciju HCV RNK u bolesnika liječenih kombinacijom PEG IFN-alfa, ribavirina i inhibitora proteaze (boceprevir i telaprevir), (ii) određivanju rezistencije HCV-a na boceprevir i telaprevir, te (iii) farmakogenomskom testu određivanja polimorfizma promotora gena za IL-28B.

A) Kvantifikacija HCV RNK u bolesnika liječenih inhibitorima proteaze

Prema svjetskim i hrvatskim smjernicama iz 2009. g., metoda izbora za detekciju i kvantifikaciju HCV RNK je PCR u stvarnom vremenu (engl. "real-time polymerase chain reaction") (2,13). S obzirom na iznimnu osjetljivost, PCR testovi u stvarnom vremenu mogu se primijeniti i kao kvalitativni (detekcija HCV RNK) i kao kvantitativni testovi (određivanje koncentracije HCV RNK u IU/mL biološkog uzorka). U kliničkoj se dijagnostici preporučuje isključivo primjena molekularnih testova koje su odobrile *European Medicinal Agency* (EMA) i američki FDA (2).

U bolesnika liječenih kombinacijom PEG IFN-alfa i ribavirina, trajni virusološki odgovor (SVR, "sustained viral response") definiran je kao nemjerljiva HCV RNK u serumu bolesnika 6 mjeseci nakon završetka liječenja uz primjenu molekularnog testa s donjom granicom detekcije ≤ 50 IU/mL (2,13).

Uvođenjem trojne terapije kombinacijom PEG IFN-alfa, ribavirina i inhibitora proteaze uspostavljeni su novi kriteriji osjetljivosti molekularnih testova koji se koriste za praćenje virusne kinetike i procjenu uspjeha liječenja.

Donja granica detekcije (LLOD, "lowest level of detection") molekularnih testova definirana je kao koncentracija HCV RNK pri kojoj manje od 5 % biološkog uzorka koji sadrži poznatu količinu HCV RNK stvara nemjerljivi signal odnosno kao najmanja koncentracija HCV RNK koja se može detektirati u uzorku s vjerojatnošću od 95 % (7). Donja granica kvantifikacije (LLOQ, "lowest level of quantification") testa je najniža koncentracija HCV RNK unutar validiranog kvantifikacijskog raspona testa (7).

LLOD i LLOQ dijela komercijalno-dostupnih molekularnih testova su identične (najčešće oko 12 IU HCV RNK/mL). Međutim, dostupni su i testovi kod kojih su LLOD i LLOQ različite. Ako se u praćenju virusne kinetike tijekom liječenja KHC koriste testovi s različitim LLOD i LLOQ, potrebno je precizno definirati i adekvatno interpretirati kliničku značajnost rezultata testova kod kojih je HCV RNK u serumu mjerljiva (tj. iznad ili na granici LLOD) ali se ne može pouzdano kvantificirati, jer je rezultat ispod granice LLOQ. Važnost pažljive interpretacije kliničke značajnosti rezultata molekularnih testova s različitim LLOD i LLOQ za HCV RNK dokazala je i analiza rezultata registrajskih studija za boceprevir i telaprevir koje je provela FDA (14-18). Naime, rezultati praćenja virusne kinetike tijekom individualnog pristupa liječenju (RGT, "response guided treatment") u 17 % bolesnika liječenih boceprevirom (nakon 8 tjedana liječenja, tj. 4 tjedna primjene boceprevira) te u 28 % bolesnika liječenih telaprevirom (nakon 4 tjedna liječenja) pokazali su da je "HCV RNK bila mjerljiva no ispod LLOQ" (18). Postotak bolesnika s "mjerljivom HCV RNK koja je bila ispod LLOQ" koji su u konačnici postigli SVR bio je statistički značajno niži (za 5-20 %) u odnosu na bolesnike koji su u navedenim razdobljima praćenja imali "nemjerljivu HCV RNK" u serumu. Stoga FDA preporučuje da se tijekom RGT-a kao kriterij uspjeha trojne terapije koristi isključivo dokaz nemjerljive viremijske (19,20).

S obzirom na jednostavniju interpretaciju rezultata, u praćenju virusne kinetike tijekom trojne terapije pre-

poručuje se korištenje molekularnih testova s identičnim LLOD i LLOQ za HCV RNK.

U bolesnika liječenih inhibitorima proteaze, detekcija/kvantifikacija HCV RNK primjenjuje se: (i) u praćenju virusne kinetike tijekom RGT-a, (ii) kao kriterij prekida liječenja inhibitorima proteaze (eng. "futility rules"), (iii) u svrhu procjene postizanja odgovora na kraju liječenja (ETR ili EOT ili ETVR - u literaturi se koriste sve tri kratice, "end of treatment response") i (iv) u svrhu procjene postizanja SVR-a (tablica 1).

Određivanje virusne kinetike u bolesnika liječenih inhibitorima proteaze tijekom RGT-a temelji se isključivo na molekularnim testovima s LLOQ ≤ 25 IU/mL i LLOD u rasponu od 10-15 IU/mL. Algoritam praćenja viremije u određenim vremenskim točkama tijekom liječenja boceprevirom odnosno telaprevirom detaljno je prikazan u radu Vince i sur. (21).

Značajno je istaknuti da se tijekom praćenja virusne kinetike, tj. procjene potrebe prekida liječenja inhibitorima proteaze ("futility rules") po prvi puta pojavljuju nove ciljne vrijednosti viremije u serumu (100 odnosno 1.000 IU HCV RNK/mL za boceprevir odnosno telaprevir). Liječenje s PEG IFN-alfa, ribavirinom i boceprevirom prekida se u bolesnika u kojih je viremija >100 IU/mL nakon 12 tjedana liječenja i mjerljiva nakon 24 tjedna liječenja uz primjenu molekularnog testa s LLOD od 10-15 IU/mL. Liječenje s PEG IFN-alfa, ribavirinom i telaprevirom prekida se ako je viremija >1.000 IU/mL nakon 4 ili 12 tjedana i mjerljiva nakon 24 tjedna liječenja.

FDA različito definira granice osjetljivosti testova koji se koriste za procjenu ETR-a i SVR-a. Za procjenu ETR-a potrebno je koristiti molekularne testove s LLOD u rasponu 10-15 IU/mL. SVR u bolesnika liječe-

nih inhibitorima proteaze definiran je kao nemjerljiva HCV RNK 6 mjeseci nakon završetka liječenja primjenom molekularnog testa s LLOQ koji je <25 IU/mL.

PREPORUKE

Određivanje virusne kinetike u bolesnika liječenih inhibitorima proteaze kod kojih se primjenjuje individualni pristup liječenju temelji se na molekularnim testovima s LLOQ ≤ 25 IU/mL i LLOD u rasponu od 10-15 IU/mL. S obzirom na jednostavniju interpretaciju rezultata, u praćenju virusne kinetike tijekom trojne terapije preporučuje se korištenje molekularnih testova s identičnim LLOD i LLOQ.

B) Određivanje rezistencije HCV-a na boceprevir i telaprevir i značajnost subtipizacije virusa

Molekularna heterogenost HCV-a, tj. postojanje različitih populacija virusnih kvazispjecijesa u zaraženih osoba jedno je od najvažnijih obilježja ove infekcije *in vivo* (22). Molekularnoj heterogenosti HCV-a pridonose intenzivna replikacija virusa (nastanak i do 10^{12} viriona dnevno u zaražene osobe), kratko vrijeme poluživota viriona (2-3 h) i visoka stopa mutacija RNK-ovisne RNK polimeraze NS5B koja nema aktivnost 3' 5' egzonukleaze (eng. *proofreading activity*). Procjenjuje se da stopa mutacija genoma HCV-a iznosi 10^{-3} supstitucija nukleotida po lokusu tijekom 1 godine. Čimbenici koji su važni za molekularnu heterogenost HCV-a imaju značajnu ulogu u razvoju rezistencije HCV-a na inhibitore proteaze (23).

Ciljna struktura djelovanja boceprevira i telaprevira je virusni enzim NS3/4A. Enzim NS3 (67 kD) jedan je od

Tablica 1.

Algoritam primjene molekularnih testova za detekciju/kvantifikaciju HCV RNK tijekom liječenja s PEG IFN-alfa, ribavirinom i inhibitorima proteaze

Detekcija/kvantifikacija HCV RNK	Boceprevir	Telaprevir
Individualni pristup liječenju (RGT, "response-guided therapy") primjena molekularnih testova s LLOQ ≤ 25 IU/mL i LLOD 10-15 IU/mL	Nemjerljiva HCV RNK nakon 6 i 24 tjedna liječenja	Nemjerljiva HCV RNK nakon 4 i 12 tjedana liječenja
Kriterij prekida liječenja ("futility rules")	- HCV RNK ≥ 100 IU/mL nakon 12 tjedana liječenja - mjerljiva HCV RNK nakon 24 tjedna liječenja	- HCV RNK >1.000 IU/mL nakon 4 i 12 tjedna liječenja - mjerljiva HCV RNK nakon 24 tjedna liječenja
Odgovor na kraju liječenja (ETR ili EOT ili ETVR "end of treatment response")	Nemjerljiva HCV RNK (molekularnim testom s LLOD 10-15 IU/mL)	
Trajni virusološki odgovor (SVR, "sustained virological response")	HCV RNK $< \text{LLOQ}$ molekularnog testa 24 tjedna nakon ETR (primjena testova s LLOQ < 25 IU/mL)	

* modificirano prema Kwo P. Understanding optimal use and interpretation of assays in HCV (Clinical Care Options)

** LLOD (lowest level of detection), LLOQ (lowest level of quantification)

nestrukturnih proteina HCV-a koji u N-terminalnom dijelu molekule iskazuje aktivnost serinske proteaze dok na C-terminalnom dijelu molekule iskazuje aktivnosti NTPase i helikaze (24). NS3 proteaza nalazi se unutar endoplazmatskog retikuluma zaražene stanice i stvara heterodimerski kompleks s membranskim proteinom NS4A koji djeluje kao njezin kofaktor. NS3/4A proteaza, zajedno s drugim virusnim i staničnim proteazama, cijepa virusni poliprotein koji sadrži 3.000 aminokiselina na 10 manjih strukturalnih i nestrukturalnih virusnih proteina (23).

Mutacije povezane s rezistencijom HCV-a na inhibitore proteaze nalaze se u regiji gena koja kodira sintezu enzimski aktivnih dijelova NS3/4A proteaze. U virionima s mutiranom NS3/4A proteazom, boceprevir i telaprevir ne mogu spriječiti procesuiranje virusnih poliproteina te se, usprkos prisutnosti lijekova, nastavlja sinteza virusnih proteina te formiranje novih viriona (23).

S obzirom na to da tijekom životnog ciklusa HCV-a ne dolazi do integracije virusne nukleinske kiseline u stanični genom te da postoji mogućnost eradikacije virusa, biološka i klinička značajnost rezistencije HCV-a na inhibitore proteaze je ograničena (23,24).

Genetska barijera HCV-a za rezistenciju na inhibitore NS3/4A proteaze relativno je niska. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je genetska barijera subtipa HCV-a 1a za rezistenciju na inhibitore proteaze značajno niža (zahtijeva supstituciju samo 1 nukleotida) od genetske barijere subtipa 1b za rezistenciju. Kliničku značajnost različitih genetskih barijera za rezistenciju subtipova 1a i 1b indirektno pokazuje i podatak da je postotak bolesnika zaraženih subtipom 1a koji su postigli SVR tijekom liječenih boceprevirom (53 % do 64 %) bio niži u odnosu na bolesnike zaražene subtipom 1b (66-73 %) (19).

In vitro, boceprevir i telaprevir iskazuju značajnu križnu rezistenciju, a biološka značajnost mutacija povezanih s rezistencijom također ovisi o subtipu virusa. Testovi na staničnim kulturama (HCV replikoni) pokazali su da mutacije koje najčešće nastaju u subtipu 1a uzrokuju značajno veću fenotipsku rezistenciju na inhibitore proteaze (primjerice smanjenje osjetljivosti na boceprevir 5-16 puta u odnosu na divlji tip virusa) u usporedbi s mutacijama koje su uobičajene u bolesnika zaraženih subtipom 1b (smanjenje osjetljivosti 2-4 puta) (23,25).

Iako je biološka značajnost subtipova HCV-a u nastanku rezistencije HCV-a na inhibitore proteaze nedvojbeno, za sada ne postoji potreba uvođenja subtipizacije HCV-a u obveznu preterapijsku obradu bolesnika s KHC.

Primarna rezistencija HCV-a na telaprevir prisutna je u 0,6-1,2 % bolesnika zaraženih subtipom 1a i najčešće se povezuje s mutacijama R155K i V36M (26). U neliječenih bolesnika zaraženih subtipom 1b, kvazispjecijesi s mutacijama T54A, V36A i A156T koje uzrokuju rezistenciju na telaprevir vrlo su rijetke (mutacije A156S i V36M otkrivene u 0,07 % bolesnika, mutacija T54S u 2,1 % bolesnika) (26). Primarna rezistencija HCV-a na boceprevir u bolesnika zaraženih genotipom 1a najčešće se povezuje s mutacijama V36M, T54S, R155K (27). U neliječenih bolesnika zaraženih subtipom HCV-a 1b najčešće se javljaju mutacije T45A, V55A, A156S i I/V170A koje uzrokuju rezistenciju na boceprevir no prevalencija primarne rezistencije je vrlo niska (27). Prema dosadašnjim rezultatima, postojanje primarne rezistencije nije značajnije utjecalo na ishod liječenja boceprevirom i telaprevirom.

Međutim, pojava sekundarne rezistencije HCV-a na boceprevir i telaprevir (rezistencija u liječenih osoba) povezana je s neuspjehom liječenja. Naime, rezistentni kvazispjecijesi dokazani su genotipizacijskim testom u 80-90 % bolesnika u kojih je došlo do virusnog proboja (engl. "*virological breakthrough*") i kod relapsa (28). U ovim je istraživanjima za detekciju rezistentnih kvazispjecijesa u kliničkim istraživanjima korišteno standardno "*population-based*" sekvenciranje s razinom detekcije rezistentnih kvazispjecijesa od oko 20 %.

Prevalencija sekundarne rezistencije analizirana je u kliničkim pokusima faze 3 primjene boceprevera i telaprevera (28). Sekundarna rezistencija dokazana je u 16 % bolesnika liječenih boceprevirom (14). U prethodno neliječenih bolesnika prevalencija sekundarne rezistencije na telaprevir iznosila je 12 %, dok je u bolesnika koji su prethodno bili liječeni iznosila 22 % (16,17).

Longitudinalno praćenje perzistencije mutacija povezanih s rezistencijom HCV-a na boceprevir u bolesnika iz faze 2 kliničkog istraživanja pokazuje da se rezistentni kvazispjecijesi mogu detektirati u 43 % bolesnika nakon razdoblja praćenja od 2 godine (28). U bolesnika uključenih u fazu 3 kliničkog pokusa liječenja telaprevirom, mutacije povezane s rezistencijom mogu se dokazati u 40 % bolesnika nakon medijana razdoblja praćenja od 45 tjedana (28,29).

Literaturni podatci pokazuju da dužina perzistencije mutacija povezanih s rezistencijom na boceprevir i telaprevir ovisi o virusnom fitnessu, vrsti mutacije i o subtipu HCV-a. Primjerice, u bolesnika liječenih telaprevirom koji su zaraženi subtipom 1a, medijan vremena do gubitka mutacije V36M iznosio je 6 mjeseci, dok je za gubitak mutacije R155K najčešće bilo potrebno 10 mjeseci (za obje mutacije oko 13 mjeseci). U bolesnika zaraženih subtipom 1b, medijan vremena poluživota rezistentnih kvazispjecijesa bio je kraći u us-

poredbi sa subtipom 1a (3 mjeseca za najčešće mutacije T54A, V36A i A1586T te 9 mjeseci za rjeđe mutacije A156S) (29). Dodatna longitudinalna analiza (medijan vremena praćenja 29 mjeseci, raspon 7-49 mjeseci) u bolesnika kod kojih liječenje telaprevirom nije bilo uspješno pokazala je da na kraju razdoblja 85 % bolesnika više nema rezistentne kvazispicijese (30). Brzina nestanka rezistentnih kvazispicijesa ovisi i o vrsti mutacije. Primjerice, na kraju razdoblja praćenja rezistentni kvazispicijesi s mutacijom T54A nisu se više mogli detektirati u 94 % bolesnika ali najčešća mutacija R155K bila je detektabilna u čak 32 % bolesnika. Longitudinalno praćenje brzine nestanka rezistentnih kvazispicijesa u bolesnika kod kojih liječenje boceprevirom nije bilo uspješno pokazuje da se mutacije povezane s rezistencijom mogu dokazati u samo 20 % bolesnika nakon razdoblja praćenja od 6 do 14 mjeseci (31).

Na temelju dosadašnjih spoznaja, određivanje rezistencije HCV-a na inhibitore proteaze ne može se preporučiti kao obvezni dio praćenja bolesnika liječenih s PEG IFN-alfa, ribavirinom i inhibitorima proteaze jer dokaz rezistentnih kvazispicijesa nema utjecaja na algoritam liječenja. Međutim, nedvojbeno je potreba za novim istraživanjima bioloških mehanizama i kliničke značajnosti rezistencije HCV-a na boceprevir i telaprevir te mogućeg utjecaja na primjenu novih generacija inhibitora proteaze.

PREPORUKE

Određivanje rezistencije HCV-a na inhibitore proteaze nije dio obveznog dijagnostičkog praćenja bolesnika liječenih PEG IFN-alfa, ribavirinom i inhibitorima proteaza no iznimno je značajan dio kliničkih istraživanja u ovom području.

Ne postoje dostatni dokazi o potrebi uvođenja subtipizacije HCV-a u obveznu preterapijsku obradu bolesnika s kroničnim hepatitisom C.

C) Farmakogenomski test određivanja polimorfizma promotora gena za IL-28B

Interleukin-28B (IL-28) ili interferon-lambda 3 (IFN- λ 3) je citokin koji se, zajedno s IL-29 (IFN- λ 1) i IL-28A (IFN- λ 2) ubraja u IFN tipa III tj. IFN- λ (32,33). IFN- λ ubrajaju se u porodicu IL-10 i njemu sličnih citokina, iako su biološki i funkcionalno (posebno u smislu antivirusnog učinka) značajnije povezani s IFN tipa I. Interferoni klase I i III sintetiziraju se nakon virusne infekcije i iskazuju snažan antivirusni učinak (Kotenko 2011). *In vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala određene razlike u antivirusnom učinku IFN klase I i III

koje se povezuju s razlikama u kinetici aktivacije interferonom-inducibilnih gena čiji proteinski produkti inhibiraju pojedine faze životnog ciklusa različitih virusa kao i s različitim obrascem distribucije receptora za ove dvije skupine citokina (34).

Geni koji kodiraju sintezu IFN- λ nalaze se u klasteru na humanom kromosomu broj 19 i imaju 4 intro-*na* koji se nalaze na pozicijama (s obzirom na okvir čitanja proteina) koje su konzervirane u genima za sve molekule iz porodice IL-10-sličnih citokina (34).

Prva istraživanja o biomedicinskom značenju polimorfizma pojedinačnih nukleotida (SNPs, "single nucleotide polymorphisms") u HCV infekciji objavljena su 2009. i 2010. g. (35-38). Četiri neovisna GWAS istraživanja pokazala su značajnu povezanost između prisutnosti SNP-a rs12979860 i rs809917 koji se nalaze u blizini gena za IL-28B (IFN- λ 3) i učestalosti spontane eliminacije virusa te ishoda liječenja KHC s PEG IFN-alfa i ribavirinom (35-38).

U osoba koje su spontano eliminirale HCV, učestalost CC genotipa SNP-a rs12979860 u blizini gena za IL-28B bila je dvostruko veća u usporedbi s osobama u kojih je uspostavljena kronična infekcija (35,39).

Ge i sur. su analizirali rezultate liječenja PEG IFN-alfa 2a ili PEG IFN-alfa 2b i ribavirinom više od 1.000 bolesnika s KHC zaraženih genotipom 1 HCV-a i pokazali da je u homozigota za SNP rs12979860 C/C učestalost postizanja SVR-a dvostruko veća u odnosu na T/T homozigote za isti SNP (35). Učestalost postizanja SVR-a u SNP-u rs12979860 C/T heterozigota bila je nešto veća u odnosu na T/T homozigote. U istom su istraživanju Ge i sur. pokazali da se značajno niži postotci bolesnika crne rase koji su postigli SVR u odnosu na bolesnike bijele rase (za oko 50%) mogu povezati sa značajno nižom učestalošću rs12979860 C/C homozigota u crnaca (35).

Thompson i sur. su također analizirali veću učestalost postizanja SVR-a u bolesnika s KHC zaraženih genotipom 1 liječenih PEG IFN-alfa i ribavirinom s obzirom na detekciju C ili T alela na poziciji SNP rs12979860 (40). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je SVR dokazan u 69 % bolesnika koji su bili C/C homozigoti za SNP rs12979860. Postotak SVR-a u C/T heterozigota i T/T homozigota za SNP rs12979860 bili su značajno manji (33 % i 27 %) u usporedbi s C/C homozigotima (40).

U bolesnika bijele rase, SVR je postignut u 69 % C/C homozigota, 33 % C/T heterozigota i 27 % T/T homozigota za SNP rs12979860. U bolesnika crne rase, SVR je postignut u 48 % C/C homozigota, 15 % C/T heterozigota i 13 % T/T homozigota za SNP rs12979860 što je u skladu s rezultatima Ge i sur. (35).

Dosadašnja su istraživanja pokazala se je IL-28B bolji prediktor SVR-a u bolesnika liječenih PEG-IFN-alfa i ribavirinom u usporedbi s viremijom u serumu prije započinjanja liječenja, stupnjem fibroze, dobi i spolom bolesnika (28,40-42). Prediktivna vrijednost genotipa IL-28 veća je u bolesnika zaraženih genotipom 1 HCV-a u odnosu na bolesnike s genotipovima HCV-a 2 i 3 (40,41). Detekcija T ili G alela na poziciji rs8099917 SNP-a u blizini gena za IL-28B također je koristan prediktor SVR-a (T je genotip koji ukazuje na povoljan ishod liječenja) (36,37).

U bolesnika liječenih boceprevirom i telaprevirom, genotip IL-28 je također značajan prediktor postizanja SVR-a no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se moglo pouzdanije procijeniti kliničku korisnost određivanja ovog polimorfizma (posebice u relapsa kod kojih je vjerojatniji T/T genotip) (28,42).

U bolesnika bijele rase koji su bili uključeni u kliničko istraživanje SPRINT 2 (liječenje boceprevirom tijekom 48 tjedana), SVR je postignut u 80 % C/C homozigota, 59 % T/T homozigota te u 71 % C/T heterozigota za rs12979860 (14). U bolesnika bijele rase koji su liječeni telaprevirom tijekom 12 tjedana (kliničko istraživanje ADVANCE), SVR je postignut u 90 % CC homozigota, 73 % T/T homozigota te u 71 % C/T heterozigota za rs12979860 (16).

Genotip IL-28B je također značajan prediktor virusne kinetike tijekom individualnog pristupa liječenju inhibitorima proteaze. U prethodno neliječenih bolesnika bijele rase u kliničkom istraživanju SPRINT 2, kriterij za RGT u osmom tjednu liječenja postignut je u 89 % C/C homozigota, no samo u 52 % bolesnika s T/T ili C/T genotipovima (14). U prethodno neliječenih bolesnika bijele rase uključenih u kliničko istraživanje ADVANCE, eRVR je postiglo 78 % C/C homozigota, 57 % heterozigota te 45 % T/T homozigota (16).

Biološka i klinička značajnost genotipa IL-28B dokazana je i u bolesnika s HIV/HCV koinfekcijom (43).

Genotip IL-28 je važan prediktor postizanja SVR-a tijekom dvojne i trojne terapije KHC te važan prediktor virusne kinetike u bolesnika liječenih RGT-om (individualni pristup liječenju) (28,42). Stoga se genotipizacija IL-28B preporučuje u predterapijskoj obradi bolesnika s KHC. Genotip IL-28B posebno je značajan dijagnostički parametar u terapijski-naivnih bolesnika s KHC prilikom dvojbe dvojnja vs. trojna terapija. U slučaju dokaza T/T genotipa te u bolesnika sa C/C genotipom i cirozom, visokom koncentracijom HCV RNK i drugim čimbenicima slabog odaziva na terapiju preporučuje se trojna terapija (44).

PREPORUKE

Genotip IL-28 je važan prediktor SVR-a u bolesnika liječenih kombinacijom IFN i ribavirina kao i u bolesnika zaraženih genotipom 1 liječenih trojnom terapijom. Stoga se genotipizacija IL-28B preporučuje u predterapijskoj obradi bolesnika s KHC. Genotip IL-28B posebno je značajan dijagnostički parametar u terapijski-naivnih bolesnika s KHC prilikom dvojbe dvojnja vs. trojna terapija.

LITERATURA

1. Burek V. Laboratory diagnosis of viral hepatitis B and C. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 405-12.
2. Židovec Lepej S, Dušek D, Budimir J, Vince A. [Molecular diagnosis of hepatitis C and hepatitis B infection]. *Acta Med Croatica* 2009; 63: 361-9.
3. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Tiniakos DG i sur. Hepatitis B surface antigen: relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2011; 55: 61-8.
4. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M i sur. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *J Hepatol* 2011; 55: 1121-31.
5. Janssen HL, Sonneveld MJ, Brunetto MR. Quantification of serum hepatitis B surface antigen: is it useful for the management of chronic hepatitis B? *Gut* 2012; 61: 641-5.
6. Sonneveld MJ, Zoutendijk R, Janssen HL. Hepatitis B surface antigen monitoring and management of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2011; 18: 449-57.
7. Chevaliez S, Rodriguez C, Pawlotsky J-M. New virological tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* 2012; 142: 1303-13.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167-85.
9. Lee SR, Yearwood GD, Guillon GB i sur. Evaluation of a rapid, point-of-care test device for the diagnosis of hepatitis C infection. *J Clin Virol* 2010; 48: 15-7.
10. Shivkumar S, Peeling R, Jafari Y, Joseph L, Pant Pai N. Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2012; 157: 558-66.
11. Đaković Rode O. Point-of-care (POC) testiranje u dijagnostici infektivnih bolesti. *Infektol Glasn* 2012; 32: 25-30.
12. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol* 2005; 32: 92-101.
13. Ghany MG, Strader DB, Thomas DI, Seeff LB. American Association for the Study of the Liver Disease. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology* 2009; 49: 1335-74.

14. Poordad F, McCone JJr, Bacon BR i sur. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 1195-206.
15. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E i sur. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 1207-17.
16. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G i sur. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 2405-16.
17. Zeuzem S, Andreone P, Pol S i sur. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 2417-28.
18. Harrington PR, Zeng W, Naeger LK. Clinical relevance of detectable but not quantifiable hepatitis C virus RNA during boceprevir or telaprevir treatment. *Hepatology* 2012; 55: 1048-57.
19. Victrelis: EPAR - Product Information, European Medicines Agency. 2011; [49 stranice]. Dostupno na URL adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002332/WC500109786.pdf Datum pristupa informaciji: 15. travanj 2013.
20. Incivo: EPAR - Product Information. European Medicines Agency. 2011; [56 stranica], Dostupno na URL adresi: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002313/WC500115529.pdf Datum pristupa informaciji: 15. travanj 2013.
21. Vince A, Duvnjak M, Kurelac I. Smjernice za liječenje kroničnog hepatitisa C genotipa 1. *Acta Medica Croatica* 2013; 67: 329-38.
22. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 299: 261-84.
23. Strahotin CS, Babich M. Hepatitis C variability, patterns of resistance, and impact on therapy. *Adv Virol* 2012; doi: 267483.
24. Moradpour D, Penin E, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 453-63.
25. Tong X, Chase R, Skelton A, Chen T, Wright-Minogue J, Malcom BA. Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* 2006; 70: 28-38.
26. Bartels DJ, DeMeyer S, Sullivan J i sur. Summary of clinical virology findings from clinical trials of telaprevir. Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, California, USA, 2011. Abstract, 1328.
27. Susser S, Welsch C, Wang Y i sur. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2009; 50: 1709-18.
28. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association of the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; 54: 1433-44.
29. Zeuzem S, Sulkowski M, Zoulim F i sur. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with telaprevir in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin: interim analysis of the Extend study (Abstract). *Hepatology* 2010; 52(Supl. 1): 436A.
30. Sherman KE, Sukowski MS, Zoulim F i sur. Follow-up of SR durability and viral resistance in patients with chronic hepatitis C treated with telaprevir-based regimens: interim analysis from the EXTEDN study. Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, San Francisco, California, USA, 2011. Abstract, 248.
31. Barnard RJ, Zeuzem S, Vierling JM i sur. Analysis of resistance-associated amino acid variants (RAVs) in non-SVR patients enrolled in a retrospective long-term follow-up analysis of boceprevir phase III clinical studies. Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, California, USA, 2011. Abstract, 164.
32. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV i sur. IFN-lambda mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4: 69-77.
33. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W i sur. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; 4: 63-8.
34. Kotenko SV. IFN- λ s. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 583-90.
35. Ge D, Fellay J, Thompson AJ i sur. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.
36. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G i sur. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-4.
37. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M i sur. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-9.
38. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P i sur. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338-45.
39. Thomas DL, Thio CL, Martin MP i sur. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801.
40. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS i sur. Interleukin-29B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; 139: 120-9.
41. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R i sur. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virological response. *Gastroenterology* 2010; 139: 821-7.
42. Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphism in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 55: 692-701.
43. Rallón NI, Soriano V, Naggie S i sur. Impact of IL28B gene polymorphisms on interferon- λ 3 plasma levels during pegylated interferon- α /ribavirin therapy for chronic hepatitis C in patients coinfecting with HIV. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1246-9.
44. Lai M, Afdhal NH. Clinical utility of interleukin-28B testing in patients with genotype 1. *Hepatology* 2012; 56: 367-72.

S U M M A R Y

RECENT DEVELOPMENTS IN SEROLOGIC AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF HEPATITIS B AND C

M. POLJAK, S. ŽIDOVEC LEPEJ¹ and O. ĐAKOVIĆ RODE¹

*School of Medicine, University of Ljubljana, Institute of Microbiology and Immunology, Ljubljana, Slovenia,
and ¹Dr. Fran Mihaljević University Hospital, Zagreb, Croatia*

The 2013 Update of the Croatian Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Viral Hepatitis summarizes recent developments in the diagnosis of hepatitis B and C. Determination of HBsAg, anti-HBc and anti-HBs is the initial step in the diagnostic workup of acute and chronic hepatitis B. Other hepatitis B serologic markers should be analyzed in the second stage of the diagnostic workup in HBsAg and/or anti-HBc positive patients. A positive anti-HBc finding should be followed by HBV DNA quantification. HBsAg quantification is complimentary to the HBV DNA quantification and is used: (i) to differentiate between inactive HBsAg carriers and active chronic HBeAg-negative hepatitis B in patients with HBV DNA <2000 IU/mL; and (ii) for treatment monitoring in patients with chronic hepatitis B receiving pegylated interferon-alpha. Real-time PCR remains the method of choice for detection and quantification of HBV DNA. The first step in HCV testing is determination of specific antibodies *via* screening assays, enzyme immunoassays or point-of-care assays. All persons with positive results of anti-HCV screening assays should be additionally tested for HCV RNA or presence of HCV viral capsid antigen. Confirmatory anti-HCV assays should be used as additional assays for confirmation of reactive results obtained by screening enzyme immunoassays in HCV RNA-negative persons only. Molecular assays with identical lower limit of detection (LLOD) and lower limit of quantification are recommended for monitoring of viral kinetics during chronic hepatitis C triple therapy. HCV resistance testing to protease inhibitors is not part of the recommended diagnostic monitoring of patients receiving triple therapy. HCV subtyping is currently not recommended as part of pretreatment diagnostic algorithm due to currently insufficient evidence on its clinical usefulness. IL-28 genotype is an important predictor of SVR in patients treated with a combination of interferon-alpha and ribavirin as well as in patients with HCV genotype 1 receiving triple therapy. IL-28B genotyping is recommended as part of pretreatment diagnostic workup in patients with chronic hepatitis C and is a particularly important parameter for recommending double *versus* triple therapy in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C.

Key words: hepatitis B, hepatitis C, diagnosis