

Dijagnostika virusnih hepatitisa

Burek V

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

Sažetak

Do početka 2008. godine poznati su slijedeći hepatitis virusi: A, B, C, D, E, G, TTV, SEN-V i NV-F. Mnogi elementi upućuju na postojanje još nekih hepatitis virusa uvjetno nazvanih nonA-nonE virusi te hipotetski F virus. Prvih su pet virusa (A,B,C,D,E) potpuno karakterizirani, a kliničke karakteristike njihove infekcije su jasno utvrđene i na njih otpada oko 85-90 % svih virusnih hepatitisa. G, TTV i SEN-V nisu u potpunosti karakterizirani, a njihova veza s kliničkim hepatitisom nije jasna. NV-F virus je nedavno otkriven (2006. godina), a F virus je oznaka za hipotetski hepatitis virus koji bi bio vezan uz fulminantni hepatitis. Egzaktna se dijagnostika virusnih hepatitisa može temeljiti jedino na dokazivanju specifičnih markera (biljega) virusnih hepatitisa, odnosno sustava antigen-antitijelo te genetskog materijala virusa. Glavni serološki dijagnostički biljezi za prvih pet hepatitis virusa su: HAV infekcija - IgM anti-HAV; HBV infekcija - HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, IgM anti-HBc, HBeAg, anti-HBe; HCV infekcija - anti-HCV; HDV infekcija - HDAg, IgM anti-HD, IgG anti-HD. Uz standardnu je dijagnostiku virusnih hepatitisa nužno voditi računa o mogućnosti okultne HBV infekcije s posebnom kombinacijom biljega. Treba imati na umu da istodobna infekcija s više virusa unutar hepatitis virusa te HIV-a i hepatitis virusa može unijeti dijagnostičku zabunu ako se na to ne misli.

Ključne riječi: Virusni hepatitisi, specifična dijagnostika, HBV, HCV, HAV, HEV, HDV

Hepatitis virusi

Do početka 2008. godine poznati su slijedeći hepatitis virusi: A, B, C, D, E, G, TTV, SEN-V i NV-F. Mnogi elementi upućuju na postojanje još nekih hepatitis virusa uvjetno nazvanih nonA-nonE virusi te hipotetski F virus. Prvih pet hepatitis virusa (A,B,C,D,E) su virusi koji su potpuno karakterizirani a kliničke karakteristike njihove infekcije su jasno utvrđene i na njih otpada oko 85-90 % svih virusnih hepatitisa

Hepatitis virusi G, TTV i SEN-V nisu u potpunosti karakterizirani a njihova veza sa kliničkim hepatitisom nije jasna. NV-F virus je nedavno otkriven (2006) i tek slijedi njegova karakterizacija i utvrđivanje veze za kliničkim hepatitisom. F virus je oznaka za hipotetski hepatitis virus koji bi bio vezan uz fulminantni hepatitis.

Dijagnoza virusnih hepatitisa

Upala jetre može biti uzrokovana virusima, nekim kemijskim supstancama te lijekovima. Kada se bolesnik prezentira s kliničkim simptomima koji su karakteristični za akutnu infekciju sa znakovima oštećenja jetre, liječnik treba tražiti rizične faktore za virusni hepatitis i poslati krv na laboratorijsku analizu. Ako rezultati analize pokažu povišene aminotransferaze nužno je razjasniti etiologiju mogućeg virusnog hepatitisa. Egzaktna se dijagnostika virusnih hepatitisa može temeljiti jedino na dokazivanju specifičnih markera (biljega) virusnih hepatitisa, odnosno sustava antigen-antitijelo te genetskog materijala virusa. Antitijela predstavljaju proteine krvi koji nastaju kao odgovor na strane proteine ili polisaharide, a u dijagnostičke svrhe dokazuju se IgM i IgG razred antitijela te ukupni IgM i IgG. Antigeni su obično proteinske komponente infekcijskog agensa koje stimuliraju produkciju antitijela. Genetski materijal hepatitis virusa može biti RNA (linearna jednolančana, cirkularna jednolančana) ili DNA (cirkularna, dvolančana).

Dijagnostika hepatitis A virusne infekcije

Uzročnik hepatitis A virusne infekcije je hepatitis A virus (HAV) – linearni, jednolančani RNA virus, bez ovojnice, koji spada u porodicu Picornavirida. Hepatitis A virusnu infekciju možemo dijagnosticirati korištenjem postupaka za dokazivanje: virusa, virusne komponente – antigena te specifičnih antitijela. Virus se može dokazati imunoelektronskom mikroskopijom, staničnom kulturom te dokazivanjem genoma HAV-a. No ova se tri postupka u praksi ne primjenjuju jer su nepraktična, slabo uspješna ili skupa. Dokazivanje specifičnog antigena (HAV Ag) se ne koristi kod individualne dijagnostike HAV infekcije nego kod određenih situacija. Naime, kod izbijanja epidemije u određenim zatvorenim kolektivima (škola, tvornica i slično) utvrđivanje HAV Ag kod onih koji ne pokazuju kliničke manifestacije dokazuje se akutni kontakt s HAV (jer njegova perzistencija traje u prosjeku

oko 10 dana, a iznimno do 6 tjedana u krvi), a primjenom se imunoglobulina može spriječiti ili ublažiti razvoj bolesti. Međutim, temelj specifične dijagnostike HAV infekcije kod individualnih osoba jest dokazivanje specifičnih antitijela. Utvrđivanjem IgG razreda antitijela na HAV (anti-HAV) dokazuje se samo kontakt s ovim virusom, a ne i vrijeme infekcije. On je osnova za imunitet, a perzistencija ovog antitijela je dugotrajna i najčešće doživotna. Registrirani su, međutim, slučajevi nestajanja ovog razreda antitijela. Bitan dokaz akutne HAV infekcije jest nalaz IgM razreda antitijela na HAV (IgM anti-HAV). On je najuvjerljiviji pojedinačni znak za dijagnozu akutne HAV infekcije. On perzistira u krvi obično oko 6 tjedana, a katkada i duže (6 mjeseci pa i do godine dana).¹ Treba voditi računa o tzv. fenomenu dugo perzistirajućeg IgM anti-HAV (koji može trajati i godinama) te se u tom slučaju ne radi o znaku akutne HAV infekcije.² Važno je ukazati i na neke probleme uz nalaz i interpretaciju IgM anti-HAV. Naime, moguć je i lažno negativan i lažno pozitivan nalaz. Lažno pozitivan nalaz IgM anti-HAV može se naći u slijedećim situacijama: kod visoke količine reumatoidnog faktora, kod hipergamaglobulinemije te kod pasivne imunizacije. Moguć je i lažno negativan nalaz IgM anti-HAV posebno kada se provodi imunosupresija (citostatici, zračenje).

Dijagnostika hepatitis B virusne infekcije

Uzročnik hepatitisa B je hepatitis B virus (HBV) – cirkularni, dvolančani DNK virus s ovojnicom koji spada u obitelj Hepadnavirida. U serumu se bolesnika s akutnom HBV infekcijom nalazi širok spektar specifičnih antigena, antitijela i DNA (tablica 1) vezanih uz hepatitis B virus. Sastav ovih markera, ovisno o vremenu proteklom od infekcije, može se mijenjati, a te promjene su odraz s jedne strane replikacije B virusa, a s druge strane imunih odgovora bolesnika. Kombinacija markera navedenih u tablici 1, koji se mogu utvrditi adekvatnim testovima (RIA, ELISA, PCR), može pomoći ne samo u utvrđivanju etiološke dijagnoze HBV infekcije već u velikoj mjeri ukazati na stadije akutne infekcije, stupanj infektivnosti te progresiju prema ozdravljenju ili kronicitetu.

Tablica 1. Serološki biljezi HBV infekcije

ANTIGENI	ANTITIJELA	GENETSKI MATERIJAL
HbsAg	Anti-HBs	HBV DNA
HbcAg	Anti-HBc IgM anti-HBc	
HbeAg	Anti-Hbe	
Pre-S1	Anti pre-S1	
Pre-S2	Anti pre-S2	
pHSA	Anti-pHSA	
HBx	Anti-HBx	

Pojedini dijelovi hepatitis B virusne čestice (HBsAg-hepatitis B površinski antigen, HBeAg – hepatitis B rani antigen) mogu se u čistoj formi nalaziti u krvi inficirane osobe gdje ih je moguće detektirati. Njihova prisutnost i njihova dinamika je važan element dijagnostike HBV infekcije.

HBsAg je kompleksni protein od 27 kD koji je lociran na površini HBV čestice. HBsAg je po redoslijedu prvi serološki biljeg HBV infekcije.³ Nakon ulaska HBV u organizam postoji inkubacijski period od 6 – 8 tjedana do pojave kliničkih simptoma.⁴ Dužina ovog perioda ovisi o veličini inokuluma i faktorima domaćina. U ovom periodu u oko 10% bolesnika registrira se prodromalna faza s flu-like simptomima. Ovu fazu prati prva pojava HBsAg i vjeruje se da su artralgijske i osip, koji se katkada javljaju u ovoj fazi, u vezi sa stvaranjem kompleksa HBsAg i anti-HBs. Pojava HbsAg uz opisane moguće simptome prodromalne faze događa se prije porasta transaminaza i ostalih elemenata vezanih uz oštećenje hepatocita. Od prve pojave HBsAg u serumu njegov titar raste i doseže maksimum negdje početkom kliničkih simptoma i kratko nakon početnog porasta transaminaza. Kroz akutnu fazu bolesti HBsAg perzistira na tom visokom nivou kraće vrijeme (par tjedana) da bi zatim kontinuirano padao i krajem akutne faze bio eliminiran. U akutne HBV infekcije nekompliciranog tijeka (eliminacija HbsAg unutar 6 mjeseci) ukupno trajanje HBsAg pozitiviteta je vrlo varijabilno i iznosi od par tjedana do oko tri mjeseca. Međutim, postoje i velika odstupanja u individualnim slučajevima. Perzistencija se HbsAg može skratiti na svega par dana, a u 10% bolesnika tijekom imunih zbivanja je ubrzan i oni dolaze s već eliminiranim HBsAg.⁵ O ovoj varijanti akutne HBV infekcije (tzv HbsAg negativna akutna HBV infekcija) treba voditi računa jer su moguće greške u dijagnozi. Brz i jednostavan način utvrđivanja ove varijante akutne HBV infekcije je nalaz IgM razreda anti-HBc (IgM anti-HBc). Današnje su metode detekcije HBsAg vrlo senzitivne i mogu registrirati male količine ovog antigena. Treba imati na umu da je detektibilni nivo HbsAg (a time indirektno i HBV-a) ispod njegove infektivne doze. To objašnjava zabilježene slučajeve akutne posttransfuzijske HBV infekcije s HBsAg negativnom krvlju

davateljem. U nekim je takvim slučajevima ukoncentriravanjem seruma nađen HBsAg. U kroničnoj HBV infekciji, bilo da se radi o "asimptomatskom" kroničnom HBsAg nositelju ili bolesniku s kliničkim znakovima bolesti, HbsAg je kontinuirano prisutan. Uz HBsAg se u takvih osoba od ostalih markera najčešće nalazi anti-HBc IgG razreda. U određenom postotku (oko 5-8 %) kroničnih HbsAg nositelja dolazi do spontane eliminacije HBsAg kada se uz prethodno prisutan anti-HBc može pojaviti i anti-HBs.

HBeAg (hepatitis B e antigen) je nestrukturani protein veličine 16 kD lociran uz nukleokapsidu HBV čestice. HBeAg se javlja u isto vrijeme kada i HBsAg ili vrlo brzo nakon njega - dakle prije pojave kliničkih simptoma.^{6,7} On se smatra važnim biljegom koji ukazuje na replikaciju HBV-a, visinu infektivnosti te važnim prognostičkim elementom.⁸ Što je viši titar HBeAg viši je i titar HBsAg. U akutnoj HBV infekciji nekompliciranog tijeka (gdje dolazi do eliminacije HBsAg) nestanak HBeAg iz cirkulacije uvijek prethodi ili ide do eliminacije HBsAg. Dakle, nema pojave HBeAg bez istodobne prisutnosti HBsAg, a njegova je perzistencija u pravilu kraća od HbsAg i iznosi oko 1-2 mjeseca. U kroničnoj HBV infekciji uz kontinuiranu prisutnost HBsAg (kronični nositelji) HBeAg može biti eliminiran (što je prognostički povoljan znak), ali može i perzistirati paralelno s HbsAg što prognostički ukazuje na veću vjerojatnost razvoja kroničnih sekvela.

Pre-S-1 i Pre-S-2 antigeni se nalaze na istaknutim mjestima vanjske ovojnice hepatitis B virusa. U uskoj su vezi s HBsAg i vjeruje se da igraju važnu ulogu, u suradnji s polimeriziranim humanim serumskim albuminom (pHSA), u procesu ulaska virusa u hepatocit kao specifični receptori za hepatocite.^{9,10} Oni se, kod nekomplicirane HBV infekcije, pojavljuju u perifernoj krvi veoma rano i prisutni su kod dolaska u bolnicu u oko 90-95 % slučajeva. Njihova je perzistencija kratka - oko dva mjeseca. U kroničnoj HBV infekciji (kronični HBsAg nosioci) oni perzistiraju ili kontinuirano ili kroz ograničeni duži period, a pritom je važan HBeAg status. Naime, perzistencija Pre-S je češća uz istodobni HBeAg pozitivitet, dok se eliminacijom HBeAg i pojavom anti-HBe smanjuje prisutnost ovih antigena.

HbcAg je vezan uz jezgru HBV-a. Ovaj antigen se ne može direktno dokazati u serumu zato jer je obavijen HBsAg. Svaki neobloženi HbcAg reagirati će sa svojim specifičnim antitijelom (anti-HBc) čime se blokira njegova detekcija. Premda se određenim postupcima ovakav HbcAg iz seruma može izdvojiti u čistoj formi i dokazati, to za praktične dijagnostičke svrhe nema potrebe.

Hepatitis Bx (HBx) protein je protein HBV čestice¹¹ čija funkcija u infekciji ljudi (ali i životinja) nije razjašnjena. Većina podataka o ovom HBV antigenu dobivena je pri analizi HBV replikacije u kulturi stanica. O funkciji ovog antigena postoji više hipoteza, među ostalim i ona o njegovom onkogenom potencijalu, odnosno o tome da bi on mogao doprinijeti indirektno razvoju hepatocelularnog karcinoma (HCC).^{12,13}

Nakon ulaska hepatitis B virusa u organizam i kontakta virusa, odnosno njegovih strukturnih komponenti s imunim sustavom domaćina, dolazi do kompleksnog procesa koji rezultira stvaranjem antitijela usmjerenih na antigene komponente HBV, odnosno do stvaranja specifičnih antitijela. Uloga ovih antitijela u obrani domaćina je različita i važna u dijagnostici HBV infekcije.

Antitijelo na HBcAg (anti-HBc) je svakako najistaknutiji serološki marker izloženosti hepatitis B virusu. Naime, HBsAg može perzistirati vrlo kratko te je u otprilike 10% oboljelih već eliminiran pri prvom dolasku na pregled, dok je za prvu pojavu anti-HBs potrebno katkada i više mjeseci od početka bolesti. Slično je i s HBeAg/ anti-Hbe sustavom. HBcAg je vrlo imunogen. Rezultat je toga visoki titar ovog antitijela što je grubo proporcionalno replikaciji HBV-a. Anti-HBc se javlja vrlo rano tijekom akutne infekcije, ubrzo nakon pojave HBsAg, ali prije porasta transaminaza. Prisutan je kroz čitav period bolesti i ozdravljenja.¹⁴ Uzimajući u obzir sva antitijela na HBV antigene, perzistencija anti-HBc je u principu najduža i često perzistira i nakon eliminacije anti-HBs. Anti-HBc ima posebnu ulogu u detekciji HBV infekcije jer izolirani nalaz ovog antitijela ne treba značiti uspješan susret s HBV odnosno eliminaciju HbsAg i prestanak prisustva anti-HBs. Dakle, izolirani nalaz anti-HBc može ukazivati na prisutnost HbsAg (odnosno HBV) u količini koja je ispod detektabilnih, čime se dijelom mogu objasniti neki slučajevi posttransfuzijskog hepatitisa B.

IgM je razred antitijela na HBcAg (IgM anti-HBc) vrlo koristan u diferencijalnoj dijagnostici akutne HBV infekcije. Pojavljuje se ubrzo nakon HBsAg i paralelno s porastom transaminaza, traje više mjeseci (i do 12 mjeseci). Njegov nalaz je vrlo siguran znak akutne B infekcije.^{15,16} U izvjesnim slučajevima, međutim, pozitivan IgM anti-HBc se može naći i u kroničnoj infekciji o čemu treba voditi računa kod dijagnostike akutne HBV infekcije. Pozitivan nalaz IgM anti-HBc nije apsolutni dokaz akutne HBV infekcije premda s velikom vjerojatnošću upućuje na akutnu infekciju. Pozitivan nalaz IgM anti-HBc ima svoju 100% vrijednost kod HBsAg negativne akutne HBV infekcije kada je HBsAg eliminiran i negativan je pri prvom određivanju, a prisutno je samo anti-HBc, dok anti-HBs može ali i

ne treba biti još prisutno. Isti značaj u diferencijalnoj dijagnozi ima ovo antitijelo kad ga nalazimo u periodu kada je HBsAg već eliminiran, a anti-HBs se još nije pojavilo (fenomen prozora). Uz ove spomenute izuzetke, pozitivan nalaz IgM anti-HBc potvrđuje akutnu HBV infekciju. Negativan nalaz IgM anti-HBc u akutnog hepatitisa, uz nalaz HbsAg ili bez njega, jasno isključuje akutnu HBV infekciju i upućuje na virusni hepatitis druge etiologije – npr. HDV ili HCV.

Pojava anti-HBs u serumu označava tipično fazu ozdravljenja, odnosno rekonvalescencije u slučajevima akutne HBV infekcije nekompliciranog tijeka, odnosno samoograničavajuću bolest. Anti-HBs je najistaknutije antitijelo koje se nalazi u rekonvalescenciji (te kod cijepljenih osoba). Uobičajeno je da se u bolesnika koji ozdravljaju od akutnog hepatitisa B anti-HBs javlja neko vrijeme nakon nestanka HBsAg.¹⁷ Period između nestanka HBsAg i pojave anti-HBs obično traje nekoliko dana do nekoliko mjeseci i naziva se "core window" jer se od markera na HBV infekciju tada može detektirati samo antitijelo na HBcAg, odnosno anti-HBc.¹⁸ Pojava anti-HBs znači ozdravljenje i stjecanje u principu doživotnog imuniteta na reinfekciju s hepatitis B virusom. Izuzetak od ovoga su različiti oblici imunodeficijencije, odnosno infekcija mutantnim oblikom HBV s promijenjenim epitopom na koji je usmjereno stvoreno anti-HBs. Ovakva uobičajena dinamika pojave anti-HBs neko vrijeme nakon eliminacije HbsAg u pojedinim slučajevima može biti i drugačija te dovesti do teškoća u interpretaciji nalaza, ako se na to ne misli. Naime, premda se anti-HBs uobičajeno pojavljuje nakon nestanka HbsAg, ono se može pojaviti i neko vrijeme prije eliminacije HBsAg, pa čak biti prisutno od samog početka bolesti i perzistirati zajedno s HBsAg do njegove eliminacije. Dakle, iako je prisutnost anti-HBs znak rekonvalescencije i stjecanja imuniteta, ono se može registrirati paralelno s HBsAg u doba visoke infektivnosti u početku akutne HBV infekcije.^{19,20} Sličnu je simultanu pojavu anti-HBs i HBsAg moguće katkad registrirati i u kroničnih nositelja HBsAg. Anti-HBs se registrira i nakon uspješne vakcinacije HBV vakcinom, ali pritom nisu prisutna ostala antitijela tipična za HBV infekciju (anti-HBc, anti-HBe, anti-Pre-s). Odgovor na vakcinu može biti varijabilan. Premda većina cijepljenih odgovara s relativno visokim titrom antitijela (normoresponderi), postoji manji dio onih koji odgovaraju sa slabom produkcijom antitijela (hiporesponderi) ili uopće ne stvaraju antitijela (nonresponderi). Perzistencija antitijela u onih koji su stvorili dovoljnu količinu antitijela većinom traje duže od 5 - 10 (i više) godina. Postoje i osobe s relativno brzim nestajanjem antitijela. Perzistencija anti-HBs je u pravilu kraća od anti-HBc. Ima slučajeva i duže perzistencije anti-HBs. Titar je anti-HBs nakon prirodne infekcije obično viši nego vakcinom inducirane produkcije, a i njegova je perzistencija obično duža.

Antitijelo na HBe (anti-HBe) pokazuje otprilike sličnu dinamiku kao i anti-HBs. Ono se obično javlja neko vrijeme nakon eliminacije HBeAg, ali i neko vrijeme prije eliminacije HBeAg, odnosno simultano s njim.²¹ Titar ovog antitijela je obično niži od anti-HBc i anti-HBs, a perzistencija kraća premda se može naići na iznimke od tog pravila

HBeAg/anti-HBe sustav markera ima posebno mjesto, ne toliko u dijagnostičkom koliko u prognostičkom smislu. Prisutnost HBeAg (s izuzetkom u početku akutne HBV infekcije nekompliciranog tijeka) je uvijek nepovoljan znak – on je marker replikacije virusa i znak visoke infektivnosti. Kronični nosilac HbsAg ima veću šansu odlaska u kronične sekvele ako je ujedno i HBeAg pozitivan. U istim okolnostima, ako je riječ o trudnici, perinatalni je prijenos češći i opterećen razvojem kronične infekcije djeteta.^{22,23} Dijagnostička interpretacija sustava HBeAg/anti-HBe dobila je posebno na značenju nakon identifikacije HBV mutanata.^{24,25} Pokazalo se da postoje mutantni oblici HBV u kojih DNA ima pojedinačnu promjenu jednog para baza na poziciji 1896 u tzv pre-core regiji. Krajnja je posljedica toga nemogućnost sinteze i produkcije HBeAg. Pokazalo se da osobe inficirane takvim mutantnim oblikom HBV mogu imati veću količinu HBV DNA u krvi, teži oblik kliničkog hepatitisa i češću pojavu fulminantne bolesti.^{26,27} U svjetlu toga precizna detekcija HBeAg i anti-HBe je važan element ukupne dijagnostike HBV infekcije.

Antitijela na pre-S1, pre-S2 i pHSa se javljaju rano tijekom infekcije. Kakav je značaj u njihovu određivanju ostaje zasada nejasno. Naime, unatoč očekivanjima da će detekcija ovih antitijela pružiti nove dijagnostičke informacije u obradi bolesnika to se, barem dosada, nije ostvarilo.

Antitijela se na HBxAg mogu registrirati u serumu bolesnika s HBV infekcijom samo eksperimentalnim postupcima.²⁸ Premda se iznosi mišljenje da su antitijela na HBxAg povezana s kroničnom bolešću i hepatocelularnim karcinomom, zasada nije uočena prava svrha u dijagnozi i prognozi HBV infekcije.^{12,13,28}

Tablica 2. Uobičajena konstelacija HBV biljega i njihova interpretacija.

Biljezi HBV infekcije						Interpretacija
HBsAg	IgM anti-HBc	Anti-HBc	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	
+	+	-/+	-	-/+	-/+	Akutna infekcija
+	-	+	-	-/+	-/+	Kronična infekcija
-	-	+	+	-	-/+	Prošla infekcija
-	-	-	+	-	-	Vakcinacija

Vrijednost nukleinske kiseline HBV (HBV DNA) u serumu predstavlja važan dio serološkog profila hepatitis B virusne infekcije i najizravnija je mjera HBV i njegove replikacije. Tehnike koje se pritom primjenjuju spadaju u najspecifičnije i najsenzitivnije postupke molekularne biologije. HBV DNA se u serumu bolesnika može detektirati prije početka akutnog hepatitisa B i prije porasta ALT 7-14 dana nakon ekspozicije.²⁹ Njegov nivo brzo opada kada ALT dosegne svoj maksimum ili blizu toga i kada se pojavi anti-HBe.^{30,31} Slične promjene HBV DNA i ALT se događaju u kroničnih bolesnika koji se tretiraju alfa interferonom. Korištenjem vrlo senzitivnih PCR postupaka HBV DNA obično ostaje detektibilna u serumu paralelno s HBsAg, a u određenim slučajevima i nakon njegova nestanka.³² Određivanje HBV DNA je važno u rasvjetljavanju nekih nejasnih imunopatogenetskih mehanizama HBV bolesti te posebno za procjenu odgovora na antivirusnu terapiju. U akutnoj HBV infekciji, s obzirom na visoku koncentraciju specifičnih antigena i antitijela, dobro provedena analiza sustava antigen/antitijelo i na taj način dobiveni profili ovih specifičnih markera pružaju dovoljno dijagnostičkih i prognostičkih informacija. Određivanje HBV DNA ostaje za određene, gore navedene specifične situacije. Vjerovalo se da sve osobe koje ozdrave od akutne B infekcije postaju negativne na HBV DNA, no pokazalo se da to nije uvijek slučaj (okultna infekcija). U kroničnoj HBV infekciji gotovo svi bolesnici koji su HBsAg/HBeAg pozitivni ujedno su i pozitivni na HBV DNA u serumu, dok je u onih koji su HBsAg/anti-HBe pozitivni, HBV DNA nađen u oko 65%.

Prema definiciji okultnu HBV infekciju karakterizira prisutnost HBV DNA u krvi bez detektibilnog HBsAg. Najčešći razlozi okultne HBV infekcije su: (1) nereplikativna ili slabo replikativna faza HBV infekcije, (2) mutacije, (3) virusna interferencija, (4) perzistencija nakon ozdravljenja.

Uz gore opisanu uobičajenu dinamiku i interpretaciju HBV markera opisani su slučajevi bolesnika s konstelacijom HBV markera koja ukazuje na serološki dokaz ozdravljenja (odnosno HBsAg negativan; anti-HBc i anti-HBs pozitivan). U takvih se osoba katkada može naći i HBV DNA u jetri i/ili serumu. Takvi su bolesnici HBsAg negativni i najčešće samo anti-HBc pozitivni. Rjeđe je prisutan i anti-HBs ili oba antitijela, ali pokazuju znakove oboljenja jetre koji su indikativni za kontinuirano hepatocelularno oštećenje zbog perzistentne HBV infekcije.³³⁻³⁹ Ima podataka koji govore da ovakva dugotrajna perzistencija genoma virusa ukazuje na kontinuiranu replikaciju virusa koji se može prenijeti na uobičajeni način na drugu osobu.⁴⁰⁻⁴³ U prilog tome govori i podatak o reaktivaciji HBV infekcije u bolesnika sa serološkim dokazom ozdravljenja koji su bili podvrgnuti imunosupresivima ili kemoterapiji. Navedeni podaci ukazuju da bolesnici sa serološkim dokazom ozdravljenja možda imaju niski nivo replikacije virusa koji je efikasno kontroliran aktivnim imunološkim odgovorom.^{41,43-45} Opisani su slučajevi HBV DNA pozitivnosti uz HBsAg negativnost te raznih kombinacija antitijela uključujući i onu kada su oba antitijela negativna (tablica 3).

Tablica 3. Konstelacija anti-HBs i anti-HBc u okultnoj HBV infekciji.

Anti-HBc +	Anti-HBe +
Anti-HBc +	
Anti-HBs +	
Anti-HBc +	Anti-HBs +
Anti-HBc -	Anti-HBs -

Dijagnostika hepatitis C virusne infekcije

Uzročnik hepatitisa C je hepatitis C virus (HCV) – linearni, jednolančani RNK virus s ovojnicom koji pripada obitelji Flavivirida. Za razliku od akutne hepatitis B virusne infekcije koja se klinički i biokemijski jasno manifestira u oko 25-50% slučajeva, akutna se hepatitis C virusna infekcija klinički manifestna samo u oko 10% slučajeva. Ogromna većina kontakata s HCV ostaje neprepoznata. Za razliku od hepatitis B virusa koji se spontano eliminira u oko 90 - 95 % inficiranih, spontana se eliminacija HCV odvija u samo oko 15% slučajeva. Ostalih 85% inficiranih ide prema kroničnim

sekvelama različitim tempom.¹⁻¹⁰ Ovo kronično nosilaštvo HCV, odnosno kronična HCV infekcija klinički se ili uopće ne manifestira ili tek s blagim znakovima bolesti. Tek se nakon više godina ili desetljeća javljaju znakovi bolesti koji odvođe inficiranog liječniku. Posljedica takvog prirodnog tijeka HCV infekcije jest da se najveći dio inficiranih registrira u kroničnoj fazi - kada bolest postaje simptomatska. Neki se dijagnosticiraju slučajno u sklopu šire dijagnostičke obrade, a daleko najmanji broj se registrira u fazi akutne HCV infekcije.

Slično se kao u HBV infekciji, nakon ulaska HCV u organizam i njegove replikacije te reakcije imunog sustava na HCV, odnosno njegove antigene u serumu bolesnika, mogu naći genetski materijal virusa, njegovi antigeni te antitijela usmjerena na antigene komponente HCV. Budući da je koncentracija HCV antigena u serumu vrlo niska, za praktičnu dijagnozu sve do prije kratkog vremena nije bilo moguće njegovo određivanje. Praktična se specifična dijagnostika HCV infekcije temeljila na dva markera HCV infekcije: antitijelo na HCV (anti-HCV) i genetski materijal virusa (HCV RNA). Klinički simptomi i znakovi, rezultati biokemijskih laboratorijskih testova te histologija jetre akutnog C hepatitisa slične onima u drugih oblika akutnih virusnih hepatitisa. Bolest se može dijagnosticirati samo na temelju seroloških i/ili virusoloških testiranja.^{46,56}

Antitijela usmjerena na različite antigene HCV (anti-HCV) su gotovo uvijek prisutna u kroničnoj HCV infekciji. Navodi se da tek u oko 5-10% slučajeva nema odgovora antitijela na antigene HCV (barem one koji se nalaze u test sistemu).^{50-55,57} Premda se ELISA testovima zadnje generacije antitijela na HCV mogu naći do dva i pol mjeseca nakon ulaska HCV u organizam, može proći i više mjeseci do njihova pojavljivanja.^{46-50,58-61} Pozitivni je rezultat ELISA testiranja posljedica postojanja u serumu antitijela na različite komponente HCV. Taj je pozitivitet rezultat zbirnog dokazivanja različitih antitijela i kod pozitivne ELISE ne zna se o kojim je konkretno antitijelima riječ, odnosno koja su od ovih antitijela usmjerena na koje antigene komponente HCV. Budući su i kod najosjetljivijih ELISA tehnika mogući i lažno pozitivni rezultati zbog prisutnosti nespecifičnih faktora (ali i zbog niza drugih razloga) nužno je, uvjetno rečeno pozitivnu ELISU retestirati i ukoliko je ona ponovljeno pozitivna potvrditi korištenjem tzv. potvrdnih testova. Perzistencija anti-HCV je obično dugotrajna (desetljeća, a možda i doživotno), ali to ne vrijedi za sva anti-HCV antitijela. Koncentracija se nekih antitijela može smanjiti pa i nestati, dok su neka druga dugo, možda i trajno prisutna.⁵⁰⁻⁵⁵

Najčešće korišten potvrdni test za dokazivanje antitijela na antigene komponente HCV je western blot te imunoblot. Ovim je tehnikama moguće individualizirati određeno antitijelo usmjereno na za njega specifičan antigen. Analizom dinamike ovako utvrđenih individualnih antitijela moguće je registrirati njihovu prvu pojavu, trajanje i nestajanje. Najčešće se antigene komponente na koje se traže antitijela zbirno - kod ELISE i individualno kod potvrdnih testova navedene u tablici 4.

Tablica 4. Antigene komponente HCV na koje se testiraju antitijela kod HCV infekcije u test sistemima ELISE i westernblota odnosno imunoblota.

ELISA	IMMUNOBLOT/WESTERNBLOT	
c100-3	c22	C1
c22-3	5-1-1	C2
c200	c100	
NS3	c33c	
NS4	NS3	
NS5	NS4	
	NS5	

Nalaz antitijela na HCV (anti-HCV) je nedvojbeni dokaz kontakta s HCV. Budući da oko 15% osoba inficiranih s HCV dolazi do spontane eliminacije ovog virusa, nalaz antitijela ne znači samo infekciju nego uspješan oporavak od HCV infekcije. Za potvrdu postojanja HCV infekcije je nužno dokazivanje HCV virusa, odnosno njegovog genetskog materijala - HCV RNA.

Genetski se materijal hepatitis C virusa HCV RNA javlja rano tijekom HCV infekcije, oko 15-tog dana od ulaska virusa u organizam.⁵² Prisutan je u organizmu tijekom akutne i kronične infekcije⁵⁰⁻⁵² i jasan je dokaz HCV infekcije. Vrlo se senzitivni testovi za dokazivanje HCV RNA temeljeni na tehnici lančane reakcije polimeraze ili nekim drugim amplifikacijskim tehnikama nukleinske kiseline mogu koristiti tijekom tzv. window perioda, odnosno prije pojave antitijela čime se dokazuje akutna HCV infekcija. Titar genoma HCV može fluktuirati u velikoj mjeri. Opisano je više slučajeva da u početku akutne, ali i tijekom kronične HCV infekcije, titar može biti intermitentno negativan i dovesti do dijagnostičkih zabuna.^{50-52,62-65} Treba nadalje napomenuti da, premda su ovi testovi raspoloživi

komercijalno, neki od njih nisu i licencirani u pojedinim zemljama. Izvođenje, senzitivnost, specifičnost i reproduktibilnost svakog pojedinog testa još nije standardizirana. Rezultat toga je i dobro dokumentirano iskustvo da je ovaj postupak opterećen lažno pozitivnim rezultatima o čemu treba voditi računa. Pored kvalitativnih testova za dokazivanje HCV RNA, razvijeni su i kvantitativni testovi kojim se utvrđuje broj virusnih čestica (viral load) u serumu. Ovi kvantitativni testovi pokazali su se veoma korisnim tijekom praćenja količine virusa u bolesnika koji su pod terapijom. Njima se određuje količina virusa prije i u određeno vrijeme nakon terapije radi prosudbe o uspješnosti terapije.⁶⁶

Određivanje genotipa HCV se pokazalo veoma korisnim u predviđanjima ishoda terapije. Različiti genotipovi različito reagiraju na terapiju, odnosno dužina davanja terapije se razlikuje.⁶⁷⁻⁷¹ Najpovoljniji su genotipovi 2 i 3a. Jedna analiza genotipova provedena u zadnje vrijeme među intravenskim korisnicima droge u Hrvatskoj pokazuje najveću zastupljenost 3a genotipa (tablica 5.)

Tablica 5. Učestalost HCV genotipova u populaciji IV korisnika droge u Hrvatskoj.

Genotip	%
1	4,2
1a	16,7
1b	25,0
3a	50,0
4	4,2

Kao što je dijagnoza akutne HCV infekcije vrlo teška jer kontakt s virusom registrira tek mali broj osoba (oko 10%), većina ih ne dolazi zbog toga svom liječniku. Detekcija HCV RNA, odnosno anti-HCV u relativno maloj mjeri može koristiti u dijagnozi akutne HCV infekcije. Naime, pozitivan nalaz HCV RNA uz prisutnost anti-HCV ne govori da li je HCV ušao u organizam nedavno ili prije više vremena. Ako postoji pritom klinička simptomatologija, ona se može vezati uz neki od poznatih, ali i neki nepoznati (a pretpostavlja se da takvi postoje) hepatitis virus. Nalaz HCV RNA bez anti-HCV uz kliničku simptomatologiju ukazuje na akutnu infekciju. Broj je tako detektirane akutne HCV infekcije teoretski izrazito mali zbog već navedenih razloga. Treba ponoviti da u početku akutne HCV infekcije HCV RNA može biti i negativan. Pozitivan nalaz antitijela na- HCV također u principu ne govori o vremenu ulaska HCV u organizam, odnosno o akutnoj infekciji. Samo su dva slučaja kada nam analiza anti-HCV daje jasan dokaz za akutnu HCV infekciju. Prvi slučaj je serokonverzija bolesnika u kojega se sumnja na akutnu HCV infekciju jer je prvi (ili nekoliko prvih) seruma negativan na anti-HCV, a kasnije postaje pozitivan što je jasan znak akutne infekcije.^{51-54,62-65,71} Druga je situacija tzv. evolucija imunog odgovora. Budući da se antitijela na pojedine antigene komponente HCV ne javljaju istodobno, već postoji određeni redoslijed, tada pojava jednog (ili dva) antitijela na početku bolesti te pojava više njih kroz slijedeće dane ili tjedne jasno ukazuje na akutnu HCV infekciju. Spomenute su situacije u kojima nalaz HCV RNA i detekcija anti-HCV može služiti za dijagnozu akutne HCV infekcije zapravo rijetke i iz takvih okolnosti registrira se mali broj akutne HCV infekcije. Sve je to bio razlog za traženjem dodatnih markera akutne HCV infekcije.

Analogno ulozi IgM razreda antitijela kao jasnog znaka akutne bolesti u bolesnika s HAV, HBV i HDV infekcijom, smatralo se da bi nalaz IgM anti-HCV mogao koristiti u istom smislu u HCV infekciji. IgM anti-HCV doista se nalazi praktički u 100 % slučajeva akutne HCV infekcije, ali i u ogromnom postotku (preko 80 %) i u bolesnika s kroničnom HCV infekcijom. Time je on isključen kao marker akutne HCV infekcije.⁷²⁻⁷⁴ On se koristi kao dobar element za procjenu efikasnosti terapije HCV infekcije te za razlikovanje da li se u transplantiranoj jetri radi o reinfekciji s HCV ili o reakciji odbacivanja transplantata.

Dugo su trajali pokušaji dobivanja praktičnog testa za dokazivanje hepatitis C virusnog antigena - HCVAg. Vjerovalo se da bi njegovim utvrđivanjem i praćenjem njegove dinamike, analogno HBsAg u HBV infekcije dobio iskoristivi marker akutne HCV infekcije. Prije par godina je razvijen ELISA postupak za dokazivanje tzv. slobodnog⁷⁵⁻⁸⁰ i vezanog HCVAg.^{78,79,81-84} U prvom je slučaju moguće detektirati HCVAg u ranoj fazi akutne HCV infekcije kada još ne postoji slobodno antitijelo i pratiti njegovu dinamiku koja traje oko dva mjeseca.^{79,82} On se javlja rano, gotovo istodobno s HCV RNA (u prosjeku jedan dan kasnije - oko 14 dana od ulaska HCV u organizam) i s obzirom da perzistira ograničeno vrijeme i ima jasnu dinamiku, moguće je dokazati akutnu HCV infekciju. U drugom je slučaju dokazivanja vezanog HCVAg (odnosno kompleksa HCVAg/anti-HCV) moguće upotrebom monoklonalnih antitijela utvrditi HCVAg koji je vezan uz anti-HCV i kvantitativno ga odrediti.⁸¹⁻⁸⁴ Određenim se postupkom razbija veza antigen-antitijelo i zatim se sam antigen određuje

standardnim imunim postupkom. Postoji dobra kvantitativna korelacija između HCVAg i HCV RNA kod nižih, viših i visokih vrijednosti, ali je slabija u izrazito niskim vrijednostima virusa.⁸¹ Ovaj bi test mogao poslužiti u više situacija HCV infekcije: u akutnoj HCV infekcije, u anti-HCV pozitivnim osobama (da se utvrdi da li je HCV eliminiran ili nije), prilikom utvrđivanja nivoa HCV prije početka terapije i tijekom terapije kako bi se pratila efikasnost terapije, ako terapije nije uspjela, odnosno relapse.⁸⁶

Dijagnostika hepatitis D virusne infekcije.

Uzročnik hepatitis D virusne infekcije je hepatitis D virus (HDV) – cirkularni, jednolančani RNA virus s ovojnicom, zasada bez jasne klasifikacije. Hepatitis delta virus (HDV) je defektan virus i može pokazati svoje patološko djelovanje jedino uz hepatitis B virus. Delta infekcija može ići kao koinfekcija s HBV kada u isto vrijeme ulaze u organizam HBV i HCV i kao superinfekcija kada na podlozi postojeće HBV infekcije (kronično nosilaštvo HBsAg) dolazi HDV. Posljedice HDV/HBV superinfekcije su puno opasnije od koinfekcije. Dijagnostika HDV infekcije je moguća kao i kod drugih virusa: identifikacijom virusa, dokazivanjem antigena i dokazivanjem antitijela. U praksi se najčešće koristi ELISA tehnika za dokazivanje antigena (HDAg) i antitijela IgM i IgG razreda.⁸⁷⁻⁸⁹

HDAg se nalazi obično u ranim fazama infekcije (koinfekcija, superinfekcija) premda se često i ne registrira. Akutnu infekciju karakterizira kratkotrajna pojava IgM razreda antitijela nakon čega slijedi pojava IgG razreda. Kroničnu infekciju karakterizira visoki nivo IgG anti-HD.

U dijagnostici HDV infekcije posebno treba upozoriti na efekt interakcije HDV na HBV. HDV može djelovati supresivno na genetske produkte HBV tijekom akutne faze delta infekcije. U kroničnog nositelja HBsAg (koji često nemaju kliničkih znakova bolesti) HDV može suprimirati produkciju HBsAg tako da se njen nivo u krvi smanjuje, a istovremeno se može, prolazno, pojaviti i anti-HBs. Dakle, ako se ne misli na HDV infekciju (u ovom slučaju superinfekciju), dinamika HBsAg i anti-HBs podsjećaju na akutnu HBV infekciju što dovodi do krive dijagnoze.

Opisani su i rijetki slučajevi paradoksalne situacije u kojoj HBsAg biva trajno eliminiran s trajnom pojavom anti-HBs. Superinfekcija s HDV dovede do trajne eliminacije HBsAg čime prestaje stanje kroničnog nosilaštva. Opisana standardna dinamika HDV markera može u nekim specifičnim uvjetima biti promijenjena. Na primjer, u AIDS bolesnika (zbog imunosupresije izazvane HIV-om) produkcija antitijela je slaba ili se uopće ne registrira, dok je HD antigenemija izrazita i perzistentna jer nema antitijela da ih blokira. Na tablici 6 prikazana je kombinacija HBV i HDV biljega i njihova interpretacija.

Tablica 6. Kombinacija HBV i HDV biljega i njihova interpretacija.

HBsAg	anti-HBs	HDAg	anti-HD	IgM anti-HD	Interpretacija
-	+	-	+	-	Riješena HBV/HDV infekcija
+	-	+	-	-	Akutni D hepatitis – rana faza
+	-	-	-	+	Akutni D hepatitis
+	-	-	+	+	Kasni D hepatitis Kronični D hepatitis
+	-	-	+	-	Riješena ili inaktivna HDV infekcija kod HBsAg nosioca

Dijagnostika hepatitis E virusne infekcije

Uzročnik hepatitis E virusne infekcije je hepatitis E virus (HEV) – linearni, jednolančani RNA virus bez ovojnice, za sada bez jasne klasifikacije. Premda se u početku smatralo da je HEV infekcija ograničena na određene regije svijeta (Južna Amerika, Indija) infekcija HEV-om se registrira i u drugdje, a da to nije povezano s putovanjima u te krajeve niti kontaktom s osobama iz tih krajeva.

HEV infekcija se javlja u dva oblika, kao epidemijska i kao sporadična infekcija. Epidemijski se HEV infekcija javlja primarno u zemljama u razvoju (Indija, Nepal, Burma, Kina, Afrika, Meksiko). Sporadična se HEV infekcija javlja primarno u razvijenim zemljama i to obično među putnicima koji su dobili infekciju u endemičnim područjima. U zadnjih se nekoliko godina registrira više slučajeva (uključujući našu zemlju) bolesti u osoba koje nisu nikada putovale u spomenute endemske krajeve

nit su bile u kontaktu s osobama koje su iz tih krajeva došle. Virus se može prenositi među ljudima, ali HEV infekcija je i zoonoza.

Klinički je infekcija hepatitis E virusom samoograničavajuća akutna bolest koja slični hepatitisu A, ali ju karakterizira visoka smrtnost među trudnicama. Kao i u drugih hepatitis virusa dijagnoza se postavlja utvrđivanjem virusa (imunoelektronska mikroskopija), utvrđivanjem genetskog materijala virusa i utvrđivanjem antitijela na HEV (anti-HEV IgM i IgG razreda). Ovaj zadnji postupak je onaj koji se u praksi provodi i to tehnikom ELISA-e ili Western blotom.⁹⁰⁻⁹³

Dijagnostika hepatitis G virusne infekcije

Nije poznat pravi klinički značaj infekcije ovim virusom. U više od 70% slučajeva HGV infekcija nije praćena s hepatocelularnim oštećenjem, a u dodatnih 16% se registrira samo minimalan porast transaminaza. Uz mogućnost detekcije HGV infekcije utvrđivanjem genetskog materijala, dijagnostika se pretežno temelji na utvrđivanju antitijela na E2 protein. Budući se ovo antitijelo rijetko nalazi istovremeno s virusnom RNA, smatra se da su ova dijagnostička antitijela ujedno i visoko neutralizirajuća.⁹⁴⁻⁹⁶

Dijagnostika TTV virusne infekcije

Slično kao i kod HGV, prava uloga, ako uopće i postoji, u patologiji jetre nije poznata. Danas osim analize genoma TTV nisu razvijene komercijalne tehnike (tipa ELISA) za dokazivanje antitijela na ovaj virus.⁹⁷⁻⁹⁹

Dijagnostika SEN-V virusne infekcije

Otkriće ovog virusa pobudilo je nadu da će on možda "pokriti" većinu nonA-nonE virusnih hepatitisa. Ubrzo se pokazalo da se on, poput HGV i TTV virusa ne može jasno povezati s oštećenjem jetre u ljudi.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Dijagnostika NV-F virusne infekcije

Ovaj je virus tek nedavno otkriven te njegovu eventualnu ulogu u oštećenju jetrenog parenhima tek treba utvrditi. Ne postoje zasada komercijalni dijagnostički postupci za detekciju infekcije ovim virusom.¹⁰³

Interakcija/koinfekcija virusa

Istodobna infekcija (koinfekcija) unutar grupe hepatitis virusa te hepatitis virusa i HIV-a može imati reperkusije u dijagnostičkom smislu. Najilustrativniji je primjer u tom smislu HBV/HDV koinfekcija. Kao što je navedeno u poglavlju HDV infekcija, superinfekcija HDV kod HBsAg nosilaštva može dovesti do pogrešne dijagnoze ako se na to ne misli. Registrirani su slučajevi HCV infekcije bez anti-HCV u osoba s HIV infekcijom zbog imunosupresivnog djelovanja HIV-a na produkciju anti-HCV antitijela. Interakcija hepatitis virusa te hepatitis virusa i HIV-a je područje koje se tek počelo intenzivnije ispitivati. Važan je segment toga posljedica te interakcije u dijagnostičkom smislu.

Literatura

1. Koff RS. Hepatitis A. *Lancet*. 1998 May 30;351(9116):1643-9.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Positive test results for acute hepatitis A virus infection among persons with no recent history of acute hepatitis--United States, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2005 May 13;54(18):453-6.
3. Mimms LT, Mosley JW, Hollinger FB, Aach RD, Stevens CE, Cunningham M, Vallari DV, Barbosa LH, Nemo GJ. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *BMJ*. 1993 Oct 30;307(6912):1095-7.
4. Perrilo RP. Chronic hepatitis. U: Gitnick RE, LaBrecque DR, Moody FG (eds) *Diseases of the liver and biliary tract*. Mosby-Year Book, St Louis, pp 299-310. 1992.
5. Gerlich WH, Lüer W, Thomssen R. Diagnosis of acute and inapparent hepatitis B virus infections by measurement of IgM antibody to hepatitis B core antigen. *J Infect Dis*. 1980 Jul;142(1):95-101.
6. Alter HJ, Seeff LB, Kaplan PM, McAuliffe VJ, Wright EC, Gerin JL, Purcell RH, Holland PV, Zimmerman HJ. Type B hepatitis: the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needlestick exposure. *N Engl J Med*. 1976 Oct 21;295(17):909-13.
7. Mushahwar IK, McGrath LC, Drnec J, Overby LR. Radioimmunoassay for detection of hepatitis B e antigen and its antibody. Results of clinical evaluation. *Am J Clin Pathol*. 1981

Nov;76(5):692-7.

8. Mushahwar IK, Overby LR. An enzyme immunoassay for hepatitis B e-antigen and antibody. *J Virol Methods*. 1981 Sep;3(2):89-97.
9. Neurath AR, Kent SB, Strick N. Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of hepatitis B virus. *Science*. 1984 Apr 27;224(4647):392-5.
10. Wong DT, Nath N, Sninsky JJ. Identification of hepatitis B virus polypeptides encoded by the entire pre-s open reading frame. *J Virol*. 1985 Jul;55(1):223-31.
11. Pfaff E, Salfeld J, Gmelin K, Schaller H, Theilmann L. Synthesis of the X-protein of hepatitis B virus in vitro and detection of anti-X antibodies in human sera. *Virology*. 1987 Jun;158(2):456-60.
12. Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA, Thornton GB. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science*. 1985 Jan 25;227(4685):429-33.
13. Vitvitski-Trépo L, Kay A, Pichoud C, Chevallier P, de Dinechin S, Shamoan BM, Mandart E, Trépo C, Galibert F. Early and frequent detection of HBxAg and/or anti-HBx in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 1990 Dec;12(6):1278-83.
14. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF. Antibody to hepatitis-B-virus core in man. *Lancet*. 1973 Oct 20;2(7834):869-73.
15. Gerlich WH, Uy A, Lambrecht F, Thomssen R. Cutoff levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic, and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol*. 1986 Aug;24(2):288-93.
16. Eble K, Clemens J, Krenc C, Rynning M, Stojak J, Stuckmann J, Hutten P, Nelson L, DuCharme L, Hojvat S, et al. Differential diagnosis of acute viral hepatitis using rapid, fully automated immunoassays. *J Med Virol*. 1991 Mar;33(3):139-50.
17. Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis*. 1971 Jun;123(6):671-5.
18. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF. Antibody to hepatitis-B virus core in man. *Lancet*. 1973 Oct 20;2(7834):869-73.
19. Koziol DE, Alter HJ, Kirchner JP, Holland PV. The development of HBsAg-positive hepatitis despite the previous existence of antibody to HBsAg. *J Immunol*. 1976 Dec;117(6):2260-2.
20. Tabor E, Gerety RJ, Smallwood LA, Barker LF. Coincident hepatitis B surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum. *J Immunol*. 1977 Jan;118(1):369-70.
21. Hoofnagle JH. Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Annu Rev Med*. 1981;32:1-11.
22. Hollinger FB, Dienstag JL. Hepatitis B and D viruses. U: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. Washington, DC: ASM Press 1995;1033-49.
23. Hollinger FB, Dreesman GR. Hepatitis viruses. U: Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, et al., eds *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1980;634-50.
24. Kuhns MC, McNamara AI, Cabal C et al.: A new assay for the quantitative detection of hepatitis B viral DNA in human serum. Zuckerman AJ (ed). *Viral hepatitis and liver disease*, Alan R. Liss, New York, pp 258-62.
25. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*. 1990 Aug 11;336(8711):325-9.
26. Carman WF, Fagan EA, Hadziyannis S, Karayiannis P, Tassopoulos NC, Williams R, Thomas HC. Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology*. 1991 Aug;14(2):219-22.
27. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med*. 1991 Jun 13;324(24):1699-704.
28. Stemler M, Weimer T, Tu ZX, Wan DF, Levrero M, Jung C, Pape GR, Will H. Mapping of B-cell epitopes of the human hepatitis B virus X protein. *J Virol*. 1990 Jun;64(6):2802-9.
29. Moestrup T, Hansson BG, Widell A, Blomberg J, Nordenfelt E. Hepatitis B virus-DNA in the serum of patients followed-up longitudinally with acute and chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 1985 Dec;17(4):337-44.
30. Baker BL, Di Bisceglie AM, Kaneko S, Miller R, Feinstone SM, Waggoner JG, Hoofnagle JH. Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction: clinical significance and correlation with serological and biochemical markers. *Hepatology*. 1991 Apr;13(4):632-6.
31. Liaw YF, Pao CC, Chu CM, Sheen IS, Huang MJ. Changes of serum hepatitis B virus DNA in two types of clinical events preceding spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Hepatology*. 1987 Jan-Feb;7(1):1-3.
32. Korenman J, Baker B, Waggoner J, Everhart JE, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Long-term remission of chronic hepatitis B after alpha-interferon therapy. *Ann Intern Med*. 1991 Apr 15;114(8):629-34.
33. Liang TJ, Baruch Y, Ben-Porath E, Enat R, Bassan L, Brown NV, Rimon N, Blum HE, Wands JR.

- Hepatitis B virus infection in patients with idiopathic liver disease. *Hepatology*. 1991 Jun;13(6):1044-51.
34. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terre S, D'Errico A, Grigioni W, Nalpas B, Franco D, Wands J, Kew M, et al. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med*. 1990 Jul 12;323(2):80-5.
 35. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, Chisari FV, Rehermann B, Del Prete G, Fiaccadori F, Ferrari C. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98(5):1185-94.
 36. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*. 1996 Oct;2(10):1104-8.
 37. Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol*. 1994 Apr;68(4):2671-6.
 38. Related Articles, LinksYotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology*. 1998 May;27(5):1377-82.
 39. Zhang YY, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology*. 1993 Apr;17(4):538-44.
 40. Liang TJ, Blum HE, Wands JR. Characterization and biological properties of a hepatitis B virus isolated from a patient without hepatitis B virus serologic markers. *Hepatology*. 1990 Aug;12(2):204-12.
 41. Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, Mack D, Schellekens H, Driss F, Goudeau A, Wands J, Sninsky J, Tiollais P, et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. *Lancet*. 1988 Dec 3;2(8623):1273-6.
 42. Related Articles, LinksCoffin CS, Michalak TI. Persistence of infectious hepadnavirus in the offspring of woodchuck mothers recovered from viral hepatitis. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(2):203-12.
 43. Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, Zetterman RK, Pruett TL, Ishitani MB, Hoofnagle JH. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Gastroenterology*. 1997 Nov;113(5):1668-74.
 44. Blanpain C, Knoop C, Delforge ML, Antoine M, Peny MO, Liesnard C, Vereerstraeten P, Cogan E, Adler M, Abramowicz D. Reactivation of hepatitis B after transplantation in patients with pre-existing anti-hepatitis B surface antigen antibodies: report on three cases and review of the literature. *Transplantation*. 1998 Oct 15;66(7):883-6.
 45. Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology*. 1991 Jan;100(1):182-8.
 46. Alter HJ. Descartes before the horse: I clone, therefore I am: the hepatitis C virus in current perspective. *Ann Intern Med*. 1991 Oct 15;115(8):644-9.
 47. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med*. 1992 Dec 31;327(27):1899-905.
 48. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*. 1997 Sep;26(3 Suppl 1):15S-20S.
 49. Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Niwa H, Iino S. Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. *Dig Dis Sci*. 1994 Jan;39(1):19-27.
 50. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, del Valle Onorato M, Rodés J, Ordinas A. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology*. 1995 Mar;21(3):639-44.
 51. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, Purcell RH. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*. 1991 Jul 11;325(2):98-104.
 52. Alter HJ, Sanchez-Pescador R, Urdea MS, Wilber JC, Lagier RJ, Di Bisceglie AM, Shih JW, Neuwald PD. Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat*. 1995;2(3):121-32.
 53. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med*. 1999 Apr 22;340(16):1228-33.
 54. Seeff LB, Buskell-Bales Z, Wright EC, Durako SJ, Alter HJ, Iber FL, Hollinger FB, Gitnick G,

- Knodell RG, Perrillo RP, et al. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. N Engl J Med.* 1992 Dec 31;327(27):1906-11.
55. Vogt M, Lang T, Frösner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med.* 1999 Sep 16;341(12):866-70.
 56. Center for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep.* 1998 Oct 16;47(RR-19):1-39.
 57. Desmet V. Chronic hepatitis including primary biliary cirrhosis. U: Gall EA, Mostofi FK, eds. *The Liver.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1972;286-334.
 58. Esteban JI, González A, Hernández JM, Viladomiu L, Sánchez C, López-Talavera JC, Lucea D, Martín-Vega C, Vidal X, Esteban R, et al. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *N Engl J Med.* 1990 Oct 18;323(16):1107-12.
 59. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, Johnson RG, Barbosa LH, Nemo GJ. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med.* 1991 Nov 7;325(19):1325-9.
 60. Tremolada F, Casarin C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G, Alberti A, Ruol A. Antibody to hepatitis C virus in post-transfusion hepatitis. *Ann Intern Med.* 1991 Feb 15;114(4):277-81.
 61. 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 Mar;102(3):969-72.
 62. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology.* 1999 Mar;29(3):908-14.
 63. Alberti A, Morsica G, Chemello L, Cavalletto D, Noventa F, Pontisso P, Ruol A. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet.* 1992 Sep 19;340(8821):697-8.
 64. Lau DT, Kleiner DE, Ghany MG, Park Y, Schmid P, Hoofnagle JH. 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1998 Oct;28(4):1121-7.
 65. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):43S-47S.
 66. Cancio-Bello TP, de Medina M, Shorey J, Valledor MD, Schiff ER. An institutional outbreak of hepatitis B related to a human biting carrier. *J Infect Dis.* 1982 Nov;146(5):652-6.
 67. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):103-26.
 68. Asselah T, Vidaud D, Doloy A, Boyer N, Martinot M, Vidaud M, Valla D, Marcellin P. Second infection with a different hepatitis C virus genotype in a intravenous drug user during interferon therapy. *Gut.* 2003 Jun;52(6):900-2.
 69. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet.* 2001 Sep 22;358(9286):958-65.
 70. Hwang SJ, Lee SD, Lu RH, Chu CW, Wu JC, Lai ST, Chang FY. Hepatitis C viral genotype influences the clinical outcome of patients with acute posttransfusion hepatitis C. *J Med Virol.* 2001 Nov;65(3):505-9.
 71. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 1989 Nov 30;321(22):1494-500.
 72. Chau KH, Dawson GJ, Mushahwar IK, Gutierrez RA, Johnson RG, Lesniewski RR, Mattsson L, Weiland O. IgM-antibody response to hepatitis C virus antigens in acute and chronic post-transfusion non-A, non-B hepatitis. *J Virol Methods.* 1991 Dec;35(3):343-52.
 73. Yuki N, Hayashi N, Ohkawa K, Hagiwara H, Oshita M, Katayama K, Sasaki Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. The significance of immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1995 Aug;22(2):402-6.
 74. Quiroga JA, van Binsbergen J, Wang CY, Pardo M, Navas S, Trines C, Herrero M, Carreño V. Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus core antigen: correlations with viral replication, histological activity, and liver disease outcome. *Hepatology.* 1995 Dec;22(6):1635-40.
 75. Orito E, Mizokami M, Tanaka T, Lau JY, Suzuki K, Yamauchi M, Ohta Y, Hasegawa A, Tanaka S, Kohara M. Quantification of serum hepatitis C virus core protein level in patients chronically infected with different hepatitis C virus genotypes. *Gut.* 1996 Dec;39(6):876-80.
 76. Peterson J, Green G, Iida K, Caldwell B, Kerrison P, Bernich S, Aoyagi K, Lee SR. Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative 'window' phase of hepatitis C infection. *Vox Sang.* 2000;78(2):80-5.

77. Burek V, Mikulić R. Dynamics of free HGVAg during acute HCV infection. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Paris, France, 2001 Abstract book: p 295.
78. Nübling CM, Unger G, Chudy M, Raia S, Löwer J. Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion*. 2002 Aug;42(8):1037-45.
79. Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez-Montreuil M, Levayer T, Zappitelli JP, Lefrère JJ. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion*. 2003 Jul;43(7):958-62.
80. Grant PR, Sims CM, Tedder RS. Quantification of HCV RNA levels and detection of core antigen in donations before seroconversion. *Transfusion*. 2002 Aug;42(8):1032-6.
81. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann AU, McHutchison JG, Pawlotsky JM. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology*. 2002 Jul;36(1):211-8.
82. Cividini A, Cerino A, Muzzi A, Furione M, Rebucci C, Segagni L, Gatti M, Barnaba V, Mondelli MU. Kinetics and significance of serum hepatitis C virus core antigen in patients with acute hepatitis C. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):2144-6.
83. Veillon P, Payan C, Picchio G, Maniez-Montreuil M, Guntz P, Lunel F. Comparative evaluation of the total hepatitis C virus core antigen, branched-DNA, and amplicor monitor assays in determining viremia for patients with chronic hepatitis C during interferon plus ribavirin combination therapy. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3212-20.
84. Burek V, Mikulić R. Reappearance of free HCVAg after immunosuppression with decrease of anti-HCV spectrum. Hepatitis C-past, present, future - International Conference, Dublin, Ireland, 2003 Abstract book: p 13.
85. Burek V, Mikulić R. HCV core antigen and the time of HCV infection. 11th International Congress on Infectious Diseases, Cancun, Mexico, 2004 Abstract book: p S-42.
86. Maynard M, Pradat P, Berthillon P, Picchio G, Voirin N, Martinot M, Marcellin P, Trepo C. Clinical relevance of total HCV core antigen testing for hepatitis C monitoring and for predicting patients' response to therapy. *J Viral Hepat*. 2003 Jul;10(4):318-23.
87. Rosina F, Conoscitore P, Cuppone R, Rocca G, Giuliani A, Cozzolongo R, Niro G, Smedile A, Saracco G, Andriulli A, Manghisi OG, Rizzetto M. Changing pattern of chronic hepatitis D in Southern Europe. *Gastroenterology*. 1999 Jul;117(1):161-6.
88. Bean P. Latest discoveries on the infection and coinfection with hepatitis D virus. *Am Clin Lab*. 2002 Jun;21(5):25-7.
89. Taylor JM. Therapy for HDV! *Hepatology*. 2003 Dec;38(6):1581-2.
90. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology*. 1998 Mar;27(3):857-61.
91. Schlauder GG, Desai SM, Zanetti AR, Tassopoulos NC, Mushahwar IK. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J Med Virol*. 1999 Mar;57(3):243-51.
92. Harrison TJ. Hepatitis E virus -- an update. *Liver*. 1999 Jun;19(3):171-6.
93. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Prevention of Viral Hepatitis A to E: An Overview. 2000.
94. Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, Moyer LA, Meeks EL, Krawczynski K, Kim JP, Margolis HS. Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. Sentinel Counties Viral Hepatitis Study Team. *N Engl J Med*. 1997 Mar 13;336(11):741-6.
95. Pessoa MG, Terrault NA, Ferrell LD, Kim JP, Kolberg J, Detmer J, Collins ML, Yun AJ, Viele M, Lake JR, Roberts JP, Ascher NL, Wright TL. Hepatitis G virus in patients with cryptogenic liver disease undergoing liver transplantation. *Hepatology*. 1997 May;25(5):1266-70.
96. Martinot M, Marcellin P, Boyer N, Detmer J, Pouteau M, Castelnau C, Degott C, Aupérin A, Collins M, Kolberg J, Wilber J, Benhamou JP, Erlinger S. Influence of hepatitis G virus infection on the severity of liver disease and response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med*. 1997 Jun 1;126(11):874-81.
97. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec 8;241(1):92-7.
98. Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Erker JC, Simons JN, Chalmers ML, Birkenmeyer LG, Pilot-Matias TJ, Mushahwar IK. Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. *J Infect Dis*. 1999 May;179(5):1242-4.
99. Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):98-113.
100. Primi D, Sottini A. Identification and characterization of SEN virus, a family of novel DNA

- viruses. Antiviral Therapy 2000;5(Suppl. 1):G7.
101. Pirovano S, Sottini A, Bianchi V et al. Incidence of the SENV-A subtype in different cohorts of patients. Antiviral Therapy 2000;5(Suppl. 1):Abstract 81.
 102. Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, Shih JW, Donahue P, Primi D, Alter HJ. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. Hepatology. 2001 May;33(5):1303-11.
 103. Hsu CW, Cheng JC, Yeh CT. Quantitative assessment of serum NV-F virus DNA concentrations in samples from patients coinfecting with hepatitis B or C virus. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3130-3.

Kontakt

Prof. dr. sc. Vitomir Burek, specijalista infektolog
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"
Mirogojska 8,
10000 Zagreb
Telefon: +385 1 4603 162
Telefax: +385 1 4603 13
e-mail: vitomir.burek@zg.htnet.hr