

# Imunoenzimski test za određivanje protutijela na pojedinačne antigene virusa hepatitisa C kao potvrdni test u dijagnostici hepatitisa C

*Nataša CETINIĆ BALENT, dr. med.,  
specijalizant medicinske mikrobiologije s  
parazitologijom  
Radojka MIKULIĆ, mag. med. biokemije  
Oktavija ĐAKOVIĆ RODE, prim. dr. sc., dr.  
med., specijalist medicinske mikrobiologije s  
parazitologijom, znanstveni suradnik*

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran  
Mihaljević", Zagreb  
Zavod za kliničku mikrobiologiju – Odjel za  
virusologiju

## Ključne riječi

*virus hepatitisa C (HCV)  
dijagnostika HCV  
anti-HCV  
imunoenzimski test (EIA)  
imunoblot test (IB)  
HCV RNK*

## Key words

*hepatitis C virus (HCV)  
HCV diagnostic  
anti-HCV  
enzyme immunoassay (EIA)  
immunoblotting (IB)  
HCV RNA*

**Primljeno:** 2013–06–13

**Received:** 2013–06–13

**Prihvaćeno:** 2013–07–20

**Accepted:** 2013–07–20

Znanstveni rad

Dijagnostika hepatitisa C temelji se na određivanju protutijela anti-HCV probirnim imunoenzimskim testovima (EIA). Svaki reaktivni nalaz anti-HCV probirnog testa prema recentnim smjericama zahtijeva daljnje određivanje HCV RNK. U slučajevima negativnog nalaza HCV RNK, reaktivni nalaz EIA anti-HCV treba potvrditi imunoblot testom (IB). Komercijalno su dostupni i EIA testovi koji imaju mogućnost određivanja specifičnih protutijela na pojedinačne antigene HCV koji daju rezultate usporedive sa standardnim potvrđnim IB testovima.

Cilj ovog rada bio je prikazati EIA potvrdni test, *EIA-Anti-HCV-Spectrum* (DSI, Italija) i usporediti rezultate testiranja sa standardnim IB testom.

Analizirali smo 50 nasumično odabranih seruma koji su imali reaktivni odgovor protutijela na HCV u probirnom EIA testu (*Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA*, Bio-Rad, Francuska). Za isključenje lažno pozitivnih rezultata serumi su dalje testirani potvrđnim IB testom (*Deciscan HCV PLUS*, Bio-Rad, Francuska). Odabranih 50 uzoraka testirano je testom *EIA-Anti-HCV-Spectrum* za određivanje pojedinačnih protutijela anti-HCV na antigene jezgre te antigene NS3, NS4 i NS5.

Od 50 seruma s reaktivnim odgovorom protutijela na HCV u probirnom testu u oba potvrđna testa pozitivno je bilo 40, negativno 1 i granično 3 uzorka. Nepodudarnih rezultata potvrđnih testova bilo je 6: svi su bili granično pozitivni u IB testu, a negativni u alternativnom potvrđnom testu *EIA-Anti-HCV-Spectrum*.

Predstavili smo imunoenzimski potvrdni test za protutijela anti-HCV koji je pokazao dobru korelaciju sa standardnim imunoblot testom premda je potrebno napraviti evaluaciju na većem broju uzoraka za sigurnije zaključke.

## Enzyme immunoassay for separate detection of anti-HCV antibodies to individual HCV antigens as a confirmatory assay in diagnostics of HCV infection

Scientific paper

Diagnostics of hepatitis C is based on the determination of anti-HCV antibodies by screening enzyme immunoassays (EIA). Each reactive anti-HCV screening result, according to recent guidelines, requires further determination of HCV RNA. In cases of negative HCV RNA findings, reactive anti-HCV results should be confirmed by immunoblotting (IB). Alternative confirmatory EIA with the ability to determine the antibodies against individual HCV antigens, which are comparable with the results of immunoblot tests, are commercially available.

The aim of this study was to present an EIA test, the *EIA-Anti-HCV-Spectrum* (DSI, Italy) and compare the test results with standard IB test.

We analyzed 50 randomly selected serum samples with reactive screening EIA (*Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA*, Bio-Rad, France) results. In order to exclude false positives, serum samples were further tested with confirmatory IB test (*Deciscan HCV PLUS*, Bio-Rad, France). A total of 50 selected samples were tested with *EIA-Anti-HCV-Spectrum* for separate detection of anti-HCV antibodies against core, NS3, NS4 and NS5 antigens.

Out of the 50 primary reactive samples, anti-HCV antibodies were positive in both confirmatory tests in 40, negative in 1 and borderline in 3 samples. Discordant results of confirmatory tests were recorded in 6 samples: all borderline in IB test and negative in the alternative *EIA-Anti-HCV-Spectrum* border.

We present an EIA confirmatory test for anti-HCV antibodies which showed a good correlation with the standard immunoblot test, although it is necessary to perform the evaluation on a large number of samples for safer conclusions.

## Uvod

Hepatitis C prepoznat je kao zasebna bolest 1975. godine kada je uočeno da oko 90 % slučajeva posttransfuzijskog hepatitisa nije bilo uzrokovano do tada poznatim virusima hepatitisa A ili B. Alter i suradnici bolest su nazvali hepatitis "non-A, non-B" (NANB) [1, 2]. Tijekom 1988. godine Choo i suradnici uspjeli su složenim molekularno-biološkim postupcima iz plazme pokusno inficiranih čimpanza izolirati nukleinsku kiselinu novog virusa [3]. Tim otkrićem 1989. godine virus NANB preimenovan je u virus hepatitisa C (HCV). Prema genetskim i virusološkim osobitostima svrstan je u porodicu *Flaviviridae*, rod *Hepacivirus* [4].

Virusna čestica ima sferičan oblik, veličine oko 60 nm. Nukleokapsida je promjera 30 nm, ovijena lipidnom ovojnicom na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci [5]. Genom HCV sačinjava jednolančana pozitivna ribonukleinska kiselina (RNK) veličine 9600 nukleotida koja sadrži 2 kratke nekodirajuće regije na 5' i 3' kraju (engl. *nontranslated region*, NTR) i veliki otvoreni okvir čitanja (engl. *open reading frame*, ORF) koji kodira poliprotein od 3008 do 3037 aminokiselina. Broj aminokiselina ovisi o genotipu virusa [6–8]. Poliprotein, produkt prevodenja ORF-a, posttranslacijski se cijepa pomoću staničnih i virusnih proteaza na strukturnu i nestrukturnu regiju te regiju proteina p7 koji čini sponu između strukturnih i nestrukturnih proteina. Strukturni proteini, koji čine virusnu česticu, uključuju tri proteina: protein jezgre (engl. *core*, C) i dva glikoproteina ovojnice E1 i E2 (engl. *envelope*, E). Nestrukturni proteini uključuju šest proteina NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B većinom enzima koji sudjeluju u procesu umnožavanja virusne čestice. Nekodirajuće regije 5'NTR i 3'NTR imaju važnu ulogu u započinjanju translacije i u replikaciji virusa [9–13].

Izolati HCV-a iz različitih dijelova svijeta pokazuju značajnu genetsku različitost. Razlog je najvjerojatnije u velikom virusnom obrtaju i u nemogućnosti adekvatnog čitanja izmjena. Sekvencioniranjem uzastopnih uzoraka u kronično zaraženih pojedinaca izmjerena je prosječna učestalost mutacije od  $1,44 \times 10^{-3}$  izmjena baza nukleotida po jednoj lokalizaciji na genomu u godini dana [14]. Kao posljedica velike brzine mutacija, do danas je u svijetu poznato oko 90 vrsta virusa, a međusobno se razlikuju prema rasporedu aminokiselina. U cilju izjednačavanja oznaka različitih tipova i podtipova 1994. godine prihvaćen je model klasifikacije HCV-a. Prema glavnom filogenetskom stablu razlikuje se 6 glavnih tipova, nazvanih genotipovi. Označavaju se arapskim brojevima od 1 do 6. Pojedini genotipovi se na razini sekvence nukleotida razlikuju oko 30–35 %. Genotipovi HCV-a iskazuju određenu razinu molekularne heterogenosti i klasificiraju se u više od 90 podtipova koji se označavaju malim slovima a, b i c. Međusobna različitost podtipova istog genotipa je 20–25 %. Genotipizacija HCV-a važna je zbog epidemio-

loškog praćenja, ali i zbog određivanja trajanja i procjene vjerojatnosti uspješnosti liječenja te je obvezni dio obrade bolesnika s kroničnim hepatitisom C prije uvođenja terapije [15, 16].

HCV u zaraženoj osobi obitava u formi kvazispjecijesa. Virusna RNK polimeraza nema sposobnost prepoznavanja pogrešno umetnutih nukleotida tijekom umnožavanja niti djelotvornog popravka RNK što dovodi do brojnih genski različitih varijanti istog virusa u jednom domaćinu. Kvazispjecijesi se razlikuju u nukleotidnom slijedu do 10 %. Do mutacija može doći na bilo kojem dijelu genoma HCV-a, ali sve nemaju klinički značaj. Važnost stvorene mutacije, a time i potpuno novog kvazispjecijesa, ovisi o ulozi proteina na kojem se mutacija dogodila. Mutacijama u varijabilnim regijama HCV izbjegava imunološkom odgovoru domaćina ili antivirusnom liječenju. Smatra se da su upravo kvazispjecijesi jedan od prediktivnih čimbenika za učinkovitost liječenja [17–19].

U Europi i SAD-u najčešće dominiraju infekcije genotipom 1 (podtipovi 1a i 1b); slijede ih genotipovi 2 i 3; genotip 4 je najčešći na Srednjem Istoku (Egipat); genotip 5 u Južnoj Africi, a genotip 6 u jugoistočnoj Aziji [20]. Desetogodišnje praćenje genotipova HCV (1996–2005) u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje virusnih hepatitisa Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske pokazalo je da su u Hrvatskoj najčešće infekcije HCV genotipovima 1 i 3, podtipovima 1b, 3a i 1a uz manje regionalne razlike uzrokovane epidemiološkim karakteristikama [21].

HCV je najčešći uzrok kronične bolesti jetre u svijetu. Prema procjeni SZO za 2013. godinu oko 160 milijuna ljudi kronično je inficirano virusom hepatitisa C, a više od 350 000 ljudi godišnje umire od kroničnih bolesti jetre uzrokovanih virusom hepatitisa C [22, 23].

Akutna HCV-infekcija rijetko je klinički prepoznatljiva. Bolest se akutno manifestira samo u oko 10–20 % slučajeva. Ostalih 80–85 % inficiranih bolesnika otkriva se tek u kroničnoj fazi, najčešće slučajnim otkrivanjem povišenih vrijednosti aminotransferaza u sklopu dijagnostičke obrade vezane uz druge bolesti ili u fazi kada bolest postane simptomatska i kad nastupe znaci dekompenzacije jetre [23–25].

Kronična HCV-infekcija povezana je s nastankom ciroze, dekompenzirane jetrene bolesti i hepatocelularnog karcinoma, pa je stoga od iznimne važnosti pravovremeno otkrivanje i liječenje HCV-infekcije. Kroničnu infekciju razvije 75–85 % novozaraženih. Rizik za nastanak ciroze u bolesnika s kroničnom HCV-infekcijom iznosi 10–20 % kroz 20 do 30 godina trajanja infekcije. Kada se razvije ciroza rizik nastanka hepatocelularnog karcinoma i dekompenzacije ciroze iznosi 1–5 % godišnje za bolesnike sa cirozom [23–25].

Prema preporukama američkog Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) iz 2012. godine i Hrvatske kon-

sensus konferencije iz 2013. godine testiranje za HCV trebalo bi preporučiti svim osobama s povećanim rizikom za HCV-infekciju: osobama rođenim između 1945. i 1965. godine, intravenskim korisnicima droga i onima koji su sporadično intravenski koristili drogu (makar samo jedanput), osobama koje su dobivale koncentrate trombocita prije 1987. godine, primateljima transfuzije ili solidnih organa prije 1992. godine, 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 [26 – 28].

## Dijagnostika HCV infekcije

Virusološka dijagnostika akutne i kronične HCV-infekcije temelji se na primjeni seroloških i molekularnih testova. Ulaskom HCV u organizam dolazi do replikacije virusa i razvoja imunskog odgovora domaćina te se u serumu mogu detektirati HCV RNK, virusni antigeni i protutijela na antigene HCV. HCV RNK detektabilna je u serumu oko 14. dana infekcije. Od protutijela u serumu bolesnika prvo se pojavljuju protutijela usmjerena na regiju NS3 i protein jezgre (*core*), a poslije na regiju NS4 te na E1 i E2 [28, 29].

Dijagnostika HCV-infekcije najčešće započinje određivanjem protutijela anti-HCV imunoenzimskim testovima (EIA). Protutijela anti-HCV mogu se dokazati 8 do 12 tjedana nakon infekcije u većine zaraženih osoba. Testovi za određivanje protutijela anti-HCV unapređuju se unošenjem dodatnih antigenih komponenti. Prva generacija imunotestova (EIA-1) početkom 1990-tih godina sadržavala je rekombinantni protein genoma NS4 (epitop c100-3) HCV. Iako su ovi testovi predstavljali veliki napredak u testiranju dobrovoljnih davatelja krvi i identificirali protutijela anti-HCV IgG u 80 % osoba s posttransfuzijskim hepatitisom te doveli do značajnog smanjenja HCV-infekcije uzrokovane transfuzijom, specifičnost i osjetljivost im je bila nedostatna. Vrijeme otkrivanja protutijela anti-HCV u prvoj generaciji EIA testova bilo je oko 16 tjedana od infekcije. Tijekom 1992. godine odobreni su testovi druge generacije (EIA-2) koji sadržavaju antigene jezgre (c22-3), proteine NS3 (c33c) i NS4, čime se povećala specifičnost i osjetljivost testa (92 – 95 %), a vrijeme otkrivanja protutijela anti-HCV smanjilo se na oko 10 tjedana. Tijekom 1996. godine odobreni su testovi treće generacije (EIA-3) koji sadrže i dodatni protein NS5. Vrijeme otkrivanja protutijela anti-HCV testovima EIA-3 skraćeno je na 6 do 8 tjedana od infekcije. Specifičnost testova EIA-3 je viša od 99 % [20, 30].

Bolja dostupnost HCV dijagnostike omogućena je pojavom brzih imunokromatografskih testova (ICA), tzv.

testova *point-of-care* (POC) koji omogućavaju provođenje dijagnostike i izvan standardnih zdravstvenih ustanova [27, 31]. POC testovi se temelje na vizualizaciji reakcije vezanja antigena i protutijela. Testovi su probirni i zahtijevaju dodatnu laboratorijsku potvrdu ukoliko se radi o reaktivnom rezultatu [27]. POC testovi za dijagnostiku HCV-infekcije uključuju rekombinantne antigene jezgre, NS3, NS4 i NS5 genoma HCV. Agencija FDA (*Food and Drug Administration Agency*) odobrila je brzi test *OraQuick HCV Rapid Antibody Test* za dijagnostiku HCV u izvanlaboratorijskim uvjetima. Test pokazuje jednaku specifičnost (98 – 100 %) i osjetljivost (98 – 99 %) kao komercijalni laboratorijski testovi i mogu ga izvoditi medicinski radnici nakon provedene edukacije od strane odgovorne laboratorijske osobe koja će provoditi nadzor [31 – 33].

Serološki testovi najnovije generacije osim protutijela anti-HCV prepoznaju i antigen virusne kapside (HCVAg). Dugo su trajali pokušaji da se razvije praktičan test za dokazivanje HCVAg budući da je koncentracija HCVAg u serumu vrlo niska. HCVAg se pojavljuje rano, gotovo istodobno s HCV RNK (u prosjeku 1 – 2 dana kasnije), a s obzirom da perzistira ograničeno vrijeme (oko 2 mjeseca) vjerovalo se da bi se njegovim utvrđivanjem i praćenjem dinamike dobio iskoristivi marker akutne HCV-infekcije kao alternativa molekularnoj dijagnostici. Prvi "*in-house*" HCVAg testovi pojavili su se i razvijali tijekom 1990-ih u Japanu, ali zbog niske osjetljivosti nisu se proširili za kliničku primjenu. Početkom 2000-tih godina razvijeni su komercijalni HCVAg imunoenzimski testovi. Prva generacija testova detektirala je HCVAg samo u ranoj fazi akutne HCV-infekcije, kada još ne postoji protutijelo anti-HCV (tzv. "slobodni" HCVAg). Zbog nemogućnosti otkrivanja HCVAg u prisutnosti protutijela anti-HCV razvijeni su testovi druge generacije koji imaju mogućnosti upotrebom monoklonskih protutijela odrediti HCVAg i u prisutnosti protutijela anti-HCV (tzv. "vezani HCVAg" odnosno kompleks HCVAg/anti-HCV) te ga i kvantitativno odrediti. Mogućnost kvantitativnog određivanja HCVAg i potencijalne uloge HCVAg kao pokazatelja viremije dovelo je tijekom 2000-tih godina do evaluacija pouzdanosti određivanja HCVAg usporedbom rezultata kvantitativnog određivanja HCVAg i HCV RNK. Bouvier-Alias i sur. 2002. godine evaluirali su ulogu HCVAg i objavili da 1 pg/mL HCVAg odgovara oko 8 000 HCV RNK IU/mL te da HCVAg može imati ulogu u kliničkoj praksi kao indirektni marker replikacije HCV-a. Kao limitirajući faktor određivanja HCVAg navodi se njegova niža osjetljivost kod niske viremije ispod 20 000 HCV RNK IU/mL [34 – 36]. Razvojem automatiziranih HCVAg testova poboljšana je osjetljivost testa na 1 000 HCV RNK IU/mL, ali i dalje postoji ograničenje HCVAg testa u odnosu na molekularnu dijagnostiku [36 – 38].

U molekularnoj dijagnostici HCV-infekcije koriste se testovi za kvalitativnu detekciju HCV RNK i/ili kvantifikaciju HCV RNK kao i testovi za genotipizaciju HCV-a.

Dokazivanje HCV RNK zasniva se na kombinaciji amplifikacijskih (PCR) i detekcijskih metoda. Prema dijagnostičkim smjernicama metoda izbora za dokazivanje i kvantifikaciju HCV RNK je PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time* PCR) zbog vrlo visoke osjetljivosti s granicom detekcije oko 5 – 10 IU/mL (engl. *International Unit*, IU) i velikog raspona od 8 log<sub>10</sub> IU/mL, a njegova primjena omogućava istovremeno dobivanje kvalitativnog (detekcija HCV RNK) i kvantitativnog (određivanje koncentracije HCV RNK u IU/mL biološkog uzorka) rezultata [27, 39 – 41].

Određivanje HCV RNK trebalo bi raditi uvijek nakon pozitivnog nalaza probirnog testa radi određivanja viremijske. Ako je nalaz HCV RNK negativan potrebno je definirati primarni rezultat testiranja protutijela anti-HCV pomoću potvrdnog imunoblot testa. Imunoblot test (IB) temelji se na istim antigenima HCV kao i EIA, ali ima mogućnost otkrivanja specifičnih protutijela usmjerenih na specifičan rekombinantni antigen HCV. Tijekom 1992. godine razvijeni su IB testovi treće generacije koji imaju četiri značajne razlike od IB testova druge generacije: uključuju c33c rekombinantni antigen regije NS3, rekombinantni antigen NS5, rekombinantni c22-3 antigen (*core* regija) zamijenjen je sintetskim peptidom c22, a rekombinantni antigeni regije NS4, 5-1-1 i c100-3, zamijenjeni su mješavinom sintetskih peptida c100 [42].

Zadnjih godina komercijalno su dostupni i EIA testovi koji imaju mogućnost određivanja specifičnih protutijela na pojedinačne antigene HCV. Rezultati tih testova odgovaraju rezultatima IB testova i mogli bi se koristiti kao potvrdni testovi. Cilj ovog rada bio je prikazati jedan takav EIA test, *EIA-Anti-HCV-Spectrum* (DSI, Italija) i usporediti rezultate testiranja sa standardnim IB testom. Rezultati ovih testova odgovaraju rezultatima IB testova

## Materijali i metode

Analizirali smo 50 nasumično odabranih seruma pacijenata koji su serološki obrađivani za hepatitis C virus u Odjelu za virusologiju Klinike za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu. Svi uzorci su imali reaktivni odgovor protutijela na HCV u probirnom EIA testu. Za primarno probirno testiranje korišten je test EIA koji se temelji na istovremenom određivanju antigena i protutijela HCV (*Monolisa HCV Ag-Ab Ultra*, Bio-Rad, Francuska). Test *Monolisa HCV Ag-Ab Ultra* za dijagnostiku infekcije HCV je kombinacija indirektnog testa za određivanje protutijela i sendvič testa za određivanje antigena virusne kapside u serumu ili plazmi pacijenta. Rezultat testa je reaktivni odgovor na prisutna protutijela ili antigen HCV pri čemu nije moguće razlikovati radi li se o prisutnim protutijelima ili antigenu. Za isključenje lažno pozitivnih rezultata serumi su dalje testirani potvrdnim IB testom (*Deciscan HCV PLUS*, Bio-Rad, Francuska). Svi

testovi su rađeni i rezultati su interpretirani prema postupnicima i preporukama proizvođača.

Odabranih 50 uzoraka testirano je testom *EIA-Anti-HCV-Spectrum*. Test *EIA-Anti-HCV-Spectrum* je kvalitativni test EIA za određivanje protutijela na pojedinačne antigene HCV u serumu ili plazmi; određuju se protutijela na četiri rekombinantna proteina HCV: jedan strukturni (HCV-*core*-Ag) i tri nestrukturna proteina (HCV-NS3-Ag, HCV-NS4-Ag, HCV-NS5-Ag). Pojedinačni antigen u mikrotitarskoj ploči nanesen je u koloni koja je radi lakšeg razlikovanja obilježena različitim bojom: crvenom HCV-*core*-Ag, plavom HCV-NS3-Ag, zelenom HCV-NS4-Ag i žutom bojom HCV-NS5-Ag. Osnova testiranja je standardni protokol za EIA testove rezultat kojeg je stvaranje boje jačina koje se mjeri spektrofotometrijski i interpretira prema zadanim standardnim vrijednostima. Za svaki uzorak seruma dobije se četiri rezultata koji odgovaraju prisutnosti specifičnih protutijela na specifične antigene HCV.

Rezultati testa *EIA-Anti-HCV-Spectrum* uspoređeni su s rezultatima testiranja standardnim testom IB.

## Rezultati

Od 50 seruma s reaktivnim odgovorom protutijela na HCV u probirnom testu *Monolisa HCV Ag-Ab Ultra* u imunoblot testu pozitivno je bilo 40, negativno 1 i granično 9 uzoraka. U testu *EIA-Anti-HCV-Spectrum* koji također određuje protutijela na pojedinačne antigene pozitivno je bilo 40, negativno 7 i granično 3 primarno reaktivna uzorka.

U oba potvrdna testa, IB i *EIA-Anti-HCV-Spectrum*, pozitivno je bilo 40, negativno 1 i granično 3 uzorka. Nepodudarnih rezultata potvrdnih testova bilo je 6; svi su bili granično pozitivni u IB testu, a negativni u alternativnom testu *EIA-Anti-HCV-Spectrum* (tablica 1). Nalazi HCV

**Tablica 1.** Usporedba rezultata potvrdnih testova za protutijela anti-HCV

**Table 1.** Comparison of the results of confirmatory tests for anti-HCV antibodies

Rezultat testa / Test results		EIA-Anti-HCV-Spectrum			
		pozitivan / positive	negativan / negative	graničan / borderline	ukupno / total
Anti-HCV WB	pozitivan / positive	40	–	–	40
	negativan / negative	–	1	–	1
	graničan / borderline	–	6	3	9
	ukupno / total	40	7	3	50

RNK u svih 6 pacijenata s nepodudarnim rezultatima IB i *EIA-Anti-HCV-Spectrum* bili su negativni.

Rezultati usporedbe nalaza protutijela na pojedinačne antigene jezgre, NS3 i NS4 u imunoblot i testu *EIA-Anti-HCV-Spectrum* prikazani su u tablicama 2, 3 i 4.

Nalazi protutijela na pojedinačni antigen jezgre (*core* antigen) podudarali su se u 43 uzorka: u oba potvrdna testa pozitivno je bilo 38, a negativno 5 uzoraka. Nepodudarnih rezultata protutijela na antigen jezgre bilo je za 7 uzoraka (tablica 2).

Nalazi protutijela na antigen NS3 podudarali su se u 45 uzoraka: u oba potvrdna testa pozitivno je bilo 38, a negativno 7 uzoraka. Nepodudarnih rezultata protutijela na antigen NS3 bilo je za 5 uzoraka (tablica 3).

Nalazi protutijela na antigen NS4 podudarali su se u 40 uzoraka: u oba potvrdna testa pozitivno je 26, a negativno 14 uzoraka. Nepodudarnih rezultata protutijela na antigen NS4 bilo je za 10 uzoraka (tablica 4).

**Tablica 2.** Usporedba rezultata potvrdnih testova za protutijela na antigen jezgre HCV-a

**Table 2.** Comparison of the results of confirmatory tests for antibodies against core HCV antigen

Antigen jezgre / Core antigen		EIA-Anti-HCV-Spectrum			ukupno / total
		pozitivan / positive	negativan / negative	graničan / borderline	
Anti-HCV WB	pozitivan / positive	38	5	1	44
	negativan / negative	–	5	–	5
	graničan / borderline	1	–	–	1
ukupno / total		39	10	1	50

**Tablica 3.** Usporedba rezultata potvrdnih testova za protutijela na antigen NS3 HCV-a

**Table 3.** Comparison of the results of confirmatory tests for antibodies against NS3 HCV antigen

NS3 antigen		EIA-Anti-HCV-Spectrum			ukupno / total
		pozitivan / positive	negativan / negative	graničan / borderline	
Anti-HCV WB	pozitivan / positive	38	2	1	41
	negativan / negative	1	7	–	8
	graničan / borderline	–	1	–	1
ukupno / total		39	10	1	50

**Tablica 4.** Usporedba rezultata potvrdnih testova za protutijela na antigen NS4 HCV-a

**Table 4.** Comparison of the results of confirmatory tests for antibodies against NS4 HCV antigen

NS4 antigen		EIA-Anti-HCV-Spectrum			ukupno / total
		pozitivan / positive	negativan / negative	graničan / borderline	
Anti-HCV WB	pozitivan / positive	26	7	–	33
	negativan / negative	–	14	2	16
	graničan / borderline	–	1	–	1
ukupno / total		26	22	2	50

## Rasprava

Serološka dijagnostika HCV obuhvaća testiranje u dva koraka pri čemu se reaktivni rezultati probirnih testova dodatno testiraju metodom imunoblot. U radu je prikazan komercijalno dostupan potvrdni test *EIA-Anti-HCV-Spectrum* koji se temelji na imunoenzimskoj metodi određivanja protutijela na pojedinačne antigene HCV. Rezultati *EIA-Anti-HCV-Spectrum* testa uspoređivani su s rezultatima standardnog IB testa. Oba testa imaju mogućnost određivanja protutijela na pojedinačne antigene HCV te smo usporedili rezultate dobivene za protutijela na antigene jezgre (*core*), NS3 i NS4.

Za 44 (88 %) uzorka rezultati su bili podudarni u oba potvrdna testa. U 6 uzoraka ispitanika s negativnim nalazom HCV RNK potvrdni testovi se nisu slagali – standardni imunoblot test je pokazao nedefinirane granično pozitivne rezultate dok je u testu *EIA-Anti-HCV-Spectrum* nalaz definiran kao negativan.

Bochkova G. i sur. 2011. godine objavili su rezultate evaluacije testa *EIA-Anti-HCV-Spectrum* na više od 5 000 uzoraka kojom su pokazali dobru korelaciju ovog testa u usporedbi sa standardnim imunoblot testom. Test *EIA-Anti-HCV-Spectrum* pokazao je visoku dijagnostičku specifičnost i osjetljivost (100 %) te znatno manji broj neodređenih rezultata u usporedbi sa standardnim imunoblot testom, što se podudara s našim zapažanjem [43]. Razlog može biti u objektivnijem očitavanju rezultata imunoenzimskog testa rezultati kojeg se mjere spektrofotometrijski na optičkom čitaču za razliku od subjektivnog očitavanja rezultata imunoblot testa i procjene rezultata usporedbom sa standardima. I imunoblot testiranje se može provoditi na aparatu koji vjerojatno može smanjiti broj nedefiniranih rezultata, ali zbog malog broja uzoraka u serijama testiranja, a potrebe što ranijeg izdavanja nalaza, što se traži u našim uvjetima, izvođenje na aparatu nije jednostavno primijeniti. Stoga se za potvrdu nedefini-

ranih rezultata preporuča poslati i testirati novi uzorak seruma, odnosno prema novim smjernicama već probirni test treba definirati određivanjem HCV RNK.

Dijagnostika HCV-infekcije započinje određivanjem specifičnih protutijela anti-HCV najčešće imunoenzimskim testom (EIA) koji se smatra probirnim. Negativan anti-HCV probirni test u imunološki kompetentnih osoba smatra se dostatnim za isključivanje HCV-infekcije. Pozitivan nalaz anti-HCV probirnog testa nalazi se u većine bolesnika s HCV-infekcijom i ukazuje da je osoba bila u kontaktu s HCV. Samo na temelju nalaza protutijela anti-HCV ne može se razlučiti je li riječ o aktivnom ili preboljelom hepatitisu C te je prema novim smjernicama obavezno odrediti HCV RNK odnosno viremiju HCV. Dokaz HCV RNK u serumu bolesnika odraz je aktivne replikacije virusa u jetri, dakle znak aktivne infekcije. Ako je viremija nedetektabilna, odnosno negativna, potrebno je napraviti potvrdni test za definiranje nalaza probirnog serološkog testa. Standardni potvrdni test temelji se na metodi imunoblota odnosno western blota [23, 28].

Lažno negativan nalaz EIA testa iznimno je moguć u imunokompromitiranih bolesnika i u ranoj fazi akutnog hepatitisa C. Stoga inicijalna dijagnostička obrada imunokompromitiranih bolesnika, osoba s mogućom akutnom infekcijom, djece majki zaraženih HCV-om, kao i obrada osoba nakon profesionalne ekspozicije HCV-om obvezno bi trebala uključiti i detekciju HCV RNK. U bolesnika s autoimunim bolestima (autoimuna bolest jetre, hipergamaglobulinemija) vrlo visoka koncentracija autoprotutijela može uzrokovati lažno pozitivne rezultate probirnih testova za detekciju anti-HCV, pa se u bolesnika s autoimunim bolestima u sklopu dijagnostičke obrade obvezno preporučuje i kvalitativna detekcija HCV RNK [28, 39].

Detekcija HCV RNK u anti-HCV negativnih osoba može ukazivati na ranu fazu akutne infekcije ili kroničnu infekciju u imunokompromitirane osobe, no ne može se isključiti i mogućnost lažno pozitivnog rezultata HCV RNK testa. Ukoliko se radi o ranoj fazi akutne HCV-infekcije retestiranjem kroz nekoliko tjedana doći će do serokonverzije i pojave protutijela anti-HCV. Dokaz HCV RNK u dva uzorka seruma prikupljena u intervalu od 6 mjeseci dostatan je za postavljanje dijagnoze kroničnog hepatitisa C [24, 39].

Nemjerljiva HCV RNK u serumu anti-HCV pozitivnih osoba najčešće ukazuje na spontanu ili terapijsku eliminaciju virusa tijekom ranije HCV-infekcije. Za dokaz preboljelog hepatitisa C, bolesnika s pozitivnim nalazom anti-HCV potrebno je testirati na prisutnost HCV RNK najmanje dva puta tijekom 8 – 12 mjeseci radi potvrde eliminacije virusa i oporavka. Ako je u oba određivanja HCV RNK negativna, podrazumijeva se da je HCV-infekcija spontano eliminirana [24, 27]. Negativan nalaz HCV RNK u serumu anti-HCV pozitivne osobe može se naći i u periodu niske viremije u ranoj akutnoj HCV-infekciji te se nalaz HCV RNK treba ponoviti u naredna 4 tjedna [39].

Metode za dokazivanje HCV RNK mogu se koristiti kao probirne metode pri testiranju davatelja krvi (što se radi u Hrvatskoj), za dokazivanje HCV-infekcije u bolesnika na hemodijalizi te u dojenčadi anti-HCV pozitivnih majki. Određivanje antigena HCV smatralo se da bi moglo zamijeniti određivanje HCV RNK, ali se nije pokazalo kao dobra alternativa standardnoj molekularnoj dijagnostici. U slučaju negativnog rezultata HCVAg obavezno je napraviti testiranje HCV RNK [27]. Laboratorijska tehnologija usmjerena na razvoj aparaturnih testova ima mogućnost određivanja kako antigena tako i protutijela te se sve češće zbog različitih metoda počinje koristiti pojam imunotesta (IA) koji zamjenjuje pojam EIA i ranije korišteni ELISA.

Potvrdni anti-HCV (imunoblot, RIBA (*recombinant immunoblot assay*)) testovi koriste se kao dodatni testovi u situacijama u kojima će potvrditi ili isključiti značenje reaktivnih rezultata probirnih EIA testova u osoba koje su HCV RNK negativne [27]. Prednost imunoblota testa je u tome da je to standardizirani serološki test visoke specifičnosti. Imunoblot test se ne koristi u svim laboratorijima koji rade testiranje na HCV budući da je postupak testiranja složeniji, zahtijeva određenu opremu i stručnost osoblja te se IB testovi rade u referentnim centrima.

Imunoenzimski testovi koji su se pojavili zadnjih godina imaju mogućnost određivanja protutijela na pojedinačne antigene HCV, što u rezultatima odgovara reaktivnosti protutijela u IB testu. Izvoditi se mogu u laboratorijima koji imaju mogućnost izvođenja EIA kao potvrdni testovi. Usporedba rezultata metodama potvrdnih testova IB i EIA pokazuje dobru korelaciju što je pokazalo i ovo preliminarno istraživanje na malom broju uzoraka.

## Zaključak

Predstavili smo imunoenzimski potvrdni test za protutijela anti-HCV, *EIA-Anti-HCV-Spectrum*, koji je pokazao dobru korelaciju sa standardnim imunoblot testom. Naši preliminarni podatci ukazuju da bi se obzirom da se određuju specifična protutijela na pojedinačne antigene HCV-a, kao u standardnom IB testu, ovaj EIA test mogao koristiti kao alternativni potvrdni test u uvjetima gdje nije moguće koristiti imunoblot metodu. Potrebno je napraviti širu evaluaciju na većem broju uzoraka za donošenje sigurnijeg zaključka.

## Literatura

- [1] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter AJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or type B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767–70.
- [2] Purcell RH, Alter HJ, Dienstag JL. Non-A, non-B hepatitis. *Yale J Biol Med* 1976; 49: 243–50.
- [3] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genom. *Science* 1989; 244: 359–62.

- [4] Choo QL, Richman KH, Han JH, i sur. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2451–5.
- [5] Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Viral hepatitis. In: Cook GC, Zumla A (eds). *Manson's tropical diseases*. 21st ed. WB Saunders, Edinburgh, 2003; pp 707–23.
- [6] Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81: 1631–48.
- [7] Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997; 78: 2397–410.
- [8] Drazan K. Molecular biology of hepatitis C. *Liver Transpl* 2000; 6: 396–406.
- [9] Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2406–15.
- [10] Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlowsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 39: 5–19.
- [11] Sillanpää M, Melén K, Porkka P, i sur. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virology* 2009; 6: 84–95.
- [12] Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. *Int J Med Sci* 2006; 3: 29–34.
- [13] Fafi-Kremer S, Fauvelle C, Felmlee DJ, i sur. Neutralizing Antibodies and Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* 2012; 4: 2016–30.
- [14] Okamoto H, Kojima M, Okada S, i sur. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8,2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894–9.
- [15] Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, i sur. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19: 1321–24.
- [16] Simmonds P, Bukh J, Combet C, i sur. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42:962–73.
- [17] Timm J, Roggendorf M. Sequence diversity of hepatitis C virus: Implications for immune control and therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4808–17.
- [18] Pavio N, Lai MC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 2003; 28: 287–304.
- [19] Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 1999; 7: 402–10.
- [20] Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory Diagnostics for Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis* 2012; 55 (suppl 1): S43–48.
- [21] Vince A, Iščić-Beš J, Židovec Lepej S, i sur. Distribution of hepatitis C genotypes in Croatia – a 10 year retrospective study of four geographic regions. *Coll Antropol* 2006; 30: 139–43.
- [22] HepC WHO fact sheet 164. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en>
- [23] EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014; 60: 392–420.
- [24] Vince A, Židovec Lepej S, Kurelac I, i sur. Suvremena dijagnostika i liječenje hepatitis C. *Infektol Glasn* 2009; 29: 49–56.
- [25] Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. AASLD Practice Guidelines. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update. *Hepatology* 2009; 46: 1335–74.
- [26] Smith BD, Morgan RL, Beckett GA, Falck-Ytter Y, Holtzman D, Ward JW. Hepatitis C virus testing of persons born during 1945–1965: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention. *Ann Intern Med* 2012; 157: 817–22.
- [27] Poljak M, Židovec Lepej S, Đaković Rode O. Novosti u serološkoj i molekularnoj dijagnostici hepatitis B i C. *Acta Med Croat* 2013; 67: 281–90.
- [28] Albeldawi M, Ruiz-Rodriguez E, Carey WD. Hepatitis C virus. Prevention, screening, and interpretation of assay. *Cleve Clin J Med* 2010; 77: 616–26.
- [29] Caruntu FA, Benea L. Acute hepatitis C virus infection: diagnosis, pathogenesis, treatment. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 249–56.
- [30] Richter SS. Laboratory Assays for Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4407–12.
- [31] Đaković Rode O. *Point-of-care* (POC) testiranje u dijagnostici infektivnih bolesti. *Infektol Glasn* 2012; 32: 25–30.
- [32] Lee SR, Kardos KW, Schiff E, i sur. Evaluation of a new, rapid test for detecting HCV infection, suitable for use with blood or oral fluid. *J Virol Methods* 2011; 172: 27–31.
- [33] Cha YJ, Park Q, Kang ES, i sur. Performance evaluation of the OraQuick hepatitis C virus rapid antibody test. *Ann Lab Med* 2013; 33: 184–9.
- [34] Seme K, Poljak M, Babič DZ, Močilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol* 2005; 32: 92–101.
- [35] Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H i sur. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002; 36: 211–18.
- [36] Hadziyannis E, Minopetrou M, Georgiou A, Spanou F, Koskinas J. Is HCV core antigen a reliable marker of viral load? An evaluation of HCV core antigen automated immunoassay. *Ann Gastroenterol* 2013; 26: 1–4.
- [37] Park Y, Lee JH, Kim BS, Kim do Y, Han KH, Kim HS. New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2253–56.
- [38] Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu MG, Uyar Y. Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4089–93.
- [39] Chevaliez S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 116–21.
- [40] Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection—a systematic review. *JAMA* 2007; 297(7): 724–32.
- [41] Židovec Lepej S, Dušek D, Budimir J, Vince A. Molekularna dijagnostika infekcije virusom hepatitis C i hepatitis B. *Acta Med Croat* 2009; 63: 361–69.
- [42] Martin P, Fabrizi F, Dixit V, i sur. Automated RIBA Hepatitis C Virus (HCV) Strip Immunoblot Assay for Reproducible HCV Diagnosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 387–90.
- [43] Bochkova G, Fomina S, Puzyrev V, Obriadina A, Burkov A, Ulanova T. The evaluation of the ELISA kit "DS-EIA-anti-HCVSPECTR-GM" as supplemental assay for confirmation of anti-HCV screening positive results. *ESCMID Milan* 2011; P.2235.