

dr med. Janusz J. Stańczak, mgr Urszula
Komorowska st. technik Ewa Tobolewska, mgr
Michał J. Majchrzak

Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie
kierownik: dr med. Janusz J. Stańczak

Współczesna diagnostyka zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV)

Modern diagnostics of Hepatitis C Virus

Słowa kluczowe:

Wirus zapalenia wątroby typu C, testy diagnostyczne, genotypy występujące w Polsce

Streszczenie:

Przedyskutowano replikację, genetyczną heterogenność i zróżnicowanie HCV. Przedstawiono epidemiologię HCV w Polsce. Omówiono powstanie i doskonalenie testów diagnostycznych, ich usprawnianie, zakresy czułości i specyficzności oraz możliwe kierunki rozwoju. Przedstawiono najnowsze systemy badawcze i diagnostyczne, takie jak real-time PCR i DNA chipy. Przedstawiono wyniki identyfikacji genotypów HCV w Polsce i zmianę ich wzorca.

Key words:

Hepatitis C Virus, diagnostic tests, genotypes in Poland

Summary:

The replication of HCV, its genetic heterogeneity and diversity were discussed. Epidemiology of hepatitis C in Poland was presented. Modern serological and genetic tests were discussed including their development, improvement, sensitivity and specificity and possible ways of evolution. Newest scientific and diagnostic systems such as real time PCR with TaqMan technology and DNA chips were presented. Changes in the HCV genotype pattern observed in Poland were presented and discussed.

Wstęp

Wirus zapalenia wątroby typu C (*Hepatitis C Virus* - HCV) jest ostatnim odkrytym wirusem hepatotropowym przenoszonym drogą krwi, chorobotwórczym dla ludzi [1]. Później zidentyfikowane wirusy GBV-C [2] i jego genetyczny synonim HGV [3] oraz wirus TTV [4] najprawdopodobniej nie są patogenami.

W 2003 r. ilość wirusowych zapaleń wątroby typu C (wzw C) przekroczyła w Polsce liczbę wzw typu B (*rycina T*) [5]. Jest to skutkulowany wynik skutecznej profilaktyki swoistej zakażeń HBV oraz braku takiej wobec HCV. Mimo intensywnych prac skuteczna szczepionka anti-HCV nie jest jeszcze dostępna. Co gorsza, 50-70% osób

z wzw C jest rozpoznawanych w fazie przewlekłego zapalenia wątroby i nie potrafimy stwierdzić ani momentu zakażenia ani czynnika ryzyka [6]. Świadczy to zarówno o niskiej jakości wywiadów epidemiologicznych, jak i „skrytości” zakażenia HCV i wykrywania go w sposób przypadkowy.

Leczenie wzw C staje się coraz skuteczniejsze. Najnowsze schematy leczenia skojarzonego (pegylowany interferon z ribawiryną) są znacznie skuteczniejsze niż pierwsze schematy zawierające interferon. Jednak, głównie z powodu typów genetycznych dominujących w Polsce, u 40-60% leczonych nie uzyskuje się eradykacji wirusa.

Diagnostyka zakażeń wirusem C wykorzystuje dwie różne grupy

testów. Diagnostyka serologiczna wykorzystując udoskonalane generacje testów, wykrywa przeciwciała, od kilku lat jest również możliwe identyfikowanie antygenów rdzeniowego (*core-c*) HCV. Diagnostyka genetyczna umożliwia wczesne wykrycie materiału genetycznego wirusa, ocenę ilościową wirusii (test bardzo przydatny w ocenie zaawansowania zakażenia i monitorowaniu skuteczności leczenia) oraz kompletną charakterystykę genetyczną wirusa - typ i subtyp, mutanty i warianty ewolucyjne. Utrudnieniem skutecznej diagnostyki jest wysoka zmienność genetyczna wirusa.

Zamiarem autorów jest przedstawienie diagnostyki laboratoryjnej

wykorzystującej markery wirusa. Dlatego nie dyskutujemy przydatności i roli diagnostycznej oznaczania klasycznych markerów uszkodzenia wątroby, takich jak aktywność enzymów wątrobowych, alkalicznej fosfatazy, stężenia bilirubiny lub oceny histopatologicznej materiału biopsyjnego.

Zróźnicowanie genetyczne HCV

Materiał genetyczny w postaci RNA, organizacja genomu, sekwencje nukleotydów oraz inne cechy fizykochemiczne spowodowały zaklasyfikowanie HCV do rodziny Flaviviridae. Niska wierność replikacji, typowa dla wirusowej polimerazy RNA oraz brak mechanizmów naprawczych są głównymi przyczynami zróźnicowania i zmienności genetycznej HCV. Wirus istnieje jako heterogenna populacja wariantów genetycznych. Wyodrębniono co najmniej sześć głównych typów genetycznych, dalej zróźnicowanych na 37-110 podtypów [7]. Pojawiły się doniesienia o następnych genotypach, oznaczanych 7-11, identyfikowanych w krajach Azji Południowo-Wschodniej. Różnice w sekwencjach nukleotydów pomiędzy poszczególnymi genotypami sięgają 35%, a pomiędzy subtypami dochodzą do 20% [8]. Genotypy różnią się występowaniem geograficznym [9], są także najważniejszym czynnikiem wirusowym warunkującym podatność na leczenie przeciwwirusowe. W organizmach zakażonych HCV dodatkowo wykazuje wysoką zmienność osobniczą, będącą skutkiem kumulowania mutacji w kolejnych rundach replikacji. Mutacje powstają najczęściej w odcinkach hiperzmiennych genomu, na granicy regionu E2/NS1 (*hypervariable region* - HVR1 i HVR2) [10]. Powstające mutanty są poddawane silnej presji mechanizmów odpornościowych zakażonego organizmu, doprowadzającej do selekcji wariantów o najwyższej wydolności replikacyjnej. Ostatecznym efektem jest powstawanie tzw. szczepów rzekomych (*quasispecies*). Kolejno izolowane warianty mogą różnić się nawet do 10%. Liczne prace próbowały ocenić zależność między

pojawianiem się *quasispecies* i ich złożonością a skutecznością leczenia. Uzyskane wyniki są niejednoznaczne, a ocena nie została upowszechniona w rutynowej diagnostyce.

Kolejne próby wykazania zależności między ilością mutacji a skutecznością leczenia zaowocowały identyfikacją tzw. regionu ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region*). ISDR jest położony między kodonami 2209 a 2248 w regionie NS5A. Badacze japońscy udowodniali, że szczepy nie zmutowane w tym regionie, dzięki, zawierające sekwencję typową dla prototypowego izolatu HCV1b, są niepodatne na leczenie interferonem. Natomiast szczepy niosące co najmniej 4 substytucje są łatwo eliminowane terapią interferonową [11, 12]. Istnieją jednak doniesienia przeciwne, sugerujące, że te zmiany są specyficzne jedynie dla izolatów japońskich - porównania sekwencji izolatów europejskich i amerykańskich nie wykazały takiej zależności [13, 14].

Podstawowe metody analizy genetycznej HCV

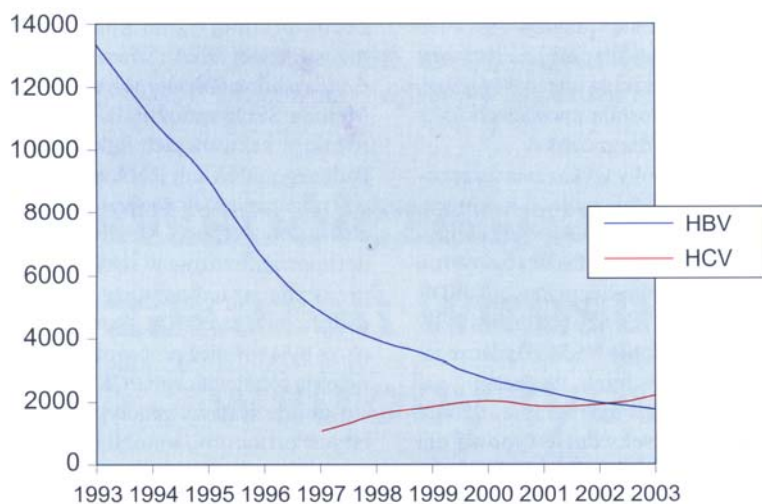
Podstawową metodą oceny zmienności genetycznej HCV jest sekwencjonowanie DNA, produktu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Najbardziej powszechna jest opublikowana w 1977 r. metoda Sangera i wsp. [15]. Wykrywa ona wszelkie zmiany sekwencji nukleotydów badanego fragmentu genomu. W oznaczaniu genotypu HCV najczęściej sekwencjonuje się genotypowo swoiste regiony genomu HCV - 5'UTR, E2/NS1 lub NS5. Sekwencjonowanie jest metodą najbardziej informatywną, jednocześnie kosztowną, wymagającą skomplikowanego wyposażenia i pracowników o dużym doświadczeniu. Metodą prostszą i tańszą jest, najczęściej stosowana, hybrydyzacja produktów PCR z genotypowo swoistymi sondami. Dla celów badawczych i epidemiologicznych używane są mniej lub bardziej wyrafinowane procedury: ocena polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*Restriction Fragment Length Polymorphism* — RFLP), wykorzystująca trawienie produktu endonukleazami restrykcyjnymi,

ocena polimorfizmu konformacji przestrzennej DNA (*Strand-Specific Conformation Polymorphism* - SSCP). Metoda SSCP umożliwia wykrycie różnic w sekwencjach nukleotydów badanego DNA lub RNA na podstawie różnic migracji podczas rozdzielania elektroforetycznego. Możliwe jest też definiowanie różnic w sekwencji poprzez pomiar temperatury topnienia dwuniciowego cDNA. Przez pewien okres była również propagowana technologia zróźnicującego PCR, w której stosowano zestawy genotypowo swoistych primerów, umożliwiających amplifikację fragmentów cDNA poszczególnych genotypów.

Typ genetyczny HCV może być także zidentyfikowany poprzez wykrycie testem EIA przeciwciał genotypowo specyficznych - tzw. serotypowanie. Test Murex HCV Serotyping 1-6 Assay (Murex Dian, UK) umożliwia rozróżnienie 6 głównych typów genetycznych. Oceniane są przeciwciała przeciwko białkom rdzenia i regionu NS4. Czulość testu umożliwia ustalenie typu genetycznego u ok. 85-90% pacjentów z przewlekłym wzw C, natomiast nic jest możliwa identyfikacja subtypów [16]. Zgodność z wynikami testów genetycznych wynosi ok. 95%. Test nie zapewnia rozróżniania zakażeń mieszanych, może być akceptowalną alternatywą przy niskich funduszach.

Diagnostyka serologiczna

Diagnostyka serologiczna zakażeń HCV wykrywa testami immunoenzymatycznymi (EIA, ELISA) przeciwciała skierowane przeciwko różnym epitopom wirusa. Powstały trzy generacje testów przesiewowych wykrywających przeciwciała anty-HCV. Pierwsza (1989 r.) zawierała antygen rekombinacyjny, pochodny regionu NS4. Druga generacja (1992 r.) zawiera antygeny regionów core i NS3, zapewnia znacznie wyższą czulość i swoistość detekcji, skraca czas okienka serologicznego o 4-10 tyg. Trzecia generacja (1994-5 r.) zawiera zmodyfikowane antygeny core i NS3 oraz antygen właściwy regionowi NS5. Wykazuje wyższą czulość,



Rycina 1. Ilości wirusowych zapaleń wątroby typu B i C wykrywanych w Polsce [5]

natomiast praktycy mają zastrzeżenia do specyficzności, wskazując stosunkowo częste przypadki uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich.

Wyniki testów przesiewowych są weryfikowane testami potwierdzenia. Najbardziej powszechny test RIBA (*rekombinant immunoblot assay*), zawiera antygeny podobne do obecnych w testach II generacji, wykorzystuje technologię immunoblottingu. Powstały trzy generacje tego testu. RIBA-3 jest spotykana w laboratoriach, jednak obecnie częściej potwierdza się zakażenie testem genetycznym RT PCR HCV.

Od 2002 r. jest też dostępny test Track-C (Ortho Clin. Diagn) wykrywający antygen rdzeniowy HCV. Umożliwia ilościową ocenę antygeny, skraca znacząco długość okienka serologicznego w porównaniu do testów wykrywających przeciwciała. Jest swoisty, natomiast jego czułość znacznie różni się od oferowanej przez testy genetyczne - wykrywa antygenem dopiero przy 8-10 tys. IU HCV/ mL (IU- *International Unit* -jednostka międzynarodowa, jest równa ok. 2,6 kopiom HCV wykrywanym testem ilościowym PCR) [17].

Długość okienka serologicznego w zakażeniu HCV jest osobniczo specyficzna. Przeciętnie po 7-8 tygodniach od zakażenia pojawiają się wykrywalne przeciwciała, okres ten może być jednak znacznie dłuższy. Po samoistnej eliminacji zakażenia

przeciwciała mogą utrzymywać się dożywno, u niektórych pacjentów stopniowo zanikają [18]. Znacznie utrudniona jest diagnostyka serologiczna pacjentów leczonych immunostatykami, z upośledzonym wytwarzaniem przeciwciał; podobny problem istnieje wśród pacjentów leczonych hemodializami.

Testy serologiczne są oferowane przez właściwie wszystkie duże firmy diagnostyczne.

Najnowszą rozwijaną technologią jest technologia tzw. chipów serologicznych. Podobnie jak diskutowana poniżej metoda DNA chipów zawiera ona płytkę silikonową, na którą są nanoszone przeciwciała przeciwko wybranym wirusom. W reakcji serologicznej antygeny wirusów obecnych w badanej próbce są przez nie rozpoznawane i wiązane. Komputerowy system detekcji umożliwia wykrycie i identyfikację rodzajów i odmian wirusów. Pierwszy doświadczalny chip - ViriChip - został skonstruowany przez firmę BioForce Nanosciences (USA) [19].

Diagnostyka genetyczna

Testy genetyczne umożliwiają maksymalnie czułe i specyficzne wykrycie RNA HCV oraz jego charakterystykę. Większość z nich wykorzystuje powielanie specyficznie wykrytego fragmentu genomu wirusa. Najczęściej stosowana jest metoda PCR, poprzedzona odwrotną transkrypcją

(reverse transcription) RNA HCV na cDNA. Inne testy oparte na amplifikacji to metody NASBA oraz TMA. W odróżnieniu od PCR przebiegają bez cyklicznych zmian temperatury, są bardziej złożone biochemicznie a ich produktem jest RNA.

Zadaniem testów jakościowych jest wykrycie RNA HCV. Właściwie wszystkie firmy biotechnologiczne wytwarzają takie testy. W praktyce można jeszcze spotkać warianty tworzone samodzielnie w laboratoriach (tzw. *in-house* PCR), nie spełniają one jednak standardów niezbędnych dla certyfikacji testu.

Bardzo przydatne są testy ilościowe, oceniające poziom wirerii (ang. *viral load*) HCV. Wartość ta jest drugim, obok genotypu, czynnikiem prognostycznym prawdopodobieństwa wyleczenia i podstawowym markerem skuteczności terapii. Najczęściej stosowane testy to Amplicor HCV Monitor v. 2 (Roche Diagn. Syst) oraz LC x HCV RNA Quantitative Assay (Abbott Diagn.). Oferowane zakresy czułości umożliwiają wykrycie już 23-50 IU/mL przy jednoczesnej liniowości pomiaru sięgającej 7,5 do 15 x 10⁵ IU/mL.

Inna technologia wykorzystuje zwiększanie intensywności sygnału po reakcji hybrydyzacji - metodę rozgałęzionego DNA (*branched DNA* - bDNA). Dostępny jest test Versant HCV RNA 3.0 Quantitative Assay (Bayer Diagn.). Ma on czułość i zakres pomiaru podobne do metod PCR. Jedyną wadą jest konieczność kolekcjonowania próbek, gdyż ekonomicznie uzasadnione jest testowanie kilkudziesięciu próbek jednocześnie. W przyjętych porozumieniach jednak technika PCR jest uznana za diagnostyczny „*gold standard*”.

Najnowsze testy diagnostyczne wykorzystują zasadę real-time PCR wraz z technologią TaqMan. Zasada ta to fluorescencyjna detekcja produktu PCR w czasie reakcji, po każdym cyklu amplifikacji, i wyliczenie wyjściowej ilości poszukiwanego materiału genetycznego. Cenną zaletą jest bardzo wysoka czułość połączona z liniowością pomiaru sięgającą 1-100 x 10⁶ IU/mL. Bardzo ważna jest również hermetyczność systemu - próbki nie jest otwierana po reakcji, więc ry-

Tabela 1. Testy stosowane w różnych fazach diagnostyki wzw C

Metoda	Badanie przesiewowe	Potwierdzenie	Strategia leczenia	Odpowiedź na leczenie	Rokowanie trwałej odpowiedzi
Aktywność ALT/AST	X			X	
EIA anty-HCV	X				
Test potwierdzenia (RIBA)		X			
RT PCR HCV RNA jakościowy		X		X	
RT PCR HCV ilościowy			X	X	X
Genotypowanie HCV			X		X

zyko kontaminacji produktami reakcji PCR jest całkowicie wyeliminowane. Sądzymy, że metoda real-time PCR szybko się upowszechni.

Możliwości rozpoznania typu genetycznego HCV dyskutowaliśmy powyżej. W rutynowej diagnostyce najczęściej stosuje się test hybrydizacji HCV INNO-LiPA II (Innogenetics, obecnie przejęty przez Bayer). Najnowszy wariant testu umożliwia rozróżnienie 7 genotypów (1-6 i 10) oraz 16 subtypów. Metodą alternatywną jest sekwencjonowanie regionów genotypowo swoistych. Najczęściej jest stosowany test TRUGENE HCV genotyping Kit (Visible Genetics, Canada). Uzyskane sekwencje mogą być dodatkowo wykorzystywane do konstruowania tzw. drzew filogenetycznych opisujących pokrewieństwo genetyczne izolatów. Wadą metody jest złożoność i cena.

Najprawdopodobniej metodą rewolucjonizującą diagnostykę genetyczną będzie technologia DNA chipów (mikromacierzy). W tej metodzie na nośnik, najczęściej płytkę krzemową, nanoszone są oligonukleotydy - krótkie łańcuchy jednoniciowego DNA. Podczas hybrydizacji, jako sondy, wykrywają w badanej próbce sekwencje komplementarne DNA lub RNA. Jest możliwe skonstruowanie chipa wykrywającego np. RNA HCV, określającego jego ilość oraz identyfikującego wszystkie znane warianty genetyczne i mutanty.

Przedstawione metody genetyczne umożliwiają najwcześniejsze wykrycie zakażenia. Często uzyskuje się wynik dodatni testu PCR, bez wykrywanych przeciwciał. Sugeruje to fazę ostrą zakażenia, najczęściej później potwierdzaną serokonwersją.

Pierwsze wersje testów, optymalizowane wobec sekwencji genotypów 1a i 1b, wykazywały niższą czułość i swoistość wobec innych genotypów. Najnowsze, zawierające zmodyfikowane primery i sondy, są pozbawione tej wady.

Diagnostyka HCV w praktyce klinicznej

W tabeli 2 przedstawiliśmy zastosowanie poszczególnych testów w różnych fazach diagnostyki HCV. Zgodnie z zaleceniami po wykryciu zakażenia HCV, przed inicjacją terapii, należy zidentyfikować genotyp HCV oraz poziom wirēmii. Te dwa czynniki są niezależnymi markerami prawdopodobieństwa eliminacji HCV, umożliwiają rokowanie wyników leczenia oraz optymalizację schematu i czasu leczenia. Natomiast poziom wirēmii nie jest skorelowany z zaawansowaniem zakażenia ani stopniem uszkodzenia wątroby.

Zalecana ocena ilościowa wirēmii w 12 tygodniu terapii umożliwia identyfikację pacjentów z małym prawdopodobieństwem trwałego wyleczenia - w licznych badaniach klinicznych

wykazano, że jedynie u 3% pacjentów leczonych pegylowanym interferonem z ribawiryną, u których spadek wirēmii jest niższy niż 2 log₁₀, następuje eliminacja wirusa. Tak niski odsetek nie uzasadnia kontynuacji leczenia zarówno ze względów medycznych (objawy uboczne), jak i ekonomicznych. Zgodnie z przyjętymi ustaleniami przerywa się leczenie tej grupy pacjentów [20].

Schemat aktualnie zalecanego algorytmu decyzyjnego przedstawiono na *rycynie 2*.

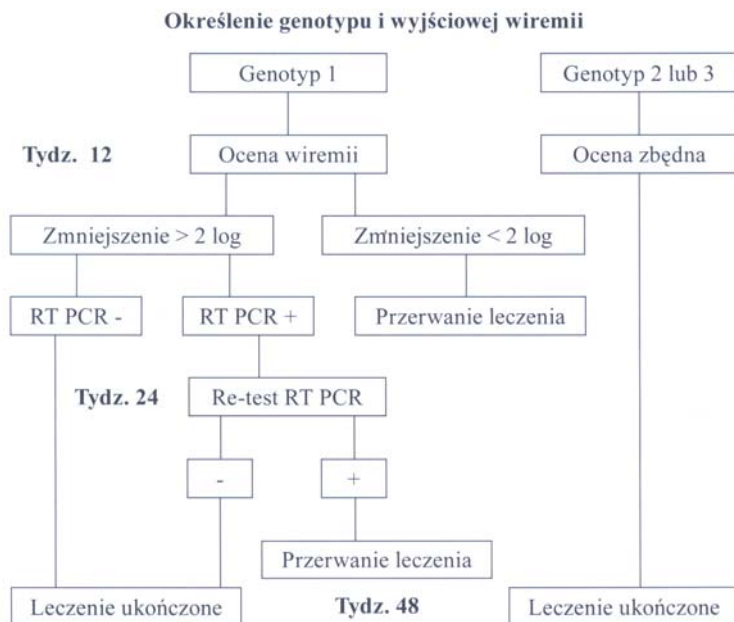
Zalecane jest także wykonanie jakościowego testu RT PCR w 24 tygodniu po zakończeniu leczenia. Wynik ujemny oznacza jednoznacznie eliminację HCV.

Materiałem diagnozowanym w kierunku HCV może być surowica, osocze lub materiał biopsyjny. W naszej Pracowni, po doniesieniach o pozawątrobowym występowaniu HCV [21] opracowaliśmy metodę identyfikującą RNA HCV w komórkach jednocządrzastych krwi obwodowej [22, 23]. Uzyskane wyniki wskazują, że użycie mononuklearów w miejsce surowicy jako źródła RNA HCV czyni test RT

Tabela 2. Zmiany rozkładu typów genetycznych HCV w Polsce

Genotyp/Grupa		II ⁽²⁴⁾ n=1 385	III n=1 089
1a	11,5	12,6	5,1
1b	83,3	80,3	71,8
2a	1,0	1,0	0,5
3a	4,2	3,4	20,1
4c4d	0,0	2,7	1,5
4e	0,0	0,0	0,2
Zakażenie	0,0	0,0	0,8

n - liczba badanych próbek



Rycina 2. Zalecany schemat diagnozowania leczonych pacjentów z przewlekłym wzv C

PCR bardziej czułym, zwłaszcza u pacjentów leczonych.

Identyfikacja genotypów HCV występujących w Polsce

Badania genetyczne HCV zainicjowano w Polsce w 1991 r. w Instytucie Hematologii w Warszawie. Pierwsze oznaczenia genotypów wykonywane były metodą sekwencjonowania, następnie wprowadziliśmy test odwrotnej hybrydyzacji - INNO-LiPA firmy Innogenetics (Belgia), obecnie Versant HCV (Bayer Diagn., Niemcy). Kolejne grupy były analizowane w latach 1995-99 [24, 25] i 2001 - do chwili obecnej. Ilości próbek i rozkład genotypów przedstawiono w *tabeli 1* [26]. Wykazano, że dominującym w Polsce genotypem HCV jest 1b, charakterystyczny dla naszego regionu Europy. Podobne dane były uzyskane w innych ośrodkach [27].

Porównanie wyników kolejnych badanych grup pacjentów, znacznie liczniejszych i zróżnicowanych terytorialnie, wykazało ciekawą tendencję wypierania pierwotnego (prawdopodobnie) genotypu 1b przez typy genetyczne swoiste dla innych regionów

geograficznych - 3a (południe Europy) oraz 4 (Egipt, Północna Afryka). W ciągu dekady odsetek pacjentów zakażonych genotypem 1b zmniejszył się od 88,6% do 71,8%. Zwiększa się natomiast częstość identyfikacji typu 3a, od 4,2% do ponad 20%.

Badania te wykonujemy dla większości ośrodków leczących pacjentów z wzv C, w wielu programach klinicznych. W wynikach zawartych w grupie III oznaczyliśmy genotypy HCV u pacjentów z 11 ośrodków całej Polski. Rozmieszczenie geograficzne klinik oraz ilości przesyłanych przez nie próbek uzasadniają wniosek, że uzyskane wyniki są reprezentatywne dla pacjentów z wzv C kwalifikowanych do leczenia w Polsce.

Sądzymy, że bezpośrednią przyczyną obserwowanych zmian jest nasilenie migracji do i z Polski, wynikające i z liberalizacji politycznych i ze skokowo zwiększonej siły nabywczej złotówki. Niezależnie od przyczyn, dryf genetyczny genotypów HCV winien, równoległe z wprowadzaniem skuteczniejszych schematów leczenia wzv C, spowodować zwiększenie odsetka pacjentów trwale eliminujących wirusa. Niepokojącym wynikiem wykonanych badań jest

wykrycie zmniejszającej się częstości rozpoznania grupy ryzyka.

Podobną tendencję zmian we wzorcu wariantów genetycznych obserwujemy w przypadku subtypów wirusa HIV-1. Pierwsza analiza wykonana w Polsce w 1997 r. wykazała, że u obywateli polskich, najprawdopodobniej zakażonych w Polsce, występował wyłącznie subtyp B [28]. Natomiast w badaniu wykonanym w 2002 r. w podobnej grupie pacjentów wykryto subtyp B u 88,2% pacjentów; 11,8% diagnozowanych było zakażonych subtypami nie-B [29]. W tej grupie zidentyfikowaliśmy subtypy CRF03_AB i CRF05_DF, najczęściej spotykane wśród pochodzących z krajów byłego ZSRR kobiet trudniących się nierządem i narkomanów przyjmujących narkotyki dożylnie [30].

Zakończenie

Genetyka molekularna umożliwiła szybką identyfikację i charakterystykę HCV. Wykorzystując metody genetyki molekularnej, stworzono wiarygodne testy serologiczne. Jednak dopiero testy genetyczne zapewniają pełne opisanie szczepów zakażających pacjenta, rokowanie szans wyleczenia oraz monitorowanie terapii.

Upowszechnienie przedstawionych metod znacznie zwiększa możliwości diagnozowania zakażeń HCV oraz racjonalizacji leczenia. Powszechnie uznaje się typ genetyczny HCV oraz wyjściowy poziom wirēmii za podstawowe, niezależne, czynniki umożliwiające rokowanie wyników leczenia [31, 32]. Istnieje konsensus głoszący, że największe szanse wyleczenia mają pacjenci zakażeni genotypem innym niż 1a/1b, z niskim poziomem wirēmii ($<10^4$ IU/mL), przed 50 rokiem życia [33]. Jakość prognostyczna innych cech zakażenia HCV, takich jak obecność szczepów rzekomych lub ilość mutacji w hipotetycznym regionie ISDR, nie jest jednoznaczna. Niestety ani rozwój technik badawczo-diagnostycznych, ani coraz pełniejsze poznanie biologii HCV nie umożliwiły dotychczas poznania tych cech HCV, które jednoznacznie ułatwiłyby kwalifikowanie pacjentów do skutecznego leczenia.

Nie istnieje jedna, powszechnie zaakceptowana strategia diagnostyki genetycznej HCV.

Przedstawione techniki diagnostyki genetycznej są szybkie, czułe i swoiste. Testy genetyczne są stosowane w różnych stadiach zakażenia. Wykrywają zakażenie i potwierdzają wyniki testów przesiewowych, a ocena przed leczeniem genotypu i poziomu wirerii umożliwia wybór właściwej strategii leczenia.

Jednak, zwłaszcza ich czułość, wymusza zastosowanie prawidłowego toku diagnostycznego, ochrony próbek przed czynnikami zewnętrznymi i możliwymi zanieczyszczeniami. Wymagane są wysokie kwalifikacje personelu oraz zmiana mentalności - znane są kuriozalne przypadki zanieczyszczenia pobranych próbek lub ich „uśrednienia” np. przez zbieranie surowic tą samą pipetą lub pobieranie krwi do próbek bakteriologicznych zamykanych gumowym korkiem (obserwacje Pracowni). Uważamy, że wszystkie laboratoria stosujące testy genetyczne winny uczestniczyć w międzynarodowych programach kontroli jakości. Niezbędne są również intensywne kontakty z klinicystami, w celu ustalenia czasu, metod i celowości zlecanej diagnostyki.

Racjonalnie stosowana nowoczesna diagnostyka, choć często droga, może, w efekcie końcowym, obniżyć całkowite koszty leczenia.

Piśmiennictwo:

1. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J.: *Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.* Science 1989; 244: 359.
2. Leary T.P., Muerhoff A.S., Simons J.N. et al.: *Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis.* i Med Virol. 1996; 48(1): 60-7.
3. Linnen J., Wages J. Jr., Zhang-Keck Z.Y. et al.: *Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transnsion-transmissible agent.* Science. 1996; 271 (5248): 505-8.
4. Nishizawa T., Okamoto H., Konishi K. et al.: *A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology.* Biochem Biophys Res Commun. 1997; 241(1): 92-7.
5. *Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne w Polsce.* Państwowy zakład Higieny, Warszawa 2004.
6. Materiały Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego, Warszawa
7. Simmonds P, Holmes E.C., Cha T.A.: *Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region.* J.Gen. Virol. 1993; 74: 2391.
8. Okamoto H., Okada S., Sugiyama Y.: *Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions.* J.Gen. Virol. 1991; 72: 2697.
9. Hino K., Sainokami S., Shimoda K.: *Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C.* J. Med. Virol. 1994; 42: 299.
10. Weiner A.J., Brauer M.J., Rosenblatt J. et al.: *Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins.* Virology 1991; 180: 842.
11. Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y. et al.: *Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus lb.* J Clin Invest 1995; 96: 244.
12. Enomoto E., Sakuma I., Asahina Skuma et al.: *Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus lb infection.* N Engl J Med. 1996; 334: 77.
13. Zein N.N., Rakela J., Krawitt E.L.: *Hepatitis C virus genotypes in the United States: Epidemiology, Pathogenicity, and Response to Interferon therapy.* Ann Intern Med. 1996; 125: 634.
14. Zeuzem S., Lee J.H. and Roth K.: *Mutations in the nonstructural 5A gene of European Hepatitis C Virus isolates and response to Interferon alfa.* Hepatology 1997; 25: 740.
15. Sanger F, Nicklen S., Coulson A.R.: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74(12): 5463-7.
16. Kobayashi M., Chayama K., Arase Y. et al.: *Enzyme-linked immunosorbent assay to detect hepatitis C virus serological groups 1 to 6.* J Gastroenterol 1999; 34: 505-509.
17. Bouvier-Alias M, Patel K., Dahari H. et al.: *Clinical utility of total HCV core antigen quantitation: a new indirect marker of HCV replication.* Hepatology 2002; 36: 211-218.
18. Lefrere J.J., Guiramand S., Lefrere R et al.: *Full or partial seroconversion in patients infected by hepatitis C virus.* J Infect Dis 1997; 175: 316-322.
19. Nettikadan S.R., Johnson J.C., Vengasandra S.G. et al.: *ViriChip: a solid phase assay for detection and Identification of viruses by atomic force microscopy.* Nanotechnology 2004; 15: 383-389.
20. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement:

- Management of hepatitis C.* Hepatology 2002; 36: S3-20.
21. Muller H.M., Pfaff E., Goeser T. et al.: *Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication.* J Gen Virol 1993; 74: 669.
 22. Stańczak J.J., Opoka-Kegler I., Lipniacki A. et al.: *Peripheral blood mononuclear cells as a source of HCV RNA for the monitoring of response to interferon therapy.* J. Hepatology, 1996, (25) Suppl. 1, P/C10/136.
 23. Stańczak J.J., Opoka-Kegler J., Lipniacki A. et al.: *Peripheral blood mononuclear cell-based system for monitoring interferon therapy for hepatitis C virus infection.* Clin Inf Dis 1997; 25:746.
 24. Stańczak J.J., Medyńska J., Radlińska J. et al.: *Genotypic analysis of Hepatitis C Viruses isolated in Poland.* Falk Symposium 1995, Basel.
 25. Stańczak J.J., Opoka-Kegler J., Baran J. et al.: *Distribution of hepatitis C virus genotypes in Poland.* J Hepatol 1999,31:574.
 26. Stańczak J.J., Tobolewska E., Przybylska-Stengiel K. et. al.: *Changes in the pattern of Hepatitis c virus genotypes in Poland.* ICVHLD Sydney, April 2003.
 27. Brojer E., Gloskowska-Moraczewska Z., Kacperska E.: *Hepatitis C virus genotypes in blood donors and patients with chronic hepatitis C.* Vox Sang. 1996; 71(1): 51-428.
 28. Lipniacki A., Sheppard H.W., Dondero D.V. et al.: *Determination of HIV-1 subtypes in Polish patients using HMA method. Preliminary data.* Sixth European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Hamburg, November 1997
 29. Stańczak GP, Stańczak JJ, Przybylska-Stengiel K, Horban A.: *Changes in the pattern of Human Immunodeficiency Virus Type-1 subtypes in Poland.* XIth European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection, Glasgow, 2002.
 30. Lukashov V.V., Huismans R., Rakhmanova A.G.: *Circulation of subtype A and gagA/ envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections.* AIDS Res Hum Retroviruses. 1999; 20: 15.
 31. Davis G.L. and Lau J.Y.N.: *Factors Predictive of a Beneficial Response to Therapy of Hepatitis C.* Hepatology 1997; 26: 122S.
 32. Zeuzem S., Zeuzem S., Lee J.H. Franke A.: *Quantification of the Initial Decline of Serum Hepatitis C Virus RNA and Response to Interferon Therapy.* Hepatology 1998; 26: 1149.
 33. Neumann A.U., Neumann A.U., Lam N.P., Dahari H: *Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alfa therapy.* Science 1998; 282: 103.