

# MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA HEPATITISA C

---

**Grahovac, Blaženka; Hadžisejdić, Ita**

*Source / Izvornik:* **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2007, 43., 132 - 137**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:528368>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



## MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA HEPATITISA C

### MOLECULAR DIAGNOSIS OF HEPATITIS C INFECTION

*Blaženka Grahovac<sup>1</sup>, Ita Hadžisejdić<sup>A</sup>*

#### SAŽETAK

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) prepoznala je hepatitis C kao svjetski problem. Na osnovi procjena iz godine 1999., 170 milijuna ljudi bilo je kronično inficirano hepatitis C virusom (HCV). HCV vodeći je čimbenik neizlječivih oboljenja jetre, uključujući karcinom jetre. Za otkriće HCV-a godine 1989., zaslužni su molekularno-biološki postupci na kojima se zasniva suvremena dijagnostika hepatitisa C. Dijagnostički testovi dijele se na serološke testove kojima se dokazuju anti-HCV protutijela, te na molekularne testove kojima se u inficirane osobe dokazuje, određuje i obilježuje HCV-RNA genom. Kvalitativni molekularni testovi primjenjuju se za potvrđivanje infekcije, te u kontroli darivane krvi. Praćenjem broja virusnih kopija, kvantitativni HCV-RNA testovi daju podatke o odgovoru na antivirusnu terapiju. HCV jest heterogeni virus koji se na osnovi genomske promjenljivosti svrstava u 6 osnovnih genotipova, te u više podtipova. HCV genotipizacija bitna je za kliničara, budući da se prema pojedinome genotipu može procijeniti odgovor na antivirusnu terapiju, a određivanjem HCV genotipa odabire se optimalni terapijski postupak vezan uz duljinu razdoblja terapije i dozu ribavirina.

*Ključne riječi:* hepatitis C virus (HCV), HCV-RNA, HCV genotipovi, molekularna dijagnostika

#### ABSTRACT

The World Health Organization recognized hepatitis C (HCV) as a global health problem estimated that in 1999, over 170 million people were chronically infected with HCV. HCV is leading cause of end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma. The discovery of hepatitis C virus (HCV) in 1989 using molecular biology methods has led to the rapid evolution of the field of HCV diagnostics. Diagnostic tests for HCV can be divided into serological assays that detect antibody to HCV and molecular assays that detect, quantify and characterize HCV-RNA genome within infected patient. Qualitative molecular nucleic acid tests are used for confirmation of HCV infection and for screening blood donation. Quantitative HCV-RNA tests provide prognostic information for monitoring the response to antiviral therapy. HCV is heterogeneous virus with six distinct genotypes and numerous subtypes. HCV genotype tests are important clinically because they predict most accurately the chance of antiviral response and are routinely used for selecting treatment regimens regarding the duration of interferon therapy and ribavirin dosage.

*Key words:* hepatitis C virus (HCV), HCV-RNA, HCV genotypes, molecular diagnostics

#### UVOD

Hepatitis C prvi je put prepoznat kao zasebna bolest godine 1975., kada je ustanovljeno da približno 90% slučajeva poslijetransfuzijskoga hepatitisa nije uzrokovano tada poznatim virusima hepatitisa A ili B. Alter i suradnici bolest su nazvali non-A, non-B hepatitisom (NANB)<sup>1,2</sup>. Uspješnim prenošenjem NANB hepatitisa s inficiranih bolesnika na čimpanze, stvoren je model za daljnja istraživanja. Tijekom godine 1988., Choo i suradnici složenim su postupcima kloniranja iz plazme pokusno inficiranih čim-

<sup>1</sup>Laboratorij za molekularnu dijagnostiku Zavoda za patologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Primljeno: 1. rujna 2007.

Prihvaćeno: 10. rujna 2007.

Adresa za dopisivanje: prof. dr. sc. Blaženka Grahovac, Zavod za patologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka, tel.: +385 51 25 826, faks: +385 51 325 810, e-mail: blazenka.grahovac@medri.hr

panza, uspjeli izolirati virusnu nukleinsku kiselinu<sup>3</sup>. Taj postupak bio je prvo uspješno izoliranje novoga virusa, bez modela porasta virusa u kulturi tkiva, te bez potvrde o građi virusa elektronskim mikroskopom<sup>4</sup>.

NANB virus preimenovan je u hepatitis C virus (HCV). Na osnovi genetskih i viroloških osobitosti, taj je virus uvršten u porodicu *Flaviviridae*, te obuhvaća zasebni rod *Hepacivirus*<sup>5</sup>.

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), približno 3% svjetskoga stanovništva, odnosno približno 170 milijuna ljudi, zaraženo je hepatitis C virusom (HCV). Hepatitis C jest krvlju prenosiva bolest, i do otkrića virusa kao etiološkoga agensa zaraznoga hepatitisa, uglavnom je prenošen virusom inficiranim transfuzijama, odnosno krvnim pripravicima<sup>6,7,8</sup>.

Početak godine 1993. u Hrvatskoj je uvedeno obvezno testiranje krvi dobrovoljnih davatelja na anti-HCV protutijela, i otada su transfuzije kao uzročnik prijenosa HCV-a, epidemiološki gotovo isključene. Danas u Hrvatskoj rizik za prijenos HCV-a krvlju iznosi tek 1:200.000, i to u slučaju kada se davatelj krvi nalazi u fazi akutne supkliničke infekcije, kada se još nisu razvila anti-HCV protutijela (prije serokonverzije)<sup>9</sup>. Najučestaliji prijenos infekcije jest unutravensko uzimanje droge, te je prevalencija infekcije HCV-om među narkomanima od 48% do 90%<sup>10</sup>.

## MOLEKULARNE METODE ZA DOKAZIVANJE VIREMIJE

Hepatitis C jest maleni jednolančani RNA virus promjera 30 nm – 50 nm, s lipidnom ovojnicom. Genom sadrži približno 9500 nukleotida, s 5'- i 3'-nekodirajućim regijama. Na 5' kraju nalazi se regija s približno 340 nukleotida, koja pokazuje približno 92%-tnu homologiju među različitim HCV tipovima. Zbog visoke postojanosti, regija je prikladna za molekularno dokazivanje virusnoga genoma, i to je uglavnom ciljna regija većine komercijalnih testova koji se zasnivaju na analizi virusnoga genoma<sup>11,12</sup>. Dokazivanje HCV-RNA zasniva se na kombinaciji amplifikacijskih metoda (polimerazna lančana reakcija, PCR) i detekcijskih metoda (hibridizacije HCV-specifičnim probama obilježenim kromogenim ili fluorescentnim bojama, koje omogućuju kvantifikaciju viremije). U primjeni je danas nekoliko komercijalnih testova koji omogućuju kvalitativno određivanje HCV-RNA (kvalitativni PCR, TMA amplifikacija zasnovana na transkripciji), te kvantitativno određivanje (kvantitativni PCR, real-time PCR i bDNA-amplifikacija signala

vezanog uz DNA). U tablici 1. navedene su indikacije, interpretacija, te preporučeni testovi<sup>12</sup>.

## MOLEKULARNE METODE ZA UTVRĐIVANJE HCV GENOTIPOVA

Hepatitis C virus jest heterogeni virus. Heterogenost je posljedica mutacija koje se događaju tijekom replikacije virusa. Replikacijski ciklus ovisi o RNA ovisnoj RNA polimerazi kojoj nedostaje aktivnost provjere prepisivanja, što objašnjava visoku razinu zamjene nukleotida i genomsku raznovrsnost HCV-a. Udio je spontanih zamjena nukleotida visok, s procijenjenom frekvencijom od  $10^{-2}$  do  $10^{-3}$  zamjena nukleotida u virusnomu genomu tijekom godine dana<sup>11</sup>. Među svim poznatim izolatima, HCV genom pokazuje približno 70% homolognosti<sup>13</sup>. HCV izolati pokazuju genetsku heterogenost na četirima razinama: genotipovi, suptipovi, izolati i kvazispicijesi, kao posljedica pogreške u RNA replikaciji i imunosupresivnoj aktivnosti domaćina u prethodnoj selekciji virusnih klonova tijekom kronične HCV infekcije<sup>14</sup>. Prema nukleotidnomu sastavu genoma, virus se svrstava u 6 glavnih genotipova<sup>15</sup>.

Za analizu HCV genotipova, primjenjuju se tri molekularne metode. To su:

- PCR hibridizacijska metoda (INNO-LiPA HCV II, Bayer, Njemačka), koja se zasniva na amplifikaciji, te se potom PCR produkt veže (hibridizira) uz genotip specifične probe nanese na posebne trake za testiranje
- PCR restrikcijska metoda koja uključuje PCR, te nakon toga restrikciju enzimima koji cijepaju PCR produkt na genotip-specifičnim mjestima, a rezultati se očitavaju nanošenjem produkata na agarozni gel obojen etidijevim bromidom i izložen u UV svjetlu
- sekvencijska metoda koja je takozvani zlatni standard, kojom se određuje nukleotidni slijed PCR produkta, te se primjenjuje u određivanju genotipova, a manje u rutinskomu radu

## KLASIFIKACIJA HCV GENOTIPOVA

Simmondsov općeprihvaćeni klasifikacijski sustav za HCV genotipove, zasniva se na nukleotidnoj homolognosti u bar dvjema regijama, što je potvrđeno i filogenetskim stablom<sup>13,15</sup>. HCV je razvrstan u šest glavnih genotipova, te na niz podtipova. Glavni genotipovi označeni su arapskim brojevima od 1 do 6, a podtipovi malim slovima a, b, c... Dvije se regije uglavnom koriste za određivanje genotipova, i to 5' nekodirajuća regija, te NS-5 regija virusa.

Tablica 1. Preporuke za testiranje HCV-RNA\*  
Table 1 Recommendations for HCV-RNA testing\*

Klinički pokazatelji	Preporučeni test	Tumačenja i primjedbe
Suspektna akutna infekcija	Kvalitativni PCR ili real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provjeriti HCV-RNA i anti-HCV protutijela 4-6 tjedana nakon infekcijom virusom</li> <li>• Provjeriti HCV-RNA između 8. i 12. tjedna; ako je nalaz pozitivan, razmotriti terapiju</li> <li>• Provjeriti HCV-RNA i anti-HCV protutijela 4-6 mjeseci nakon infekcije virusom</li> </ul>
Suspektna kronična infekcija Anti-HCV protutijela pozitivna	Kvalitativni PCR ili real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HCV-RNA pozitivan: bolesnik kronično inficiran</li> <li>• HCV-RNA negativan: bolesnik najvjerojatnije nije inficiran, ali je moguća i intermitentna viremija niske razine. Ponoviti HCV-RNA test za 6-12 mjeseci</li> </ul>
Anti-HCV protutijela negativna, neobjašnjena jetrena bolest, ili imunokompromitirani bolesnik	Kvalitativni PCR ili real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HCV-RNA pozitivan: bolesnik kronično inficiran, izuzev ako akutnu HCV infekciju ne podržava klinička slika</li> <li>• HCV-RNA negativan: bolesnik vjerojatno nije inficiran, ali je moguća i intermitentna viremija niske razine. Ponoviti HCV-RNA test za 6-12 mjeseci.</li> </ul>
Anti-HCV protutijela i HCV-RNA pozitivni, potrebna je terapija	Kvantitativni test (kvantitativni PCR, bDNA ili real-time PCR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Više od 800.000 IU/ml visok je nalaz i teže se liječi</li> <li>• Preporučeno korištenje uvijek istoga kvantitativnoga testa. Odrediti razinu viremije prije terapije, te između 4. i 12. tjedna provjeriti terapijski odgovor.</li> </ul>
Rođeno dijete HCV-RNA pozitivne majke; dijete pozitivno na anti-HCV 18 mjeseci nakon rođenja	Kvalitativni PCR ili real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HCV-RNA pozitivan: bolesnik kronično inficiran</li> <li>• HCV-RNA negativan: bolesnik vjerojatno nije inficiran, ali je moguća i intermitentna viremija niske razine. Ponoviti HCV-RNA test za 6-12 mjeseci.</li> </ul>

\* Preporuke preuzete iz rada Scott, i sur. 2007.

\* Recommendations taken from Scott, i sur. 2007.

Rasprostranjenost HCV genotipova u svijetu, ustanovljena je na osnovi ispitivanja dobrovoljnih davatelja krvi u različitim zemljama<sup>14,15,16,17,18</sup>. Podaci o rasprostranjenosti HCV genotipova ukazuju na virusno podrijetlo, na migracije stanovništva, te na putove prijenosa bolesti, ali ujedno daju podatke važne za proučavanje virusne replikacije, za tijek bolesti, antivirusnu terapiju, te za razvoj cjepiva<sup>14,19</sup>. Dok su pojedini HCV genotipovi (1a, 1b, 2a, 2b) rasprostranjeni širom svijeta, genotipovi 5a i 6a nalaze se jedino u određenim područjima. HCV genotip 1 uzrokuje 40% – 80% svih infekcija HCV-om u Sjevernoj i Južnoj Americi, Europi i u većem dijelu Azije. Dok se genotip 2 nalazi se na istim područjima, ali s manjom prevalencijom, genotip 3 prevladava u Indiji, Pakistanu i na Tajlandu, a genotip 4 prevladava u Africi (Zair i Egipat), te na Srednjem istoku. Genotip 5 nađen je uglavnom u Južnoj Africi, a tip 6 u Aziji (Hong Kong, Makao i Vijetnam)<sup>14,15</sup>.

Istraživanja provedena u razdoblju 1998. – 2000., pokazala su da je najčešći genotip u Hrvatskoj 1b, zastupljen u 42% bolesnika s kroničnim hepatitisom C, te u 67% anti-HCV pozitivnih dobrovoljnih davatelja krvi<sup>17,18</sup>. Drugi je po učestalosti genotip 3a, s 27,8% zastupljenosti u bolesnika, te s 11,6% u dobrovoljnih davatelja krvi, pri čemu valja istaknuti da je većinom zastupljen u skupini narkomana mlađe dobi koji uzimaju drogu unutarvenski<sup>17</sup>. Na području Hrvatske, u manjem su postotku ustanovljeni također HCV genotipovi 1a, 2c i 4<sup>17,18</sup>.

#### MOLEKULARNE METODE U PRAĆENJU UČINKA INTERFERONSKE TERAPIJE

Terapija izbora za liječenje hepatitisa C, jest kombinirana terapija pegiliranim interferonom i ribavirinom<sup>20</sup>. Molekularne metode omogućile su izravno praćenje učinka interferonske terapije. Uspješ-

nost terapije procjenjuje se na osnovi negativnoga nalaza HCV-RNA u perifernoj krvi, 6 mjeseci nakon završetka terapije. Prema tom kriteriju, uz kombiniranu terapiju pegiliranim interferonom i ribavirinom, u prosjeku uspješno je zaliječeno 55% bolesnika, pri čemu je uspješnost terapije 45% u bolesnika s infekcijom genotipom 1, a uspješnost terapije u bolesnika s genotipovima 2 i 3 čak je 80%. Prema prihvaćenim algoritmima liječenja hepatitisa C, za genotipove 2 i 3 preporučuje se terapija interferonom u trajanju od 6 mjeseci, a za genotipove 1, 4, 5 i 6 preporučuje se terapija tijekom 12 mjeseci<sup>20,21</sup>.

Nalaz HCV-RNA u krvi, osjetljiviji je pokazatelj vraćanja bolesti nakon završetka interferonske terapije, negoli je to povišenje vrijednosti ALT-a. Negativni nalaz HCV-RNA nije uvijek i znak nestanka virusa, budući da virus može opstati u jetri, u mononuklearima perifernoj krvi, ili u plazmi, kada je razina viremije ispod granica otkrivanja primijenjenim postupkom<sup>22</sup>. Preduvjet za bolji terapijski odgovor jesu niža razina viremije prije početka terapije, svi genotipovi izuzev genotipa 1, kraće trajanje bolesti, manje oštećena jetra, te mlađa životna dob<sup>20,21</sup>.

## ZAKLJUČAK

Osnovna dijagnostika virusnih hepatitisa zasniva se na trima vrstama laboratorijskih testova<sup>22,23,24</sup>. Za diferencijalnu dijagnozu dovoljan je uzorak od

10 ml perifernoj krvi, koji se uzima iz lakatne vene.

### 1. Ustaljeni laboratorijski testovi funkcije jetre

Provodi se određivanje jetrenih enzima aminotransferaza, napose alanin-aminotransferaze (ALT) i bilirubina, te ostalih jetrenih enzima. Određuju se pokazatelji upalnoga procesa u jetri: gama-glutamilttransferaze (GGT) i alkalne fosfataze (AF). Kada se u nalazu pojave patološke, povišene vrijednosti, postavlja se sumnja na hepatitis, te se provode daljnji testovi.

### 2. Serološki testovi

Na osnovi seroloških testova, utvrđuje se o komu se virusnome hepatitisu radi, te se procjenjuje je li hepatitis akutan ili kroničan. Serološki testovi pripadaju skupini imunoloških testova. Testni je reagens jedan virusni antigen-dio virusnih proteina (najčešće ovojnice, ili proteinske jezgre virusa koji su umjetno proizvedeni), ili više tih dijelova koji kada se izlože serumu bolesnika vežu specifična protutijela iz seruma. U sljedećem koraku testa, sklop antigen – antitijelo dokazuje se jednim od ustaljenih postupaka. Na osnovi seroloških testova može se dokazati radi li se o hepatitisu A, B, C, D, ili E, te jednako tako na osnovi vrste protutijela u serumu bolesnika, može se razlučiti akutna infekcija od kronične infekcije. Međutim, ti testovi imaju bitni nedostatak – specifična protutijela pojavljuju

Tablica 2. Dijagnostika hepatitisa C i preporučena primjena u klinici  
Table 2 *Hepatitis C diagnostics and recommended clinical implementation*

Vrsta testa	Primjena
HCV-protutijela, imunoenzimski test (EIA)	Test probira za dokazivanje akutnoga i kroničnoga hepatitisa C
HCV-protutijela, rekombinantni imunoblot test (RIBA)	Potvrđni test za pozitivne nalaze EIA testova, kojim se određuju tri vrste nalaza: pozitivan, negativan, neodređeni nalaz
HCV genotipizacija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Predviđa tijek i uspješnost terapijskoga odgovora</li> <li>• Određuje trajanje terapije</li> </ul>
HCV-RNA, kvalitativna analiza	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otkriva akutnu infekciju prije serokonverzije (prije pojave HCV-protutijela), 2-3 tjedna nakon infekcije virusom</li> <li>• Potvrđuje dijagnozu u imunosuprimiranih bolesnika</li> <li>• Rješava neodređeni RIBA test</li> <li>• Razlikuje aktivne i prošle infekcije</li> <li>• Pokazuje tijek infekcije praćenjem viremije</li> </ul>
HCV-RNA, kvantitativni test	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Predviđa odgovor na antivirusnu terapiju</li> <li>• Razlikuje nepostojanje terapijskoga odgovora od djelomičnoga odgovora</li> </ul>

se s odgodom od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Ta se pojava naziva serokonverzijom, a vrijeme od infekcije do pojave protutijela, naziva se dijagnostičkim prozorom (engl. window period), i to je razdoblje kada je krv nositelja virusa vjerojatno zarazna<sup>25</sup>. Dijagnostički prozor odgovoran je za još uvijek prisutan rizik prijenosa hepatitisa C dobivanjem zaražene, ali anti-HCV negativne krvi, stoga se govori o ostatnomu riziku prijenosa virusa krvlju, što u Hrvatskoj iznosi približno 1:200.000<sup>9</sup>. Za hepatitis C virus prosječno trajanje dijagnostičkoga prozora iznosi 3 mjeseca – 6 mjeseci. Vrlo rijetko, u pojedinim se bolesnika uopće ne razvije imunološki odgovor, pa je HCV infekcija bez anti-HCV prisutnih protutijela.

### 3. Molekularni testovi za dokazivanje HCV viremije

Da bi se dijagnostički prozor skratio, a time i rizik za prijenos infekcije, uvedene su molekularno-biološke metode koje se zasnivaju na dokazivanju dijelova virusnoga genoma u perifernoj krvi (viremija, HCV-RNA). Budući da se tim postupcima viremija može otkriti već 15 do 20 dana nakon infekcije, bitno je smanjen rizik prenošenja virusa transfuzijom. Od godine 1999., u većini zemalja Europske Unije (uključujući Sloveniju) postupno je uvedeno obvezno testiranje krvi dobrovoljnih davatelja na HCV-RNA, molekularnim NAT metodama (engl. Nucleic acid test). U kliničkoj dijagnostici primjenjuje se veći broj molekularnih metoda za koje je važno da su standardizirane, te da su dobile certifikat ustanova zaduženih za odobravanje dijagnostičkih testova<sup>12,24</sup>. Ti se postupci zasnivaju na načelima amplifikacijske metode (PCR metode) i hibridizacijske metode. Podatke koje tim metodama dobivamo, jesu dokazivanje viremije (pozitivna HCV-RNA), određivanje broja virusnih čestica u određenoj volumenu krvi (važno za procjenu uspješnosti protivirusne terapije interferonom), te određivanje genotipa virusa (1a i 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4, 5, 6), što je bitno za planiranje duljine terapije i predviđanje brzine i uspješnosti odgovora na interferonsku terapiju.

### 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. 1976. *Yale J Biol Med* 2000; 73(1-6):175-82.
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. Farci P. Milestones in liver disease. *J Hepatol* 2002;36:582-5.
5. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
6. Reesink HW, Van der Poel CL, Cuypers HTM, Lelie PN. HCV and blood transfusion. *Arch Virol* 1992;4:241-3.
7. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-62.
8. Alter MJ. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. *Clinics in Liver Disease* 1997;1:559-68.
9. Grgičević D, Balija M, Pirc-Tiljak D, Mihaljević I, Gjenero-Margan I, Zupančić-Šalek S, Macek P. Decreasing Risk of Viral Transfusion-transmitted Diseases in Croatia. *Croat Med J* 2000; 41(2):191-6.
10. Hickman M, Hope V, Brady T, Madden P, Jones S, Honor S, Holloway G, Ncube F, Parry J. Hepatitis C virus (HCV) prevalence and injecting risk behaviour in multiple sites in England in 2004. *J Viral Hepat* 2007;14(9):645-52.
11. Houghton M, Weiner A, Han I, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C virus. Implication for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14:381-8.
12. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection—a systematic review. *JAMA* 2007;297(7):724-32.
13. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21:570-83.
14. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997;78:321-8.
15. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, i sur. Consensus proposal for unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42(4):962-73.
16. Stelzl E, van der Meer C, Gouw R, Beld M, Grahovac M, Marth E, Kessler HK. Determination of the hepatitis C virus subtype: comparison of sequencing and reverse hybridization assays. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(2):283-7.
17. Bingulac-Popović J, Babić I, Dražić V, Grahovac B. Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Croatian population. *Biochem Med* 2000;3-4:175-80.
18. Vince A, Kutela N, Sonicky Z, Jeren T, Radovani M. HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Croatia. *Infection* 1998;26:173-7.
19. Delwart E, Kuhns MC, Busch MP. Surveillance of the genetic variation in incident HIV, HCV and HBV

- infections in blood and plasma donors: Implications for blood safety, diagnostics, treatment and molecular epidemiology. *J Med Virol* 2006;78:S30-5.
20. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C. NIH Consensus State Sci Statements 2002 Jun 10-12;19(3):1-46.
  21. Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM, for the PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
  22. Isaacson AH, Davis GL, Lau JYN. Should we test hepatitis C virus genotype and viremia level in patients with chronic hepatitis C? *J Viral Hepat* 1997;4(5):285-92.
  23. CDC.2003. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR* 52 (No.RR-03):1-12.
  24. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(3):43S-7.
  25. Dodd RY, Notari EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002;42:975-9.