



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**ULOGA KVANTITATIVNOG HBsAg U DIJAGNOSTICI I TERAPIJI
HRONIČNE HEPATITIS B VIRUSNE INFEKCIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: prof. dr Tomislav Preveden

Kandidat: Maria Pete

Novi Sad, 2021. godina

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija HBV infekcije.....	1
1.2. Epidemiologija	1
1.3. Putevi transmisije.....	3
1.4. Etiologija.....	5
1.4.1. Mutacije	8
1.4.2. Genotipovi.....	13
1.5. Patogeneza.....	15
1.6. Prirodni tok hronične HBV infekcije	17
1.7. Kliničke karakteristike hronične HBV infekcije.....	20
1.8. Dijagnostika hronične HBV infekcije.....	24
1.9. Terapija hronične HBV infekcije.....	28
2. CILJEVI.....	33
3. HIPOTEZE	33
4. ISPITANICI I METODE	34
4.1. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja.....	36
4.2. Ispitivani parametri	38
4.3. Indikacije za antivirusnu terapiju	40
4.4. Statistička obrada podataka	41

5. REZULTATI.....	42
5.1. Rezultati ispitivanja pacijenata koji nisu na antivirusnoj terapiji analozima nukelo(t)ida.....	43
5.2. Rezultati ispitivanja pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji analozima nukleoz(t)ida.....	57
5.2.1. Rezultati ispitivanja nivoa qHBsAg i viremije HBV DNK kod pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji analozima nukelo(t)ida u vremenskom razmaku od godinu dana.....	66
6. DISKUSIJA.....	69
7. ZAKLJUČCI.....	92
8. LITERATURA	93

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Мариа Пете
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	проф. др Томислав Преведен ванредни професор Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Улога квантитативног <i>HBsAg</i> у дијагностици и терапији хроничне хепатитис Б вирусне инфекције
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 115 Поглавља: 7 Референци: 145 Табела: 10 Слика: 3 Графикона: 10 Прилога: 0
Научна област:	Медицинске науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Инфективне болести
Кључне речи / предметна одредница:	hepatitis B; hronični hepatits B; biomarkeri; površinski antigeni hepatitisa B; antivirousna terapija; dijagnoza; viremija; nukleotidi
Резиме на језику рада:	<p><u>Увод:</u> Хепатитис Б вирусна (ХБВ) инфекција представља глобални здравствени проблем и процењује се да је у свету преко 240 милиона људи хронично инфицирано, а да око 1 милион умре сваке године од последица ове инфекције. <i>qHBsAg</i> је дијагностички маркер од великог значаја у праћењу природног тока хроничне ХБВ инфекције, као и терапијског одговора на примену антивирусних лекова. Динамика титра <i>qHBsAg</i> током примене како пегилованог интерферона, тако и аналога нуклеоз(т)ида (НА) указује на исход терапије, и омогућава бољи одабир пацијената код којих је могуће прекинути до сада доживотну примену лекова.</p> <p><u>Циљ</u> истраживања је био да се утврди улога <i>qHBsAg</i> у дијагностици и терапији хроничне ХБВ инфекције код наивних пацијената са активном и инактивном формом болести, а исто тако и код пацијената који су на антивирусној терапији НА.</p> <p><u>Испитаници и методе:</u> Истраживање је конципирано као проспективна студија пресека, која је обухватила 238 пацијената Одсека хепатитиса и</p>

	<p>обољења хепатобилијарног тракта, Клинике за инфективне болести, Клиничког центра Војводине са дијагнозом хроничне ХБВ инфекције у периоду 2019./2020. године. Код свих пацијената евидентирани су демографски и остали подаци из медицинских картона, као и лабораторијске анализе које се узимају у оквиру рутинске дијагностике хроничне ХБВ инфекције уз одређивање <i>qHBsAg</i>.</p> <p><u>Резултати</u> указују да је ниво <i>qHBsAg</i> статистички значајно нижи ($p=0,000$) код пацијената са инактивном формом хроничне ХБВ инфекције. Да вредности <i>qHBsAg</i> изнад $800 IU/ml$, са сензитивношћу од 60% и специфичношћу од 70%, указују на активну форму хроничне ХБВ инфекције. Ниво <i>qHBsAg</i> је статистички значајно виши код <i>HBeAg</i> позитивних него код <i>HBeAg</i> негативних пацијената који нису на антивирусној терапији НА ($p=0,032$), а такође је и виремија <i>HBV DNK</i> ($p < 0,001$) виша код <i>HBeAg</i> позитивних пацијената. У групи пацијената који су на антивирусној терапији НА добијено је да су средње вредности <i>qHBsAg</i> и виремије <i>HBV DNK</i> више у групи <i>HBeAg</i> позитивних, него у групи <i>HBeAg</i> негативних пацијената, али ова разлика није досегла статистичку значајност. Ниво <i>qHBsAg</i> позитивно корелира са виремијом <i>HBV DNK</i> корелацијом високог интензитета у групи нелечених пацијената, а потврђена је и корелација <i>qHBsAg</i> са виремијом <i>HBV DNK</i> и у групи лечених пацијената, али је она умереног интензитета. Није утврђена статистички значајна разлика у вредностима <i>qHBsAg</i> ($p=0,509$) и виремије <i>HBV DNK</i> ($p=0,319$) између два антивирусна лека.</p> <p><u>Закључци:</u> Добијени резултати потврђују да је <i>qHBsAg</i> значајан дијагностички маркер код пацијената оболелих од хроничне ХБВ инфекције. Примена овог маркера који доказано корелира са степеном виремије, омогућава превазилажење проблема доступности <i>PCR</i> тестова и доприноси значајним уштедама здравственом систему. Студијом смо потврдили употребљивост <i>qHBsAg</i> у одређивању фазе хроничне ХБВ инфекције и доношења одлуке о моменту прекида антивирусне терапије НА. Неопходна су додатна истраживања да би се <i>qHBsAg</i> имплементирао у постојеће терапијске водиче.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	29.01.2020.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	
Напомена:	

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OR CENTER**

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Maria Pete
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Tomislav Preveden, MD, PhD, associate professor Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Thesis title:	
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 115 Chapters 7 References 145 Tables 10 Illustrations 3 Graphs 10 Appendices _____
Scientific field:	Medical sciences
Scientific subfield (scientific discipline):	Infectious diseases
Subject, Key words:	Hepatitis B; Hepatitis B, Chronic; Biomarkers; Hepatitis B Surface Antigens; Antiviral Agents; Diagnosis; Viremia; Nucleotides
Abstract in English language:	<p><u>Introduction:</u> Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is a major global health problem that affects over 240 million people worldwide and over 1 million die annually of HBV -related chronic liver disease. <i>qHBsAg</i> is a diagnostic marker of great significance in observing the natural course of HBV infection and therapeutic response to antiviral drug administration. <i>qHBsAg</i> titre dynamics during administration of pegylated interferon or nucleoside analogs (NA) indicates therapy outcomes, and provides better selection of patients susceptible for termination of lifelong treatment.</p> <p><u>Aim of this study</u> was to determine the role of <i>qHBsAg</i> in diagnosis and therapy od chronic HBV infection in naive patients with active and inactive form of disease, as well as in patients receiving antiviral NA therapy.</p> <p><u>Material and methodes:</u> This study was a prospective cross-sectional study which included 238 patients treated in Department of Hepatology, Clinic for Infectious diseases, Clinical center of Vojvodina from 2019. to 2020. under diagnosis chronic HBV infection. Demographic and other data available from medical documentation was noted, as well as routine laboratory analyses for chronic HBV infection, including <i>qHBsAg</i>.</p>

	<p><u>Results</u> indicate that the level of <i>qHBsAg</i> is significantly statistically lower ($p=0,000$) in patients with inactive form of chronic HBV infection. <i>qHBsAg</i> values over 800 IU/ml are indicative of a chronic HBV infection with sensitivity of 60% and specificity of 70%. <i>qHBsAg</i> levels are significantly higher in <i>HBeAg</i> positive than in <i>HBeAg</i> negative patients which are not receiving antiviral therapy NA ($p=0,032$). <i>HBV DNA</i> viremia levels were higher in <i>HBeAg</i> positive patients. In a group of patients receiving NA antiviral therapy median <i>qHBsAg</i> values and <i>HBV DNA</i> viremia levels were higher in <i>HBeAg</i> positive than in <i>HBeAg</i> negative patients, but this difference was not of statistical significance. <i>qHBsAg</i> values have a strong positive correlation to <i>HBV DNA</i> viremia levels in a group of untreated patients. In a group of treated patients moderate correlation was observed. There wasn't any statistically significant difference in <i>HBsAg</i> levels ($p=0,509$) and <i>HBV DNA</i> viremia levels ($p=0,319$) in between two antiviral drugs.</p> <p><u>Conclusions:</u> Results confirm that <i>qHBsAg</i> has an important role as a diagnostic marker in patients with chronic HBV infection. <i>qHBsAg</i> correlates to viremia levels, and that particular trait can be used to overcome PCR- test availability problems and overbearing healthcare expenses. This study confirms foremost role of <i>qHBsAg</i> in determining phases of chronic HBV infection and possible termination of NA antiviral therapy. Additional studies are needed to incorporate <i>qHBsAg</i> into current treatment guidelines.</p>
Accepted on Scientific Board on:	29.01.2020.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5б – Statement on the authority,

5в – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5г – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

Ovom prilikom želim da zahvalim svom mentoru, prof. dr Tomislav Prevedenu, na ogromnoj pomoći, savetima, strpljenju i velikom angažovanju prilikom izrade ovog rada. Prof. dr Tomislav Preveden nije samo moj mentor za ovu doktorsku disertaciju, već i osoba koju izuzetno cenim, volim i poštujem. On je i moj životni mentor, koji zna da su u životu najbitniji ljubav, porodica, prijateljstvo, putovanja i zabava i koji podržava svaki moj izbor, ali isto tako zna da je i karijera bitna stavka u životu.

Zahvaljujem i svojoj omiljenoj prof. dr Milotki Fabri bez koje izrada ovog rada ne bi bila moguća, koja je uvek bila uz mene da me motiviše da idem napred, koja me inspirisala ne samo da napišem ovaj rad, nego i da se uvek trudim da budem bolja verzija sebe.

Zahvaljujem dr Marti Pobor, doc. dr Maji Ružić i dr Anici Ilić-Jajić na njihovoj безусловnoj ljubavi, savetima i podršci, kao i svim zaposlenima na Klinici za infektivne bolesti, jer su svi oni doprineli izradi ovog rada. Posebno zahvaljujem svom ocu Karolju koji je uvek verovao u mene i davao mi безусловnu podršku tokom mog školovanja. Zauvek ćeš ostati u mom srcu i sećanje na tebe nikada neće izbledeti, ljubav koju si mi pružio večno ću pamtiti, hvala ti što si bio moj otac i što si bio deo mog života. Volim te puno i uvek ću te voleti.

Zahvaljujem i svojoj majci, sestri, mojim voljenim sestrićima, drugaricama i kumama na pruženoj podršci, ljubavi, razumevanju i strpljenju.

Posebna zahvalnost i asist. dr Vedrani Petrić koja je koleginica No 1, veliki prijatelj, entuzijasta i najbolji turistički vodič kojeg znam, koja je uvek spremna da se pridruži svim mojim avanturama, bez suvišnih pitanja. Na samom kraju ove podugačke zahvalnice, želim da zahvalim prof. dr Snežani Brkić koja je verovala u mene i u momentima kada ja nisam i iskrenim razgovorima i savetima podsticala me je da budem samo bolja. Žena koja nam je svima pokazala da se u životu sve može samo kad se hoće, žena koja nikada ne odustaje i lavljim srcem se bori za bolju budućnost svih nas.

1. UVOD

1.1. Definicija

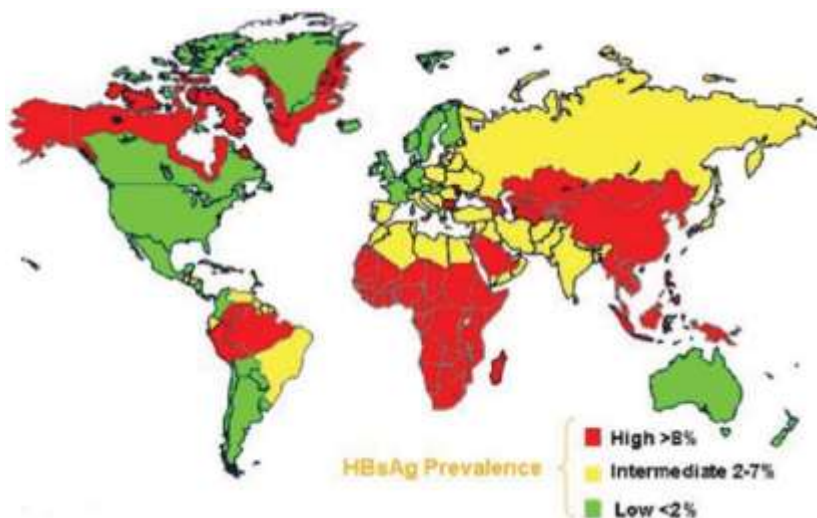
Hronična hepatitis B virusna (HBV) infekcija je infekcija koja je praćena perzistiranjem HBsAg u krvi dužim od šest meseci posle akutne faze bolesti. Ova infekcija predstavlja globalni zdravstveni problem i procenjuje se da je u svetu preko 240 miliona ljudi hronično inficirano, a da oko jedan milion umre svake godine od posledica ove infekcije (1–5). Uprkos dostupnoj vakcinaciji, hronična HBV infekcija je i dalje prisutna u celom svetu i predstavlja značajan faktor morbiditeta i mortaliteta jer može da uzrokuje hroničnu jetrenu bolest sa komplikacijama kao što su ciroza jetre i hepatocelularni karcinom (HCC). Procenjuje se da je na petnaestom mestu po uzroku smrtnosti u svetu i odgovorna je za 5–10% transplantacija jetre (1, 3–8).

1.2. Epidemiologija

Prevalencija i incidencija hroničnog hepatitisa B (HHB) varira u zavisnosti od migracija stanovništva, poboljšanja socioekonomskog standarda, primene vakcinacije i antivirusne terapije (1). U različitim delovima sveta prevalencija hronične HBV infekcije varira od 0,1 do 20% (3, 7). Na Zapadnom Pacifiku, Aziji i Supsaharskoj Africi se beleži najviša prevalencija 8– 20%. Infekcija se u ovim područjima najčešće prenosi perinatalnom transmisijom (sa inficirane majke na novorođeno dete) ili horizontalnom transmisijom (izloženost zaraženoj krvi) u prvim godinama života, najčešće do pete godine (3, 9). Smatra se da je visoka prevalencija HHB u ovim zemljama upravo zbog

toga što perinatalna transmisija uglavnom i dovodi do hronične infekcije. Takođe, regioni sa visokom prevalencijom hronične HBV infekcije imaju i visoku prevalenciju hepatocelularnog karcinoma. Mediteranske zemlje, zemlje Srednjeg istoka, centralne i istočne Evrope i Amazonskog bazena imaju intermedijarnu prevalenciju 1-8%. U ovim zemljama glavni putevi transmisije su seksualni, nozokomijalni i perinatalni put. U Severnoj Americi, severozapadnoj Evropi i Australiji prevalencija je niža od 1%, a infekcija se najčešće prenosi seksualnim putem ili intravenskim korišćenjem droge. Bolnička (nozokomijalna infekcija) retko se beleži, i uglavnom je povezana sa lošim univerzalnim merama prevencije ili sa nepažljivim rukovanjem medicinskim instrumentima (hirurškim instrumentima, iglama) (3, 10, 11).

U Republici Srbiji prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u 2015. godini je notifikaciona stopa obolelih od hronične HBV infekcije iznosila 2,86/100.000 stanovnika u Centralnoj Srbiji, a na teritoriji Vojvodine je bila vrlo slična 2,84 i 2,90/100.000 stanovnika. U prethodnih petnaest godina analizom broja obolelih beleži se blag trend porasta hronične HBV infekcije (12). Vakcina je dostupna u svetu od 1982. godine, a u R. Srbiji je imunizacija novorođenčadi, odnosno dece u prvoj godini života obavezna od 2002. godine (13).



Slika 1. Geografska distribucija hronične HBV infekcije (14)

1.3. Putevi transmisije

Hepatitis B virus izaziva krvno-transmisivno oboljenje, a jedini rezervoar infekcije je čovek. Inkubacija traje 30–180 dana, prosečno 60–90 dana. Prisutan je u krvi, semenoj tečnosti, vaginalnom sekretu, menstrualnoj krvi, pljuvački, a u nižim koncentracijama u znoju, urinu, mleku dojilje i suzama (3, 7, 15–20). Dovoljno je samo 0,00004 ml krvi inficirane osobe da izazove infekciju druge osobe (3, 7). Virus je u spoljašnjoj sredini veoma otporan i prenosi se vrlo lako kontaktom sa inficiranim telesnim tečnostima (3). Postoje dva osnovna puta transmisije: horizontalni i vertikalni put:

- Horizontalnim putem transmisije smatra se seksualni, parenteralni, indirektni i nozokomijalni put;
- Vertikalni put transmisije podrazumeva prenos infekcije sa inficirane majke na dete, najčešće prilikom porođaja. (3, 7, 15–20). Transmisija nezaštićenim seksualnim odnosom je najčešći način zaražavanja, posebno u regionima sa niskom prevalencijom hronične HBV infekcije (21). Do prenosa infekcije dolazi

kada semena tečnost, vaginalni sekret ili menstrualna krv dođu u kontakt sa oštećenom sluzokožom, a rizik od infekcije se povećava sa dužinom seksualne aktivnosti, brojem seksualnih partnera, analnim seksualnim odnosom ili prisustvom drugih polno prenosivih bolesti. Parenteralna/perkutana transmisija – najčešće kod intravenskih korisnika droga prilikom upotrebe istih igala i špriceva, zatim zajedničkim korišćenjem četkica za zube, pribora za brijanje, tetoviranje, pirsing i akupunktura. Nozokomijalna infekcija se danas javlja izuzetno retko zahvaljujući univerzalnim merama prevencije i najčešće se se dešava usled akcidentalnog uboda zdravstvenog radnika na kontaminiranu iglu. Prenos infekcije sa bolesnika na zdravstvenog radnika je mnogo češći, nego obrnuto. Međutim, i HBsAg pozitivni zdravstveni radnici moraju sprovoditi određene mere prevencije, kao što je nošenje duplih rukavica. Prenos infekcije putem transfuzije krvi i derivata krvi je danas takođe vrlo redak, a rizik zavisi od strategija testiranja davaoca krvi, kao i od prevalencije hronične HBV infekcije u određenom regionu. U Sjedinjenim Američkim Državama za testiranje se koristi i HBsAg i ukupna anti HBc antitela dok većina zemalja koristi samo HBsAg. Zemlje sa visokom prevalencijom imaju veći rizik od posttransfuzione hepatitis B virusne infekcije, oko jedan na 20.000 transfundovanih krvnih produkata, dok će one sa niskom prevalencijom imati manji rizik, 1–4 prenosa na jedan milion (3);

- Vertikalna transmisija- intrauterina je retka, oko 5%;
- Perinatalna se najčešće 95% ostvaruje prilikom porođaja prilikom mešanja krvi deteta i majke preko placente ili gutanjem majčinih ekskreta i krvi (21);
- Postnatalna-u prvim godinama života (3).

1.4. Etiologija

Hepatitis B virus (HBV) pripada porodici *Hepadnaviridae* rodu, rodu *Orthohepadnavirus* i to je jedini primarno hepatotropni DNK virus. Virus je sferičnog oblika, dijametra 42 nm, sadrži površinski lipoproteinski HBsAg omotač i virusni genom (*cor*) koji je obmotan virusnim nukleokapsidom koji sadrži HBcAg-antigen virusnog jezgra. Genom čini dvostruki lanac DNK i DNK polimeraza koji sadrži 3.200 parova baza i predstavlja najmanju virusnu DNK sisara (3, 7, 23–30). Sastoji od četiri gena ili okvira čitanja (ORF–engl. open riding frame) P, S, C i X, a koji su odgovorni su za sintezu sedam virusnih proteina (3, 7, 23, 24, 26, 29, 30).

P-regija genoma kodira sintezu DNK polimeraze (P), koja istovremeno ima i ulogu reverzne transkriptaze (RT) za sintezu komplementarne DNK iz RNK kalupa (23, 24).

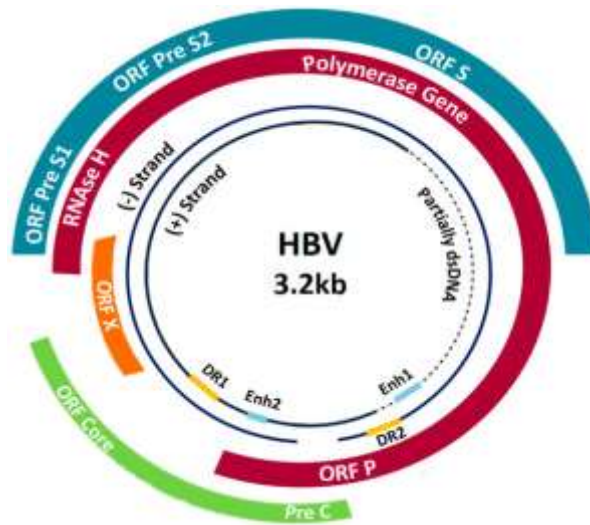
Pre-S/S gen kodira tri površinska virusna proteina koji se razlikuju po molekularnoj težini (mt): SHBs – najmanji sa mt 24 kD, pre-S1 (LHBs) – veliki sa mt 150 kD, pre-S2 (MHBs) – srednji sa mt 70 kD. Pre-S1 protein je najbrojniji, poznatiji kao HBsAg koji ima glavnu ulogu u pripajanju virusa za jetrene ćelije, razlaganju virusa i oslobađanju u ćeliji. Na HBsAg se sintetišu neutrališuća antitela (23, 24).

Gen pre-C/C kodira peptid nukleokapsidnog virusnog jezgra (HBcAg–nesekretorni protein virusnog nukleokapsida) i protein pre-C koji se modifikuje posttranslacijski u protein HBeAg mt 16 kD. HBcAg se u toku replikacije kompletira u česticu veličine 27 nm i bez ostalih virusnih proteina i indikuju sintezu anti HBc antitela koja su najsigurniji pokazatelj infekcije HBV (23, 24).

HBeAg (sekretorni protein virusnog nukleokapsida) predstavlja marker virusne replikacije, međutim, nije neophodan za samu replikaciju virusa, s obzirom da su mutanti virusa sa inhibiranim prepisom *precore* sekvence podjednako replikativni. Ovaj antigen se ne inkorporira u toku replikacije u virusnu česticu, već se oslobađa direktno u cirkulaciju i njegovo prisustvo ukazuje na viremiju (23, 24).

X-regija genoma kodira X-protein (HBx)-regulatorni protein transkripcije i ima veliku ulogu za integraciju genoma u hepatocitima, odnosno onkogenezu. Smatra se da je odgovoran za nastanak HCC-a.

Protein X je multifunkcionalni regulatorni protein sa proapoptotičkim i transaktivacionim potencijalom i prisutan je u velikoj količini u citoplazmi, dok je u maloj količini prisutan u jedru ćelije. Ima ulogu transaktivatora transkripcije. Dokazano je da indukuje hepatocelularnu proliferaciju *in vivo* i *in vitro* i da oštećuje funkciju tumorsupresorskog proteina p53 (23, 31, 32). Takođe indukuje lipogenezu, kao i akumulaciju lipida u hepatocitima, ćelijama HCC i potencira aktivnost TGF- β (23, 33, 34). Ima i citostatsku ulogu, jer se smatra da protein X, indukuje apoptozu izmenjenih hepatocita (23, 35, 36). Potvrđeno je da podstiče enkapsidaciju pgRNK i da ulazi u sastav minihromozoma ccc DNK, da je potreban za replikaciju ćelije *in vivo* i *in vitro* i za održavanje produktivnosti virusa (23, 37–39). Prilikom inokulacije ćelija sa HBV bez HBx Ag, nije došlo do produktivne infekcije, što se pri inokulaciji „divljim tipom“ HBV nije desilo (engl. *Wild type*, wtHBV) (23, 40, 41).



Slika 2. Genom HBV (42)

Virus do hepatocita dospeva hematogenim putem, vezujući se za receptorska mesta, ulazi u hepatocit i replikuje se u njegovom jezgru unutar koga se formira nukleokapsid, dok se u citoplazmi kompletira virus sa omotačem. Virusna DNK se u jezgru kompletira do postizanja potpune dvolančane DNK molekule, a krajevi se spajaju stvarajući kovalentno zatvorenu kružnu DNK (cccDNK) (7). Preko endoplazmatskog retikuluma se kompletni virion (Daneova čestica) oslobađa iz ćelije, a da je pritom ne oštećuje ili recirkuliše; unutar jezgra se vraća održavajući cccDNK (43). Najvažniji korak u replikativnom ciklusu ima upravo cccDNK koja se formira u jedru inficiranog hepatocita i predstavlja najrezistentniji deo virusne DNK, a odgovorna je i za održavanje hronične HBV infekcije. Osim što se iz hepatocita oslobađa kompletni virion, oslobađa se i HBsAg koji se stvara u višku. U serumu se HBsAg nalazi kao neinfektivna „prazna” partikula. U zavisnosti od perioda infekcije poluživot slobodne virusne partikule u inficiranom hepatocitu se kreće od 10 kod aktivne forme bolesti do 100 dana kod inaktivne faze. U krvi poluživot HBV partikule iznosi 1–3 dana (3, 7).

Virus je veoma otporan u spoljašnjoj sredini može da se održi i duže od nedelju dana. Na standardna dezinfekciona sredstva je takođe veoma otporan, kao i na niske i visoke temperature. (3, 7). Infektivnost uništava suva toplota od 160 C°, a od dezinficijena su pogodni hlorni preparati (3).

1.4.1. Mutacije

HBV ima visoku stopu replikacije (preko 10^{11} do 10^{13} viriona za jedan dan) što dovodi do velikog broja „grešaka u replikaciji”, a reverzna transkriptaza ne može da ispravlja ove slučajno nastale greške jer nema kapacitet „potvrđnog čitanja” (23, 44). Najčešće do mutacije dolazi u toku virusne replikacije zbog nepravilne inkorporacije nukleotida i nemogućnosti reparacionih mehanizama da ispravlja greške. Kod HBV se češće javljaju mutacije nego kod drugih DNK virusa (45). Procenjuje se da se tokom svakog replikacionog ciklusa odigrava jedna mutacija na 100.000 nukleotida. Mutacije mogu nastati pod uticajem vakcine, antivirusnih lekova, hepatitis B-imunoglobulina (HBIG), monoklonskih antitela, a mogu nastati i spontano. Mogu se javiti u bilo kom delu genoma, te tako nastaju varijante virusa sa replikacijom i odgovorom na antivirusnu terapiju različitim od divljeg tipa HBV. Mutacije u određenim regijama HBV genoma mogu biti odgovorne za težu formu bolesti, a i za neuspešnu detekciju dijagnostičkim metodama jer većina dijagnostičkih HBsAg testova koristi monoklonska antitela koja su usmerena na dominantnu „a“ determinantu, a mutacijama se gubi sposobnost detekcije proteina monoklonskim antitelima (46).

HBsAg serotipovi ili suptipovi

Površinski HBsAg sadrži 226 aminokiselina, uključuje regije koji učestvuju u vezivanju virusa za hepatocite, te je glavni epitop za prepoznavanje neutrališućih antitela. Na osnovu reaktivnosti HBsAg sa poznatim panelima antitela otkriveni su serotipovi i posledica su različite sekvence aminokiselina u HBsAg i zato se nazivaju još i HBsAg suptipovi (23, 47, 48).

Glavna antigenska determinanta „a“, je zajednička za sve izolate HBV, dok su ostale determinante uzrok varijabilnosti. Prvo su definisane determinante *d*, *y*, *w* i *r*, a potom je na osnovu njih izvršena klasifikacija četiri glavna HBsAg suptipa ili serotipa: *adw*, *adr*, *ayw*, *ayr*. Nakon otkrivanja determinante *q* i subdeterminanti *q+* i *q-*, *w1-w4*, definisano je devet serotipova *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4q-*, *adrq+*, *adrq-*. Poslednji je otkriven osporavani HBsAg suptip *adw3* (23, 48, 49).

Mutacije determinante „a“ za posledicu ima stvaranje „mutanata koji izbegavaju dejstvo vakcine“ (engl. *vaccine-escape mutants* ili VEM), a mogu biti i neprepoznate od strane antiHBs antitela, isto tako mogu izazvati i novu infekciju (50).

Mutacije u „a“ determinanti S gena mogu rezultirati i mutantnom HBsAg negativnom hroničnom HBV infekcijom, što ima najveći klinički značaj u postransfuzionom hepatitisu. Prevalencija okultne HBV infekcije među donorima krvi varira između 0,0002 i 0,084%, u različitim evropskim državama, dok je u Kini oko 0,18% s obzirom da je država sa visokom prevalencijom HBV (51, 52).

Mutacije gena Pre-C/C

Core i *precore* proteini su kodirani sa Pre-C/C okvirom čitanja, s tim da *precore* počinje sa prvim, a *core* sa drugim inicijalnim mestom. *Precore* protein sadrži pored svih sekvenci *core* proteina i dodatnih 29 aminokiselina na N-kraju. Prvih 19 od 29 aminokiselina služi kao signal za usmeravanje proteina do endoplazmatskog retikuluma, a tamo dolazi do njegovog cepanja. Prilikom transporta ovaj protein sazreva i na kraju se izlučuje kao HBeAg topljivi antigen (53). Mutacije u pre-C delu genoma za posledicu imaju obustavljenu ili smanjenu ekspresiju HBeAg, a pritom ne utiču na ekspresiju HBcAg. Replikacija virusa se odvija neometano, s obzirom da HBeAg nije strukturni protein (23).

Na ekspresiju HBeAg utiču dve vrste mutacija. Prve mutacije se odvijaju u regionu bazalnog *core* promotra – BCP (engl. *basal core promotor*), koji pripada okviru čitanja X gena (23). Dvostruka tipična mutacija je često nađena u BCP, A1762T i G1764A i odgovorna je za smanjenu sintezu *precore* mRNA i smanjenu ekspresiju HBeAg. BCP mutacije povećavaju replikaciju virusa u ćelijskim kulturama iako je za HBeAg negativni hepatitis karakteristična niža vrednosti HBV DNK. Ukoliko su prisutne dodatne 3 BCP mutacije (T1753C, C1766T, T1768A), povećava se aktivnost replikacije (54, 55).

Druga grupa mutacija locirana je u pre-C regionu (G1896A) i dovodi do nastanka stop kodona i prestanka sinteze HBeAg. Najčešća mutacija opisuje se kod genotipa D i E (23).

BCP mutacije su detektibilne u kasnoj fazi HBeAg pozitivne infekcije, a *precore* mutacije se javljaju tokom antiHBe serokonverzije. Prema tome pretpostavlja se da virus

prvo dovodi do redukcije ekspresije HBeAg putem BCP mutacija, a potom se zbog *precore* mutacija ekspresija HBeAg prekida (54, 55). Mutacije BCP i Pre-C povezane su sa težim oblicima hepatitisa i razvojem HCC-a. Pacijenti koji su inficirani virusom koji ima dvostruku mutaciju A1762T/G1764A ili mutacijama u *precore* regiji imaju veće predispozicije za razvoj HCC-a od onih zaraženih divljim tipom virusa (56).

Mutacije X gena

Protein X je potreban za uspešnu infekciju i replikaciju *in vivo*. Uloga specifičnih mutacija X gena nije do kraja razjašnjena. Neki X gen mutanti, kao i delecije ove regije opisane su kod pacijenata s hepatocelularnim karcinomom. Za vreme životnog ciklusa se često javlja integracija genomske DNK HBV u ćelijske hromozome i javlja se u većini slučajeva hroničnog hepatitisa i HCC-a. Po integraciji virusne DNK u genom domaćina, često bude izbačen 3' kraj X gena. Pokazalo se da u razvoju HCC-a veliku ulogu ima nedostatak C-terminalne regije HBx protein jer izaziva oksidativni stress i indukuje oštećenja mitohondrijske DNK (43).

Mutacije u P genu

Mutacije P gena su značajne za uspeh antivirusne terapije analogima nukleoz(t)ida (NA) s obzirom da je reverzna transkriptaza (RT) ciljno mesto delovanja ovih lekova. Struktura NA je slična prirodnim nukleotidima, ali sa modifikacijom u baznim ili šećernim grupama, nakon čega stupaju u kompeticiju za vezivanje RT sa prirodnim nukleotidima nakon čega ometaju sintezu prajmera za (-) DNK lanac ili sprečavaju sintezu (+) ili (-) DNK lanca. DNK polimeraza povezuje nukleotide sa pgRNK i svojim aktivnim mestom i ugrađuje ih u novi DNK lanac. Sedam visokokonzerviranih funkcionalnih domena ima DNK polimeraza i obeleženi su slovima A-G. Molekulska

struktura i ciljno mesto delovanja je slično kod lamivudina i telbivudina, te imaju i sličan obrazac razvoja rezistentnih mutanata. Domen C DNK plimeraze, tzv. YMDD motiv predstavlja aktivno, katalitičko mesto ovog enzima i mutacije koje se tu dešavaju uslovljavaju rezistenciju na lamivudin i na taj način smanjuju afinitet za vezivanje NA, ali se održava sposobnost virusa za vezivanje prirodnih nukleotida (23).

Rezistencija na adefovir i tenofovir je zapažena na B i D domenu reverzne transkriptaze, izvan YMDD motiva. Supstitucija izoleucina za valin na 233 poziciji ne utiče samostalno na antivirusno dejstvo adefovira i nema uticaja na katalitičko mesto reverzne transkriptaze (43).

S obzirom da rezistencija na adefovir nije uslovljena mutacijama koje su vezane za YMDD motiv; ukoliko dođe do razvoja rezistencije na lamivudin, može se nastaviti adefovirom. Čak i kod pacijenata koji nisu lečeni NA dokazani su rezistentni sojevi virusa na ove lekove (23). Istraživanje Olijea (*Amini-Bavil-Olyae*) i sar. je pokazalo da pojava mutacije rtA194T delomično uzrokuje rezistenciju na tenofovir, ali i da utiče negativno na sposobnost replikacije HBV (43).

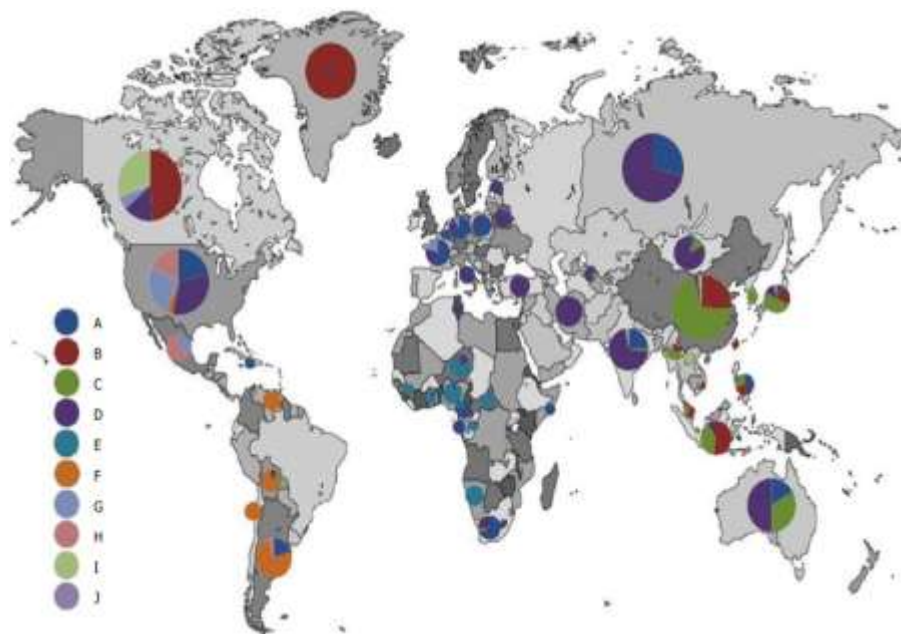
1.4.2. Genotipovi

HBV ima 10 genotipova koji su obeleženi slovima od A do J, a razlikuju se međusobno za 8–15% u kompletnim nukleotidnim sekvencama. Infekcije sa dva genotipa su retke, s obzirom da perzistentna infekcija jednim genotipom, štiti od infekcije drugim, verovatno zbog kompeticije za receptore. Genotipovi E, G i J nemaju dovoljnu heterogenost da bi bili podeljeni u suptipove, dok svi ostali genotipovi imaju suptipove i razlikuju za oko 4% u kompletnim nukleotidnim sekvencama. Subgenotipovi su obeleženi brojevima (3). Za genotip A su otkriveni genotipovi A1–A6 (23, 56, 57). U okviru genotipa B su opisani genotipovi B1–B8 (23, 58). Za genotip C neki autori definišu 14 subgenotipova C1–C14 (23, 59). Genotip D ima devet subgenotipova D1–D9 (23, 60). Za genotip F registrovani su subgenotipovi F1–F4 (23). Neki autori u okviru genotipa I, razmatraju postojanje dva subgenotipa–I1 i I2 (23, 61). Virusološke razlike su nastale evolucijom i prilagođavanjem sojeva kroz vreme i promenom u redosledu genoma. Dužina HBV genoma varira od 3182 bp kod najkraćih (genotip D) do 3248 bp kod najdužih genotipova (G). Genotip G ima 2 stop kodona u *core* regiji zbog čega nema mogućnost sekrecije HBeAg. Isto tako kod genotipa D G1896A *precore* (PC) mutacija onemogućuje ekspresiju HBeAg zbog stop kodona u *precore* regiji. A1762T i G1764A/T *basal core promoter* (BCP) mutacije su povezane sa težim formama kod genotipa A i D. Nukleotidne varijacije i delecije u pre-S regiji takođe su vezane uz specifični genotip (62).

Genotipovi HBV imaju različitu geografsku distribuciju zbog i dalje prisutne migracije stanovništva, globalizacije, interkontinentalnog saobraćaja i implementacije vakcinacije što sve dovodi do promene (engl. *shift*) u prevalenciji genotipova. Različiti

genotipovi mogu imati drugačiji efekat na određene antivirusne lekove, kao i različiti tok bolesti. Kod nas u R. Srbiji su najčešće infekcije genotipom D (86%) i genotipom A (14%). U svetu je genotip A čest u severozapadnoj Evropi i u SAD, a neki sojevi su registrovani na Filipinima, Hong Kongu i Jugoistočnoj Africi, verovatno zbog bliskog kontakta u prošlosti sa Severnom Amerikom. Genotip B i C u Aziji, posebno je genotip C čest na ostrvima Južnog Pacifika gde je prevalencija HBV visoka. Genotip D je najšire rasprostanjen, najviše je registrovan u Indiji, Mediteranskom bazenu i Srednjem istoku, genotip E je čest u Zapadnoj Africi, F u Centralnoj i Južnoj Americi, genotip G u Francuskoj i SAD, genotip H u Južnoj Americi i Meksiku (3), genotip I u istočnoj Indiji i najnoviji genotip J utvrđen je u Japanu (23, 61, 63, 64).

Kod genotipa D je najčešći HBV sa *precore* mutacijama, potom kod genotipa C i B, a kod genotipa A je najređi. Ovo je od značaja jer *precore* mutantni sojevi virusa izazivaju HBeAg negativni hronični hepatitis B koji je povezan sa bržom progresijom u cirozu jetre, kao i sa lošijim odgovorom na antivirusnu terapiju. Upravo HBeAg negativni hronični hepatitis B je prisutan u regionima gde dominira genotip D (3).



Slika 3. Globalna distribucija HBV genotipova (65)

1.5. Patogeneza

Patogeneza nije dovoljno razjašnjena, ali je zasigurno multifaktorska. Smatra se da HBV nema direktno citopatogeno dejstvo, već da je hepatocelularno oštećenje posledica dejstva celularnih i humoralnih imunoposredovanih mehanizama na virusne antigene (HBsAg, HBcAg, HBeAg). Hepatociti koji ekspresuju HBcAg postaju meta za citotoksične CD8⁺ limfocite (CTL), a senzibilišu i CD4⁺ limfocite koji luče citokine uključujući INF- γ i TNF- α , a imaju i antivirusno dejstvo sa krajnjim zajedničkim rezultatom koji dovodi do lize zaraženog hepatocita (što se odlikuje porastom ALT) i neutralizacije HBV (3, 7, 23, 67). Hronična HBV infekcija ne zavisi samo od intenziteta imunoodgovara koji je u ovom slučaju slab jer je slab odgovor CD4⁺ limfocita u ranoj fazi infekcije što za posledicu ima razvitak kvantitativno i kvalitativno slabiji CD8⁺ T-ćelijski odgovor, već zavisi i od genetske heterogenosti virusa i sposobnosti da izbegne imunoodgovor. Prisustvo HBeAg je potrebno za

perzistiranje infekcije i pored drugih virusnih proteina jer indukuje toleranciju T-limfocita i služi kao „mamac“, s obzirom da HBeAg i HBcAg dele T-ćelijski epitop. HBeAg suprimira i celularni i humoralni imunoodgovor na HBcAg. Prema tome HBeAg slabi dejstvo CTL na HBcAg i na taj način omogućava održavanje infekcije. CD4 + T-limfociti su na osnovu profila citokinske sekrecije podeljeni na dve subpopulacije: T-helper tip 1 (Th1) T-helper tip 2 (Th2). Th 1 ćelije dominantno luče interleukin 2 (IL-2), limfotoksin (TNF- β) i IFN- α i oni indikuju ćelijski imunoodgovor. Th 2 ćelije proizvode IL-4, IL-5 i IL-10 koji pospešuju humoralni imunoodgovor. Smatra se da je prevaga Th-1 nad Th-2 citokinskim odgovorom, odgovorna za eliminaciju virusa tokom akutne i hronične HBV infekcije. Dominacija Th 2 tipa citokinskog odgovora pospešuje produkciju antitela tokom hronične infekcije, a dominacija Th 1 tipa favorizovaće ćelijski imunoodgovor u akutnoj infekciji (3, 7, 23, 66).

1.6. Prirodni tok hronične HBV infekcije

Prirodni tok hronične HBV infekcije je određen dinamičnom interakcijom između replikacije virusa i imunoodgovora domaćina i prolazi kroz pet faza koje karakterišu infekcija ili hepatitis (7).

Prva faza bolesti je HBeAg pozitivna hronična HBV infekcija (ranije zvana imunotolerantna faza) koju karakteriše prisustvo HBsAg, HBeAg, visoka viremija HBV DNK i normalne vrednosti ALT (do 40 IU/L), dok u jetri postoji minimalna nekroinflamacija ili fibroza ili je ni nema. HBeAg deluje kao faktor tolerancije i utiče na stanje nereaktivnosti T-ćelija. S obzirom da HBeAg i HBcAg dele isti epitop koji ove proteine čini ciljnim u procesu imunoposredovane neutralizacije virusa. Ova faza je karakteristična kod ljudi koji su inficirani u prvim godinama života i kod njih traje duže što može biti zbog imunske nekompetentnosti bolesnika. Ova faza uobičajeno traje 10–30 godina, pacijenti su bez simptoma, ali su veoma zarazni zbog visokog nivoa viremije HBV DNK. (1, 3, 7, 23, 68–70).

Druga faza: HBeAg pozitivni hronični hepatitis B (imunoeliminatorna, imunoaktivna faza) koja brže nastaje i izraženija je ako je infekcija nastala kod odraslih, traje od nekoliko nedelja do nekoliko godina. U ovoj fazi bolesti je prisutan HBsAg i HBeAg, karakteristična je visoka viremija HBV DNK i povišene vrednosti ALT-a. U jetri je prisutna umerena ili izražena nekroinflamacija, te je ubrzan razvoj fibroze. Kod većine pacijenata, preko 90% prvo dolazi do skoka viremije, a potom do porasta ALT-a i uglavnom su bez simptoma. Ovu fazu karakteriše fluktuacija aminotferaza, prvenstveno ALT-a jer citotoksični T-limfociti uklanjaju inficirane

hepatocite. U egzacerbaciji bolesti koja se javlja u ovoj fazi, mogu se javiti simptomi poput slabosti, malaksalosti i oslabljenog apetita. Viremija HBV DNK je na početku visoka, a potom se snižava i dolazi do gubitka HBeAg uz moguću serokonverziju, odnosno pojavu anti-HBe antitela nakon čega nastaje treća faza bolesti (1, 3, 7, 23).

Treća faza: HBeAg negativna hronična HBV infekcija (inaktivna faza, nereplikativna, integrativna faza) koju karakteriše neprogresivna bolest jetre, prisutan HBsAg, kvantitativni HBsAg (qHBsAg) < 1000 IU/ml, HBeAg negativnost, anti-HBe antitela prisutna, nemerljiva ili niska viremija HBV DNK < 2000 IU/L, ALT normalne vrednosti. U ovoj fazi neki pacijenti mogu imati viremiju HBV DNK > 2000 IU/L, ali manju od 20.000 IU/L sa normalnim vrednostima ALT-a, a u jetri postoji minimalna nekroinflamacija i laka fibroza. Ova faza je rezultat dugoročne imunokontrole infekcije. Poznata i kao faza „zdravog vironoštva“ ili „inaktivno HBsAg nosilaštvo“. Međutim, za potpunu eliminaciju virusa najčešće je imunoodgovor nedovoljan, te može doći do reaktivacije bolesti, razvoja ciroze jetre, te je neophodno kontinuirano praćenje pacijenata (1, 3, 7, 23, 71).

Četvrta faza: HBeAg negativni hronični hepatitis B (HHB) koju karakteriše prisutan HBsAg, HBeAg-negativan uz pozitivna anti-HBe antitela, fluktuirajuće povišene vrednosti HBV DNK i ALT-a, a u jetri postoji umerena do teška nekroinflamacija i fibroza. Nakon HBeAg/antiHBe serokonverzije, kod 1– 5% pacijenata perzistira replikacija virusa uz biohemijske i patohistološke znake aktivne hronične infekcije. U ovoj fazi postoji visoki rizik progresije bolesti u cirozu jetre i nastanak HCC-a zbog čega je neophodno na tri meseca kontrolisati aminotransferaze, a

na šest meseci određivati alfa fetoproteina (AFP) i ehosonografiju trbuha radi pravovremene dijagnoze HCC-a (1, 3, 7, 23).

Peta faza: HBsAg negativna faza kod koje se HBsAg ne detektuje, ali su pozitivna anti HBc IgG antitela sa pozitivnim ili nedetektibilnim anti HBs antitelima. U ovoj fazi pacijenti imaju normalne vrednosti ALT-a, najčešće nedektibilnu viremiju HBV DNK, ali se može detektovati u jetri jer tu perzistira nizak nivo replikacije. U principu je ova faza povezana sa povoljnim ishodom bolesti i smanjenim rizikom od ciroze jetre i nastanka HCC-a, ali hemio i imunosupresivna terapija mogu dovesti do reaktivacije hronične HBV infekcije. Poznata je i kao okultna HBV infekcija jer se virus može reaktivirati iz cccDNK u hepatocitima (1, 3, 7, 23).

Najčešći razlozi koji su povezani sa okultnom HBV infekcijom su: slabo ili nereplikativna faza HBV infekcije, mutacije različitih DNK sekvenci, integracija HBV DNK u hromosome domaćina, interferencija HBV DNK sa drugim virusima, izmenjen imunoodgovor domaćina, infekcija HBV periferernih mononuklearnih ćelija, virusna perzistencija nakon ozdravljenja (72). Okultni hepatitis B se najčešće javlja među populacijama visokog rizika, a to su pacijenti na hemodijalizi, pacijenti kod kojih je urađena transplantacija i koinficirani su hepatitis C virusnom infekcijom (HCV). Od izuzetnog značaja je otkriti na vreme okultnu HBV infekciju i blagovremeno započeti lečenje jer je dobro poznato da može dovesti do razvoja ciroze jetre i HCC-a (3).

1.7. Kliničke karakteristike hronične HBV infekcije

Usled nedovoljne efikasnosti specifičnog T-ćelijskog odgovora dolazi do progresije akutne u hroničnu HBV infekciju. Najveća stopa progresije je kod novorođenčadi i male dece jer kod njih imunoodgovor nije dovoljno razvijen. Preko 90% kod perinatalno inficiranih, između prve i pete godine života 20–50% i 5–10% inficiranih u odraslom dobu razvije hroničnu HBV infekciju (7, 23, 73). Faktori rizika za razvoj hronične HBV infekcije pored uzrasta su: genetska predispozicija, muški pol, konzumiranje alkohola, imunosupresivna terapija, koinfekcija hepatitisom C, D, virusom humane imunodeficijencije (HIV), trudnoća, dijabetes melitus, gojaznost (3, 7).

Pacijenti sa hroničnom HBV infekcijom su uglavnom asimptomatski ili imaju blage, nespecifične simptome u vidu slabosti, malaksalosti, brzog zamaranja i oslabljenog apetita. Pojava simptoma je moguća kod ekstrahepatičnih manifestacija bolesti koje se javljaju kod 10–20% pacijenata, a nastaju zbog prisustva cirkulišućih imunokompleksa, te je neophodno obratiti pažnju na njih. Manifestuju se povišenom temperaturom, artritisom ili artralgijama, znacima vaskulitnog sindroma, ili kao poliarteritis nodosa, glomerulonefritis, mono/polineuritis. Progresijom bolesti u cirozu jetre će se razviti klinički značajni simptomi, kao što su: splenomegalija, palmarni eritem, spajder nevusi, *caput* medusa, palmarni eritem, atrofija testisa, ginekomastija, a u fazi dekompenzacije bolesti prisutni su ikterus, ascites, znaci hemoragijskog sindroma, periferni edemi, hepatička encefalopatija (3, 7, 23).

Na osnovu statusa HBeAg/antiHBe razlikuju se HBeAg pozitivni i HBeAg negativni hronični hepatitis B (1, 3, 23).

HBeAg pozitivni hronični hepatitis B je posledica infekcije „divljim“ tipom virusa, češći je kod muškaraca, a na tok bolesti najviše utiče starost pacijenta u momentu postavljanja dijagnoze. Perinatalno inficirani pacijenti će nakon 10–30 godina (jer imunotolerantna faza traje dugo) razviti srednje težak ili veoma težak oblik bolesti, dok osobe koje su inficirane u kasnijem životnom dobu će nakon mnogo kraćeg vremena razviti srednje težak do veoma težak oblik bolesti praćen povišenim aktivnostima aminotferaza i pogoršanjem histološkog nalaza. Nakon imunotolerantne faze dolazi do HBeAg serokonverzije, odnosno gubitka HBeAg i pojave anti HBe antitela, postepene normalizacije aminotferaza i pada viremije HBV DNK. Prediktivni faktori za spontanu serokonverziju su ženski pol, starije životno doba, visoka aktivnost aminotferaza (ALT/AST). Kod 50–70% pacijenata sa povišenom aktivnošću aminotferaza se nakon 5–10 godina javlja spontana serokonverzija. HBeAg/anti HBe serokonverzija kod većine pacijenata označava prelazak u sledeću fazu bolesti-fazu „zdravog“ nosilaštva virusa, odnosno inaktivno HBsAg pozitivno nosilaštvo virusa. Ovu fazu bolesti karakteriše HBsAg pozitivnost, HBeAg negativnost, anti-HBe pozitivnost, nemerljiv ili nizak nivo viremije HBV DNK, normalna aktivnost serumskih aminotferaza, a u histološkom nalazu bez fibroze ili sa malom fibrozom i bez nekroinflamatorne aktivnosti ili sa minimalnom (3, 23). Nakon više godina nemerljive viremije kod nekih pacijenata može doći do gubitka HBsAg i serokonverzije u anti HBs, ali se to dešava retko, svega 1–2% (74, 75). U ovoj grupi „zdravih“ nosilaca prognoza je

veoma dobra ukoliko nemaju znake ciroze jetre; međutim moguća je reaktivacija virusa kod 20–30% pacijenata često pokrenuta upotrebom alkohola, toksičnih lekova ili superinfekcijom drugim virusima, poput hepatitisa A, C, D (3, 23).

Kod 1– 5% pacijenata nakon postignute serokonverzije perzistira i dalje replikacija virusa što je praćeno biohemijskim i histološkim znacima hronične infekcije i spadaju u grupu pacijenata sa HBeAg negativnim hroničnim hepatitisom B (23).

Progresija hroničnog hepatitisa B u cirozu jetre je uslovljena dužinom trajanja infekcije, interakcijom domaćin–virus, perzistentnom virusnom replikacijom. Kod HBeAg pozitivnih pacijenata je učestalost progresije u cirozu je 2–5,5%, a kod HBeAg negativnih 8–10%. Između 41. i 52. godine starosti pacijenata najčešće se postavlja dijagnoza *ciroza jetre*. Predisponirajući faktori su merljiva viremija HBV DNK u serumu, starija životna dob, zloupotreba alkohola, koinfekcija sa drugim virusima (HCV, HDV, HIV), česte reaktivacije bolesti, stadijum nekroinformatornih promena i fibroze u momentu postavljanja dijagnoze (3). Smatra se da pacijenti inficirani genotipom C, posebno subgenotipom C2, imaju veći rizik od razvoja ciroze i HCC-a (76).

Ciroza jetre i HCC se razvijaju kod 15–40% pacijenata sa hroničnom HBV infekcijom. Kod pacijenata sa cirozom jetre prediktivni faktori za pojavu HCC-a su muški pol, starija životna dob, izloženost alfatoksinu, konzumiranje alkohola, pušenje, metabolički sindrom, dijabetes melitus, pozitivna porodična anamneza za HCC, nivoi qHBsAg, stepen viremije, mutacija virusa, koinfekcija sa HDV i HCV.

Zависи i od etničkih grupa i geografskog područja; viši je kod Azijata i Afrikanaca, niži kod pripadnika bele rase. Takođe primena antivirusne terapije je udružena sa dvostruko nižom incidencijom razvoja HCC (3).

1.8. Dijagnostika

Hronična HBV infekcija se dijagnostikuje prisustvom HBsAg u krvi dužim od šest meseci (3, 7, 23).

Sastoji se od serološke dijagnostike kojom se dokazuju antigeni virusa (HBsAg, HBcAg, HBeAg), antitela domaćina koja su nastala na antigenski podražaj (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe) i dijagnostike virusnog genoma (HBV DNK) metodama molekularne biologije. Ovo su glavni markeri kojima se dijagnostikuje HBV infekcija (7, 77).

HBsAg je otkriven 1960-ih godina i od tada se koristi kao značajan dijagnostički marker hepatitis B virusne infekcije (78–82). Prisutan je u serumu već šestog dana nakon infekcije, kod 90–95% pacijenata nestaje za nekoliko nedelja do šest meseci u akutnom hepatitisu, a ukoliko je prisutan duže od šest meseci označava perzistentnu infekciju (3, 7). U momentu pojave HBsAg 75–100% hepatocita je inficirano virusom i u akutnoj infekciji titar virusa je veoma visok 10^9 - 10^{10} viriona po mililitru. HBsAg se oko 10% kod obolelih od akutnog hepatitisa ne pojavljuje na početku bolesti, te je za postavljanje dijagnoze potrebno uraditi anti-HBc-IgM pozitivna antitela, rastući titar anti-HBc ili detektovati kasniju pojavu anti-HBs. Kod hroničnih nosilaca može doći do HBsAg negativizacije 5–8%, uz već ranije detektovana anti-HBc i kasniju pojavu anti-HBs (83).

- HBeAg je virusni protein koji je prisutan u replikativnoj fazi hronične HBV infekcije; javlja se istovremeno ili odmah nakon HBsAg, prisutan je u serumu već sedam dana nakon infekcije. U akutnom hepatitisu obično nestaje za dve nedelje

do dva meseca; perzistencija duža od 10 nedelja označava hroničnu infekciju i može biti prisutna duži niz godina označavajući akutnu replikaciju HBV, prema tome i infektivnost pacijenta za okolinu (7, 77, 83, 84).

- HBcAg je obavijen HBsAg, zbog čega se ne može direktno dokazati u serumu, te nema praktični značaj. Svaki HBcAg koji je neobložen će reagovati sa anti-HBc-svojim specifičnim antitelom, a time se blokira njegova detekcija (77, 84).
- IgM anti-HBc se pojavljuju brzo nakon infekcije, koreliraju sa aktivnom virusnom replikacijom i održavaju se tri do šest meseci u akutnom hepatitisu, ali se mogu pojaviti u 25% i kod egzacerbacije hroničnog hepatitisa B (7, 77, 84).
- IgG anti-HBc su najvažniji znak prethodne infekcije, pozitivna su i u fazi „prozora“ kada je HBsAg postao negativan, a anti-HBs se nisu još pojavila. Javljaju se neposredno nakon infekcije; održavaju se doživotno i predstavljaju antitela na HBcAg koji se isključivo dokazuje u hepatocitu (7, 77, 84).
- Anti-HBs/zaštitna antitela se javljaju neposredno nakon nestanka HBsAg (obično 3-4 meseca od početka infekcije), u serumu ostaju doživotno. U akutnoj infekciji označavaju ozdravljenje. Kod vakcinisanih osoba predstavljaju jedini marker HBV i, po pravilu, imaju viši titar nakon prirodne infekcije nego kod vakcinisanih (7, 77, 84).
- Anti-HBe antitela označavaju nizak nivo replikacije, u akutnom hepatitisu se javljaju po iščezavanju HBeAg. Prisutna su kod HBeAg negativnog

hroničnog hepatitisa B. Serokonverzija u hroničnom hepatitisu ne mora biti detektibilna (7, 77, 84).

- Cirkularna HBV DNK određuje se metodama molekularne biologije (*Real-time* PCR) i detektuju se i veoma niski nivoi HBV DNK u serumu, leukocitima periferne krvi i drugim ćelijama. U serumu je merljiva mesec dana od infekcije, u akutnoj nestaje zajedno sa HBsAg, a u hroničnoj se održava sa fluktuirajućim nivoom i pokazatelj je replikativne faze i kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih pacijenata (7, 77, 83, 84)

Novi dijagnostički markeri koji se u poslednje vreme istražuju su qHBsAg, HBcrAg i HBV RNK (85).

qHBsAg – označava kvantifikaciju HBsAg i postoji unazad 20-ak godina, ali je tek poslednjih nekoliko godina dobio na značaju nakon poboljšanja testova. Potvrđena je pozitivna korelacija između qHBsAg u serumu sa koncentracijom cccDNK u jedru hepatocita. Nivo qHBsAg je niži kod HBeAg negativnih nego kod HBeAg pozitivnih pacijenata. Nivo qHBsAg < 1000 IU/ml i viremija HBV DNK ispod 2000 IU/ml ukazuju na inaktivnu formu bolesti kod HBeAg negativnih pacijenata. qHBsAg ima značajnu ulogu prediktivnog faktora virusološkog odgovora u toku antivirusne terapije pegilovanim interferonom. Prema tome je izuzetno koristan marker u praćenju prirodnog toka hronične HBV infekcije, kao i u proceni efikasnosti terapije pegilovanim interferonom. Može da bude značajan prediktor HBsAg gubitka u toku antivirusne terapije NA, a i pokazatelj prekida terapije NA koji predstavlja najveći problem današnjice (3, 86–89).

Hepatitis B (*core*)-povezan antigen (HBcrAg) je nedavno otkriven kao dodatni marker za hroničnu HBV infekciju. Istovremeno detektuje HBeAg, HBcAg i p22cr. Mogao bi da bude značajan prediktor ishoda nakon prekida terapije NA i dokazana je značajna korelacija sa intrahepatičnom cccDNK (3). Prema tome može da predstavlja i neinvazivni virusni marker za indirektnu transkripcionu aktivnost cccDNK u jetri (90–93). Nivo HBcrAg je udružen sa povećanim rizikom od HCC kako kod nivnih, tako i kod pacijenata lečenih NA. Takođe je nađeno da HBcrAg korelira sa nivoom HBV DNK, ali ne i sa qHBsAg kod pacijenata na terapiji (91).

Serumska HBV RNK je još jedan od novih markera hronične HBV infekcije i u toku terapije NA pruža informacije o transkripcionoj aktivnosti cccDNK, čak iako postoji supresija HBV DNK (92). Najveći klinički značaj serumske HBV RNK se ogleda u proceni antivirusne potentnosti u toku terapije NA i pegilovanim interferenom, dobar je rani prediktor virusne mutacije u toku terapije lamivudinom, a nakon prekida antivirusne terapije predviđa HBV reaktivaciju, odnosno nizak nivo HBV RNK predstavlja prediktor trajno niske replikacije. Iz svega navedenog se zaključuje da bi marker HBV RNK mogao doprineti optimizaciji terapijske efikasnosti kod pacijenta sa hroničnom HBV infekcijom (92–94). U toku antivirusne terapije NA dolazi do supresije HBV DNK, ali NA ne utiču na produkciju HBV RNK; prema tome može se reći da predstavlja surogat marker za aktivnost cccDNK, posebno među pacijentima koji su na terapiji NA. Ranije se smatralo da nedektibilna viremija HBV DNK predstavlja stabilan virusološki odgovor, ali je taj pojam sada redefinisano i potrebno je da budu negativni i HBV DNK i HBV RNK. Nizak nivo qHBsAg udružen sa nedektibilnim HBV RNK kod i dalje pozitivnog HBsAg može da se nazove

„parafunkcionalno izlečenje“ što je veoma blizu funkcionalnom izlečenju kome težimo (93).

1.9. Terapija hronične HBV infekcije

Cilj antivirusne terapije kod hronične HBV infekcije jeste eliminacija virusne replikacije i sprečavanje dalje progresije bolesti u cirozu jetre i nastanka HCC-a. Cilj koji je realniji je suzbijanje virusne replikacije i uspostavljanje stabilne imunokontrole (SIK) (1, 3).

Ovaj cilj se postiže ukoliko se ispune sledeći uslovi:

- HBeAg/antiHBe serokonverzija (gubitak HBeAg i pojava antiHBe antitela),
- viremija HBV DNK ispod 2000 IU/ml (< 10.000 kopija/ml)
- uredna vrednost ALT (1, 3).

Idealan cilj je gubitak HBsAg sa kompletnim oporavkom, ali se to dešava izuzetno retko, posebno u grupi pacijenata sa odmaklom bolesti jetre. Spontani gubitak HBsAg ima svega 0,5–1,7% pacijenata tokom jednogodišnjeg praćenja, dok serokonverzija HBeAg/anti HBe iznosi 5–10% (3).

Na raspolaganju su nam dve glavne terapijske opcije u lečenju hronične HBV infekcije:

- pegilovani interferon alfa 2a (PegIFN α 2a),
- analozi nukleoz(t)ida: lamivudin (LAM), adefovir dipivoksil (ADV), entekavir (ETV), telbivudin (TBV), tenofovir disoproksil fumarate (TDF) i tenofovir alafenamide (TAF) (1, 3).

Lečenje sa PegIFN α 2a ima za cilj da indukuju dugoročnu imunokontrolu i glavna prednost je u ograničenoj dužini lečenja, mogućnost gubitka HBsAg kod nemerljive viremije i odsustvo rezistencije. Međutim, neophodna je dobra selekcija pacijenta u zavisnosti od faze bolesti, nivoa HBV DNK, qHBsAg, HBeAg statusa i genotipa (1, 3). Nedostaci su izraženi neželjeni efekti terapije (slabost, malaksalost, sindrom sličan gripu, opadanje kose, psihičke smetnje poput depresije, anksioznosti, sklonosti ka bakterijskim infekcijama, hematološki poremećaji, dekompenzacija aktuelne bolesti jetre, poremećaj rada štitaste žlezde, plućne, kardijalne, metaboličke i psihijatrijske bolesti i mnoge druge), supkutana primena, visoki troškovi lečenja i nepostizanje zadovoljavajućeg uspeha lečenja (95). Primena PegIFN α 2a je kontraindikovana kod dekompenzovane ciroze jetre, autoimunih bolesti, psihoza, depresije itd. (1, 3).

Lečenje NA je dugoročno, ovi lekovi imaju veliku antivirusnu efikasnost, vrlo su bezbedni, dobro se podnose, imaju šire indikacije, a manje kontraindikacija od PegIFN α 2a. NA su jedina opcija u lečenju pacijenata koji su imunokompromitovani i imaju veliku opasnost od reaktivacije hronične HBV infekcije. Kombinovana terapija analogima NA i PegIFN α 2a je i dalje kontroverzna i zahteva dalja istraživanja (1, 3).

Tabela 1. Prednosti i mane primene PegIFN α 2a i NA (1, 3)

	PegIFN α 2a	NA
Prednosti	<ul style="list-style-type: none"> • jasno definisano trajanje terapije • odsustvo rezistencije • viša stopa serokonverzije HBeAg/anti-HBe, HBsAg/anti-HBs uz 12-mesečnu terapiju 	<ul style="list-style-type: none"> • dobra tolerancija • potentan antivirusni efekat • oralna primena
Mane	<ul style="list-style-type: none"> • neželjeni efekti • supkutana primena • umereni antivirusni efekat • slabija tolerancija 	<ul style="list-style-type: none"> • dugotrajna primena • nepoznata sigurnost pri dugotrajnoj primeni • moguća rezistencija

NA su podeljeni na lekove sa visokom i niskom genetskom barijerom. U lekove sa visokom genetskom barijerom spadaju: entekavir (ETV), tenofovir disoproksil fumarate (TDF) i tenofovir alafenamide (TAF). Lekovi sa niskom genetskom barijerom su: lamivudin (LAM), telbivudin (TBV), adefovir dipivoksil (ADV) (1, 3).

Prema preporukama Evropske asocijacije za izučavanje jetre iz 2017. godine (EASL) lekovi sa niskom genetskom barijerom više se ne preporučuju za lečenje hronične HBV infekcije.

Kod nas se lamivudin koristi kod strogo selektovanih pacijenata:

- sa niskom HBV DNK viremijom < 20.000 IU/ml
- sa umerenom fibrozom jetre F2
- kod trudnica
- radi prevencije egzacerbacije hronične HBV infekcije kod primene imunosupresivne terapije

Kod svih ostalih pacijenata treba koristiti TDF kao prvu liniju terapiju (3).

S obzirom da je terapija NA dugoročna, sve više su istraživanja usmerena na pitanje kada treba prekinuti njihovu primenu. U svakodnevnoj kliničkoj praksi prekid antivirusne terapije NA i dalje predstavlja veliki izazov uprkos postojećim vodičima. Kompletna eradikacija virusa nije moguća zbog perzistentne cccDNK u jetri. Trenutne terapijske opcije dovode do supresije virusne replikacije, ali ne i do eradikacije virusa, te nakon prekida antivirusne terapije dolazi do reaktivacije bolesti (85).

Zvanične preporuke prema EASL iz 2017. godine su da kod HBeAg pozitivnih pacijenata koji imaju nimerljivu viremiju HBV DNK u toku primene NA sa visokom genetskom barijerom terapija može prekinuti 24–48 nedelja nakon postignute HBe serokonverzije nakon čega treba kontrolisati HBsAg na svakih šest meseci radi

eventualne negativizacije. Kod HBeAg negativnih pacijenata za prekid terapije NA ne postoje jasno definisani kriterijumi, već se preporučuje dugotrajna upotreba NA (1, 3).

Trenutni ciljevi postojeće antivirusne terapije su poboljšavanje kvaliteta života, sprečavanje progresije bolesti u cirozu jetre, dekompenzacija ciroze, razvoj hepatocelularnog karcinoma i smrti (90).

U razvoju su novi antivirusni lekovi (inhibitori ulaska u ćelije, replikacije, ugradnje, sekrecije i imunomodulatorne terapije) zbog čega su neophodni novi dijagnostički markeri hronične HBV infekcije (qHBsAg, HBcrAg, HBV RNK) da bi se postigli novi ciljevi koji se baziraju na funkcionalnom izlečenju koje podrazumeva nedektibilan HBsAg i HBV DNK sa serokonverzijom ili bez nje u anti-HBs (90).

2. CILJEVI

1. Odrediti graničnu vrednost qHBsAg kod nelečenih pacijenta sa aktivnom ili inaktivnom formom hronične hepatitis B virusne infekcije.
2. Ispitati nivo qHBsAg kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih pacijenata i kod nelečenih pacijenata.
3. Ispitati korelaciju između qHBsAg i PCR HBV DNK kod nelečenih pacijenata.
4. Ispitati vrednosti qHBsAg i PCR HBV DNK u toku antivirusne terapije analogima nukleoz(t)ida.

3. HIPOTEZE

1. Pacijenti sa inaktivnim hepatitisom imaju niže vrednosti qHBsAg (ispod granične vrednosti) od pacijenata sa aktivnim hepatitisom B.
2. Nivo qHBsAg je veći kod HBeAg pozitivnih, nego kod HBeAg negativnih pacijenata.
3. Nivo qHBsAg je visoko senzitivna metoda i korelira sa HBV DNK viremijom kod nelečenih pacijenata.
4. Vrednost qHBsAg korelira sa viremijom HBV DNK u toku antivirusne terapije analogima nukleoz(t)ida.

4. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je koncipirano kao prospektivna studija preseka koja je obuhvatila 238 pacijenata Odseka hepatitisa i oboljenja hepatobilijarnog trakta, Klinike za infektivne bolesti, Kliničkog centra Vojvodine sa dijagnozom hronične HBV infekcije u periodu 2019./2020. godine koji su zadovoljili kriterijume za uključanje u studiju.

Dijagnoza hronične HBV infekcije postavljena je na osnovu kliničke slike, biohemijskih nalaza, virusoloških markera, HBsAg pozitivnosti u krvi duže od šest meseci, kao i dopunske serološke dijagnostike HBeAg radi određivanja faze bolesti.

Studiju je odobrio Etički komitet Kliničkog centra Vojvodine i Etički odbor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i sprovedena je prema etičkim principima dobre kliničke prakse.

Svakom ispitaniku uzeti su detaljni anamnestički podaci i objašnjen cilj istraživanja, proces dijagnostičke obrade i njihovo učešće u njemu, nakon čega im je dato da pročitaju tekst sa informacijama za ispitanika i potom potpišu Informativni pristanak za učešće u studiji.

Pacijenti su podeljeni u dve grupe:

Prvu grupu čini 112 nelečenih (naivnih) pacijenata sa dijagnozom aktivne ili inaktivne forme hronične HBV infekcije.

Aktivna HBV infekcija podrazumeva: HBeAg pozitivne i HBeAg negativne pacijente, vrednosti ALT i AST iznad referentnog opsega u kontinuitetu mereno u

razmaku od tri meseca tokom godinu dana, PCR HBV DNK > 2000 IU/ml.

Inaktivna HBV infekcija podrazumeva: HBeAg negativne pacijente, ALT i AST uredne vrednosti u kontinuitetu mereno u razmaku od tri meseca u toku jedne godine, PCR HBV DNK < 2000 IU/ml.

Drugu grupu čini 126 pacijenata sa hroničnom HBV infekcijom koji su na antivirusnoj NA.

Pacijenti iz druge grupe su dodatno podeljeni na dve podgrupe:

Prvu podgrupu čini 75 pacijenta koji su na antivirusnoj terapiji lamivudinom.

Drugu podgrupu čini 51 pacijent koji su na antivirusnoj terapiji tenofovir disoproksil fumaratom.

Obe podgrupe su podeljene na HBeAg pozitivne i HBeAg negativne pacijente.

4.1. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz istraživanja

Kriterijumi za uključivanje u prvu grupu istraživanja:

- Hronična hepatitis B virusna infekcija;
- Pacijenti koji nisu na antivirusnoj terapiji;
- Negativni na hepatitis C i HIV;
- Pacijenti stariji od 18 godina.

Kriterijumi za isključivanje iz prve grupe istraživanja:

- Akutna hepatitis B virusna infekcija;
- Pacijenti koji su na antivirusnoj terapiji NA;
- Prisustvo koinfekcija hepatitisom C i HIV-om;
- Pacijenti sa hepatocelularnim karcinomom i drugim malignim

oboljenjima;

- Autoimuni hepatitis;
- Dekompenzovana ciroza jetre;
- Pacijenti mlađi od 18 godina.

Kriterijumi za uključivanje u drugu grupu istraživanja:

- Hronična hepatitis B virusna infekcija;
- Pacijenti koji su na antivirusnoj terapiji NA minimalno godinu dana;
- Negativni na hepatitis C i HIV;
- Pacijenti stariji od 18 godina.

Kriterijumi za isključivanje iz druge grupe istraživanja:

- Akutna hepatitis B virusna infekcija;
- Pacijenti koji nisu na antivirusnoj terapiji NA ili su na antivirusnoj terapiji

NA kraće od godinu dana;

- Prisustvo koinfekcija hepatitisom C i HIV-om;
- Pacijenti sa hepatocelularnim karcinomom i drugim malignim

oboljenjima;

- Autoimuni hepatitis;
- Dekompenzovana ciroza jetre;
- Pacijenti mlađi od 18 godina.

4.2. Ispitivani parametri

Kod svih pacijenata uključenih u istraživanje evidentirani su demografski i ostali podaci iz istorije bolesti: uzrast, pol, pretpostavljeni način transmisije, dužina trajanja hronične HBV infekcije do momenta uključivanja u istraživanje.

Urađene su sledeće laboratorijske analize:

1. Rutinske laboratorijske analize krvi: koncentracije alanin aminotransferaza (ALT) i aspartat aminotransferaza (AST).
2. Za određivanje HBeAg uzorkovano je 8,5 ml pune krvi u serumske epruvete i navedena analiza je urađena u Centru za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine.
3. Da bi se isključila koinfekcija sa hroničnim hepatitisom C i HIV-om (*Human immunodeficiency Virus*), sakupljeno je po 8,5 ml pune krvi u serumske epruvete za serološke analize (IV generacija imunoeseja) za testiranje na anti-HCV i anti-HIV-ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) metodom i navedena analiza je urađena u laboratoriji za virusološku i PCR dijagnostiku Odeljenja za specijalizovanu laboratorijsku dijagnostiku Centra za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine ili u Centru za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine.
4. Određivanje koncentracije HBV *Real-time PCR (polymerase chain reaction)* metodom urađeno je na *Abbott m2000rt* aparatu sa automatskom izolacijom HBV DNK na *Abbott m2000sp.* za koju je uzorkovano po 3 ml pune

krvi u dve epruvete sa EDTA i poslato je na analizu u laboratoriju za virusološku i PCR dijagnostiku Odeljenja za specijalizovanu laboratorijsku dijagnostiku Centra za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine.

5. Za određivanje qHBsAg uzorkovano je 8,5 ml pune krvi u serumske epruvete, koje su nakon centrifugiranja stavljene u kivete u kojima je uzorak čuvan zamrznut na temperaturi -20 stepeni do momenta analize. Korišćen je *Elecsys HBsAg II Quant II assay (Roche Diagnostics, Germany)* kit i rađeno je na aparatu *Cobas e 411* koji detektuje vrednosti od 5 do 13.000 IU/ml sa dilucijom u odnosu 1 : 100, vrednosti ispod nivoa detekcije označeni su kao: < 5 , a vrednosti iznad kao: > 13.000 IU/ml. Za vrednosti qHBsAg koje su veće od 13.000 IU/ml, urađena je dalja ručna dilucija do dobijanja konačne vrednosti.

4.3. Indikacije za antivirusnu terapiju

Antivirusna terapija NA je sprovedena prema važećim preporukama Evropske asocijacije za bolesti jetre (EASL 2017. godina) kod 126 pacijenata koji su ispunjavali sledeće kriterijume:

- viremija HBV DNK > 2000 IU/ml (> 10.000 kopija);
- ALT iznad gornje granice normale (GGN);
- Histopatološki nalaz sa umerenom ili teškom fibrozom ili nekroinflamacijom.

Pacijentima koju su u imunotolerantnoj fazi, mlađi od 30 godina, sa vrednostima ALT u referentnom opsegu i visokom viremijom HBV DNK ($> 10^7$ IU/ml), bez porodične anamneze za HCC ili cirozu jetre, nije odmah uključena antivirusna terapija NA, već su redovno praćeni na tri do šest meseci.

Antivirusna terapija NA nije uključena pacijentima koji su u inaktivnoj fazi hronične HBV infekcije, odnosno „inaktivnim HBsAg nosiocima“ sa nemerljivom ili niskom viremijom HBV DNK (< 2000 IU/ml), normalnim nivoom aminotransferaza i normalnim histopatološkim nalazom u tkivu jetre. Nastavljeno je redovno praćenje pacijenata na tri do šest meseci.

Kriterijumi za sprovođenje terapije su isti i kod HBeAg pozitivnih i kod HBeAg negativnih pacijenata.

4.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka urađena je u programu SPSS v 20.0. Kategorijalne varijable prikazane su u formi apsolutnih i relativnih vrednosti – n (%). Rezultati kontinuiranih varijabli prikazani su kao aritmetička sredina i standardna devijacija, ili medijana i interkvartilni raspon, u zavisnosti od distribucije. Za procenu normalnosti raspodele korišćeni su Šapiro-Volkov i Kolmogorov-Smirnov test (*Shapiro-Walk* i *Kolmogorov-Smirnov*), u zavisnosti od broja bolesnika u posmatranoj podgrupi. S obzirom na to da je za većinu varijabli raspodela značajno odstupala od normalne, u daljoj analizi korišćen je neparametrijski pristup. Poređenje kategorijalnih varijabli između dve grupe ispitanika vršeno je χ^2 testom, dok su razlike u vrednostima kontinuiranih varijabli između dve grupe ispitanika poređene Man-Vitnijevim U-testom (*Mann-Whitney U*). Sa ciljem pronalaska granične (*cut-off*) vrednosti ispitivanog parametra na osnovu koje bi se mogla odrediti pripadnost posmatranim grupama ispitanika konstruisane su ROC krive, izračunate površine ispod ROC kriva (*area under the curve*), te određena granična vrednost koja odgovara najboljem odnosu senzitivnosti i specifičnosti. Korelacije između posmatranih varijabli ispitivane su Spirmanovom korelacijom ranga. Statistički značajnim smatrane su vrednosti $p < 0,05$.

5. REZULTATI

Istraživanjem je obuhvaćeno 238 pacijenata Odseka hepatitisa i oboljenja hepatobilijarnog trakta, Klinike za infektivne bolesti Kliničkog centra Vojvodine sa dijagnozom hronične HBV infekcije koji su zadovoljili kriterijume za uključivanje u studiju.

Prosečna starost pacijenata obuhvaćenih istraživanjem bila je $50,62 \pm 15,55$ godina (raspon 18–83).

Distribucija po polu pokazuje veću zastupljenost muškog u odnosu na ženski pol: 153/238 (64,3%) pacijenata muškog i 85/238 (35,7%) ženskog pola.

Prosečna dužina trajanja hronične HBV infekcije od momenta postavljanja dijagnoze do momenta uzimanja uzorka za ispitivanje iznosila je 4 (1–11) godina.

Pacijenti su podeljeni u dve grupe:

Prvu grupu činilo je 112/238 (47,1%) pacijenata koji nisu lečeni antivirusnom terapijom NA (nelečeni ili naivni pacijenti).

Drugu grupu činilo je 126/238 (52,9%) pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji NA (lamivudinom ili tenofovir disoproksil fumaratom).

5.1. Rezultati ispitivanja nelečenih (naivnih) pacijenata

U grupi naivnih pacijenata muški pol je zastupljeniji 65/112 (58%) u odnosu na ženski pol 47/112 (42%), a prosečna starost iznosila je $48,27 \pm 15,14$ (raspon 18–82).

Prosečna dužina trajanja hronične HBV infekcije od momenta postavljanja dijagnoze do momenta uzimanja uzorka za ispitivanje iznosila je 3 (0,1–11,0) godina.

HBeAg pozitivnih bilo je 18/112 (16,1%) pacijenata, a HBeAg negativnih 94/112 (83,9%) pacijenta.

Najčešći pretpostavljeni način transmisije hronične HBV infekcije bila je vertikalna transmisija kod 19/112 (17%) pacijenata, potom seksualni put kod 15/112 (13,4%), a podatak o operativnoj intervenciji je navelo 6/112 (5,4%) pacijenata, transfuziju krvi 8/112 (7,1%) pacijenata, a najređi put prenosa bila je intravenska inokulacija kod 1/112 (0,9%) pacijenata. Nepoznati način transmisije imalo je 63/112 (56,3%) pacijenta.

U biohemijskim pokazateljima povišene vrednosti ALT (iznad GGN) imalo je 25/112 (23,1%) pacijenata, prosečna vrednost iznosila je 26 (18–44,7) i 19/112 (17,6%) pacijenata je imalo povišene vrednosti AST (iznad GGN), a posečna vrednost iznosila je 25 (21–35,7).

Prosečna vrednost qHBsAg iznosila je 514 (5–1.666), a viremije HBV 489 (25–4.190).

Demografske karakteristike, pretpostavljeni način transmisije, dužina trajanja infekcije, biohemijski parametri, vrednosti qHBsAg i viremije HBV DNK prve grupe ispitanika prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Demografske karakteristike i biohemijski parametri nelečenih (naivnih) pacijenata

	Nelečeni (naivni) pacijenti (n = 112)
Pol	
Muški	65 (58%)
Ženski	47 (42%)
Uzrast	48,27 ± 15,14
Dužina hronične HBV infekcije	3 (0,1–11,0)
HBeAg	
Pozitivni	18 (16,1%)
Negativni	94 (83,9%)
Način transmisije	
Transfuzija	8 (7,1%)
Seksualnim putem	15 (13,4%)
Operativne intervencije	6 (5,4%)
Vertikalna	19 (17%)
Intravenska zloupotreba narkotika	1 (0,9%)
Nepoznat	63 (56,3%)
AST	25,0 (21–35,7)
AST iznad GGN	19 (17,6%)
ALT	26 (18–44,7)
ALT iznad GGN	25 (23,1%)
qHBsAg	514 (5–1.666)
Viremija HBV DNK	489 (25–4.190)

U grupi naivnih pacijenata, ispitane su korelacije nivoa qHBsAg sa uzrastom pacijenta, dužinom trajanja hronične HBV infekcije, viremijom HBV DNK, kao i sa vrednostima aminotferaza (Tabela 2).

Tabela 2. Rezultati korelacionih analiza

		Uzrast	dužina HBV infekcije	qHBsAg	PCR HBV DNK	AST	ALT
Uzrast	Koeficijent	1.000	.086	-.429**	-.267**	-.129	-
	ρ						.248**
	Sig. (2-tailed)	.	.376	.000	.005	.182	.010
	N	112	108	112	111	108	108
Dužina trajanja HBV infekcije	Koeficijent	.086	1.000	-.220*	-.233*	-.129	-.120
	ρ						
	Sig. (2-tailed)	.376	.	.022	.016	.183	.215
	N	108	108	108	107	108	108
qHBsAg	Koeficijent	-.429**	-.220*	1.000	.605**	.127	.258**
	ρ						
	Sig. (2-tailed)	.000	.022	.	.000	.192	.007
	N	112	108	112	111	108	108

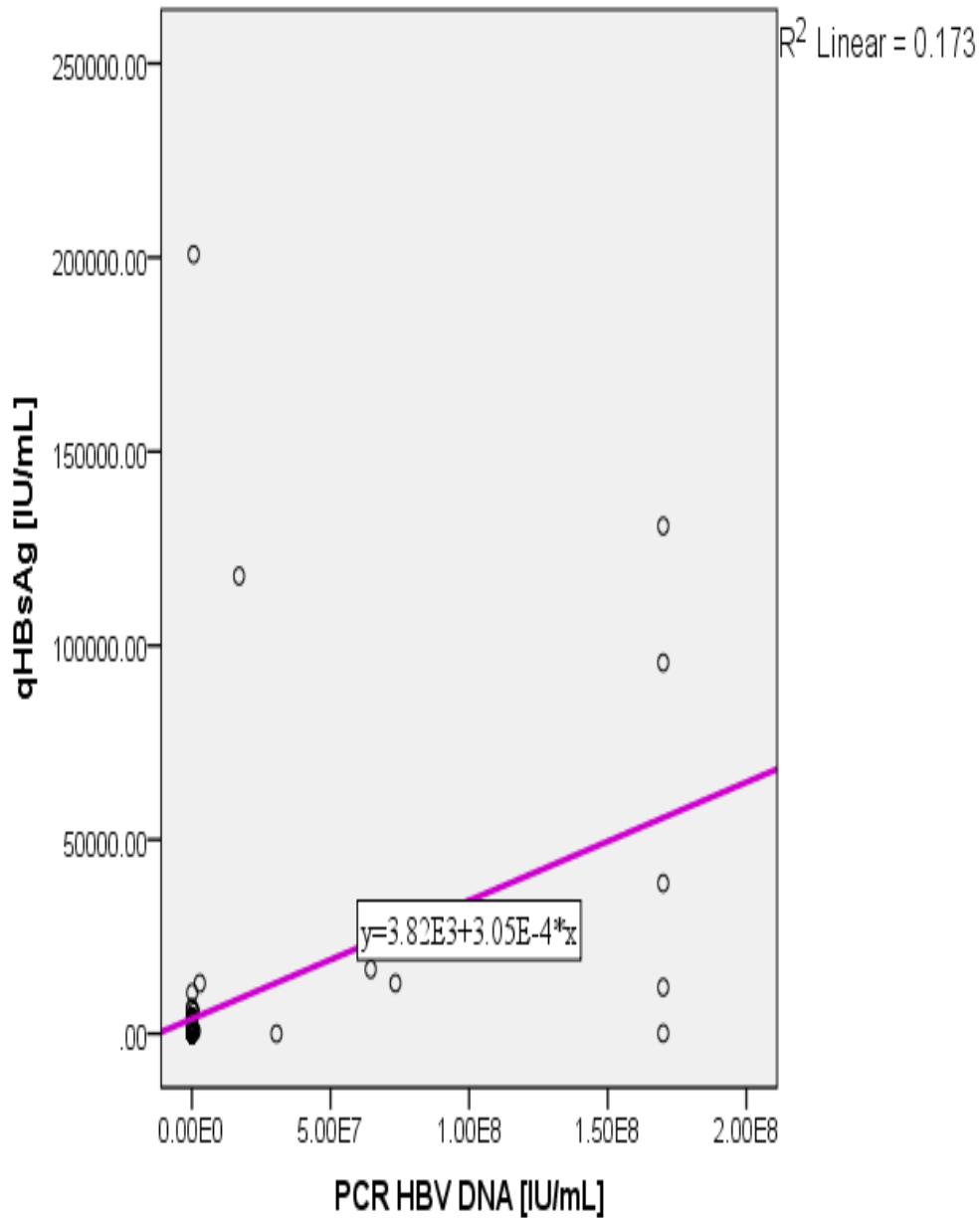
PCR HBV DNK	Koeficijent						
	ρ	-.267**	-.233*	.605**	1.000	.322**	.395**
	Sig. (2-tailed)	.005	.016	.000	.	.001	.000
	N	111	107	111	111	107	107
AST	Koeficijent						
	ρ	-.129	-.129	.127	.322**	1.000	.743**
	Sig. (2-tailed)	.182	.183	.192	.001	.	.000
	N	108	108	108	107	108	108
ALT	Koeficijent						
	ρ	-.248**	-.120	.258**	.395**	.743**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.010	.215	.007	.000	.000	.
	N	108	108	108	107	108	108

***. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).*

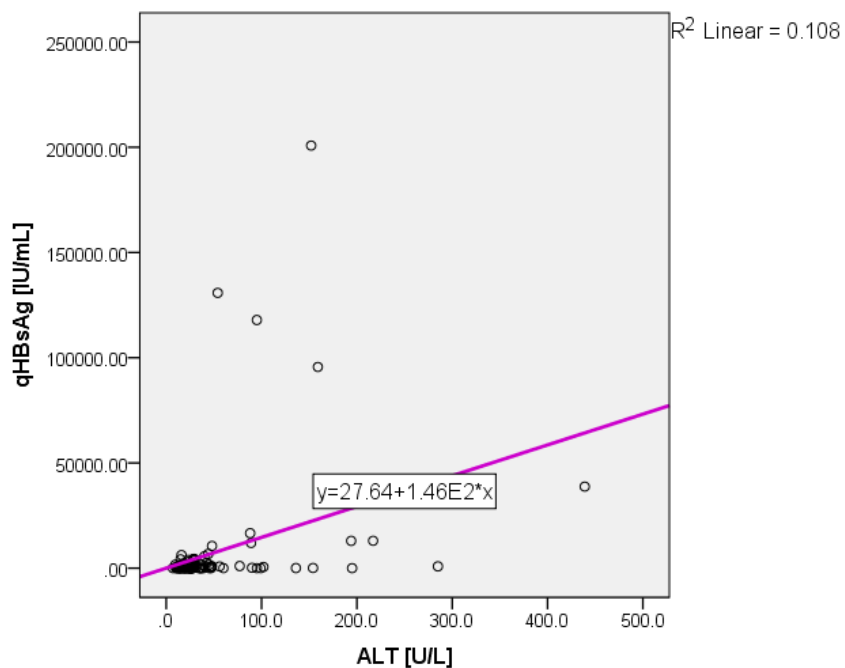
**. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).*

Rezultati pokazuju da u grupi naivnih pacijenata qHBsAg postoji statistički značajna pozitivna korelacija sa viremijom HBV DNK, korelacijom visokog intenziteta. Statistički značajna pozitivna korelacija qHBsAg zabeležena je i sa nivoom ALT-a, ali je ona slabog do umerenog intenziteta. Nije zabeležena statistički značajna korelacija nivoa qHBsAg sa nivoom AST-a.

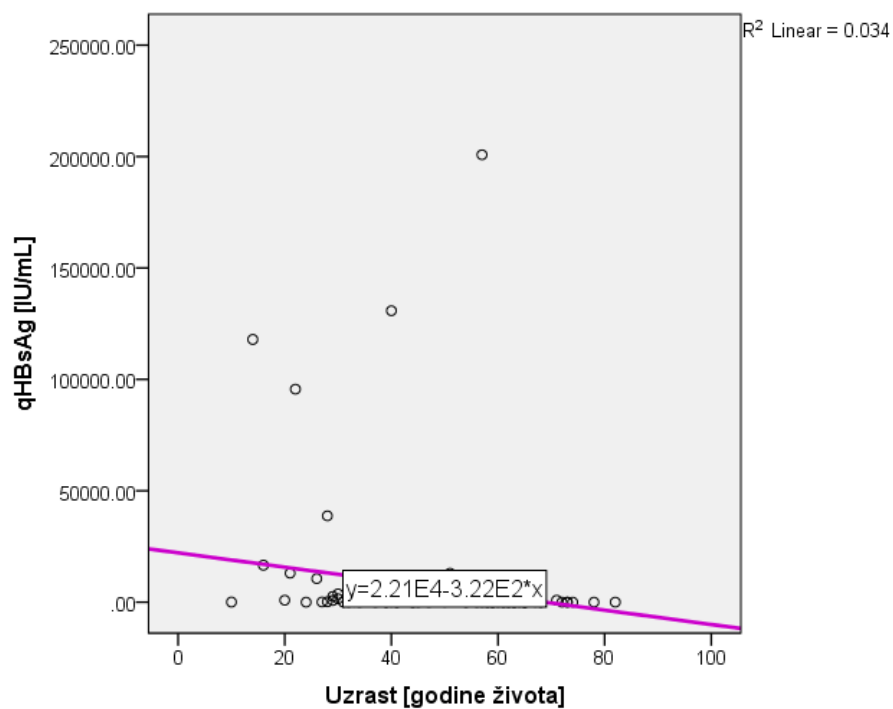
Pored ovoga, pokazana je i statistički značajna negativna korelacija qHBsAg sa uzrastom pacijenta, kao i sa dužinom hronične HBV infekcije. Zabeležena korelacija sa uzrastom je umerenog, dok je korelacija sa dužinom hronične HBV infekcije slabog intenziteta.



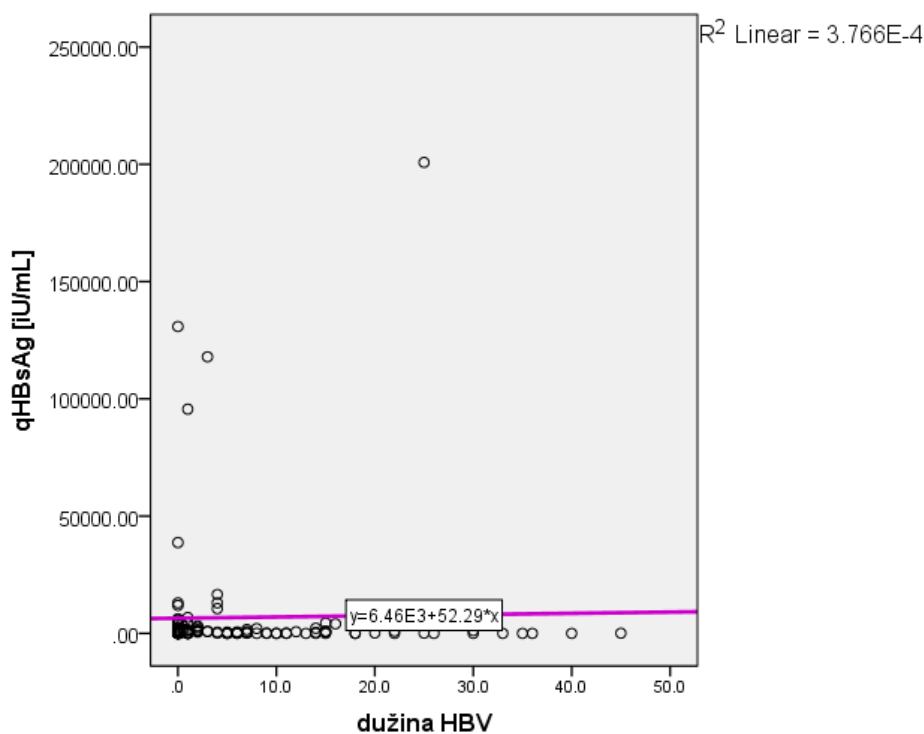
Grafikon 1. Prikaz korelacije qHBsAg sa viremijom HBV DNK



Grafikon 2. Prikaz korelacije qHBsAg sa ALT-om kod naivnih pacijenata



Grafikon 3. Prikaz korelacija qHBsAg sa uzrastom pacijenata



Grafikon 4. Prikaz korelacija qHBsAg sa dužinom hronične HBV infekcije

S obzirom na činjenicu da qHBsAg i viremija HBV DNK opadaju statistički značajno sa uzrastom pacijenta, parcijalnom korelacijom ispitana je povezanost qHBsAg i viremije HBV DNK kada se ukloni uticaj uzrasta. Rezultati analize parcijalne korelacije pokazuju da, i kada se ukloni uticaj uzrasta pacijenta, qHBsAg i viremija HBV DNK i dalje statistički značajno pozitivno koreliraju korelacijom slabog do umerenog intenziteta ($p < 0,001$, $\rho = 0,393$).

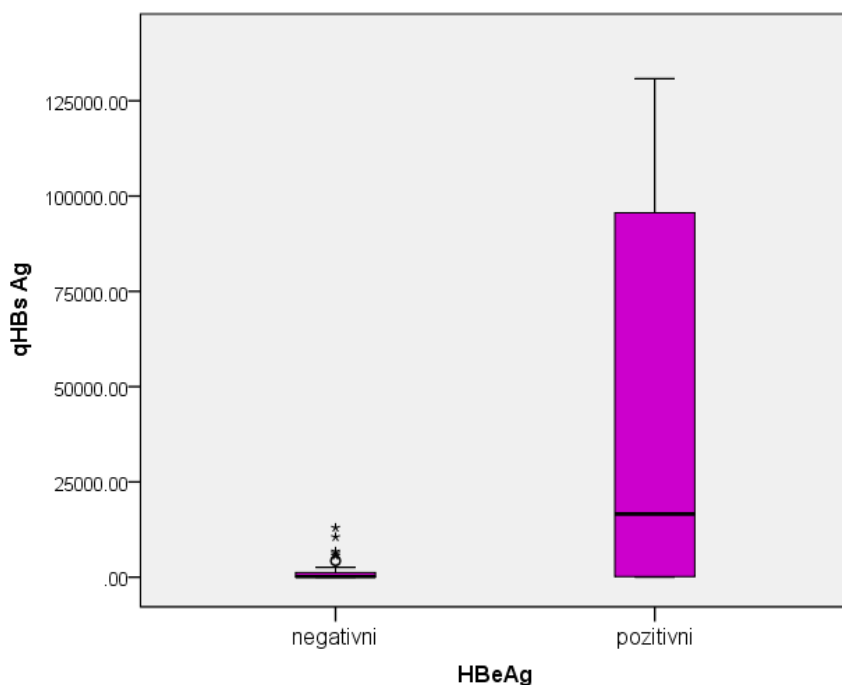
Slično ispitivanje sprovedeno je i u slučaju korelacije qHBsAg sa nivoom ALT-a, uz kontrolu uticaja starosti pacijenata. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da je korelacija qHBsAg i ALT-a statistički značajna ($p = 0.002$), pozitivnog smera, slabog do umerenog intenziteta ($\rho = 0.302$) i u slučaju kada se ukloni uticaj starosti pacijenta.

U nastavku istraživanja uporedili smo nivoe qHBsAg kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih pacijenata u grupi naivnih pacijenata i rezultati su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Demografske karakteristike, biohemijski nalazi i vrednosti nivoa qHBsAg kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih pacijenata u grupi naivnih pacijenata

	HBeAg + (n = 18)	HBeAg- (n = 94)	P
Uzrast	47 (21–59)	49 (39–61)	0.358
Dužina HBV infekcije	3 (0,2–4,5)	3 (0,1–14,0)	0.265
ALT	95 (55–156)	25 (17–34)	< 0.001
AST	62 (38–81)	24 (21–28)	< 0.001
qHBsAg	910,7 (47,9–52.960,0)	401,5 (5,0–1426,7)	0.032
PCR HBV DNK	9.000.000,0 (19.980,0– 170.000.000,0)	264,0 (20,0-1825,0)	< 0.001

Koncentracija qHBsAg, viremija HBV DNK, kao i koncentracije ALT-a i AST-a pokazuju statistički značajno više vrednosti u grupi HBeAg pozitivnih, nego u grupi HBeAg negativnih pacijenata, dok kod uzrasta pacijenta i dužine hronične HBV infekcije nije dostignuta statistička značajnost.



Grafikon 5. Prikaz poređenja nivoa qHBsAg kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih naivnih pacijenata

U daljem istraživanju grupa naivnih pacijenata, prema prethodno definisanim kriterijumima, podeljena je na grupu pacijenata sa aktivnom i inaktivnom formom hronične HBV infekcije.

Aktivna hronična HBV infekcija zabeležena je kod 42/112 (37,5%) pacijenata prosečne starosti 44 (30– 57) godina, dok je inaktivna forma bolesti zabeležena kod 70/112 (62,5%) pacijenata prosečne starosti 52 (39– 62,0) godina. Man-Vitnijev test pokazuje da ima statistički značajne razlike u uzrastu pacijenata sa aktivnom i inaktivnom formom hronične HBV infekcije. qHBsAg je statistički značajno niži kod pacijenata sa inaktivnom formom hronične HBV infekcije (Tabela 4).

Tabela 4. Demografske karakteristike, vrednosti biohemijskih nalaza, qHBsAg kod aktivne i inaktivne forme hronične HBV infekcije kod naivnih pacijenata

	Aktivni (n = 42)	Inaktivni (n = 70)	p
Uzrast	44,0 (30,0–57,0)	52,0 (39,0–62,0)	0.023
Dužina HBV infekcije	1,0 (0,15–5,0)	5,0 (0,1–14,0)	0.139
ALT	48 (25–98.5)	24.5 (16–28)	0.000
AST	40 (25–66)	23 (20–26)	0.000
qHBsAg	1.159,8 (108,4–6.763,0)	78,8 (5,0–903)	0.000

Radi određivanja *cut off* vrednosti qHBsAg na osnovu koje bi se moglo pretpostaviti da li se radi o aktivnoj ili inaktivnoj formi bolesti kod nelečenih pacijenata načinjena je analiza ROC krive. Površina ispod ROC krive (AUC) iznosi 0.734, što analizu čini statistički značajnom na nivou $p < 0,001$. Vrednosti qHBsAg iznad 800 IU/ml, sa senzitivnošću od 60% i specifičnošću od 70% ukazuju na to da bi se moglo raditi o aktivnoj hroničnoj HBV infekciji. Povećanje specifičnosti analize na 90%, mogli bismo da kažemo da pacijenti sa vrednostima qHBsAg preko 2.000 IU/ml sa 90% sigurnosti imaju aktivnu formu bolesti.

Area Under the Curve

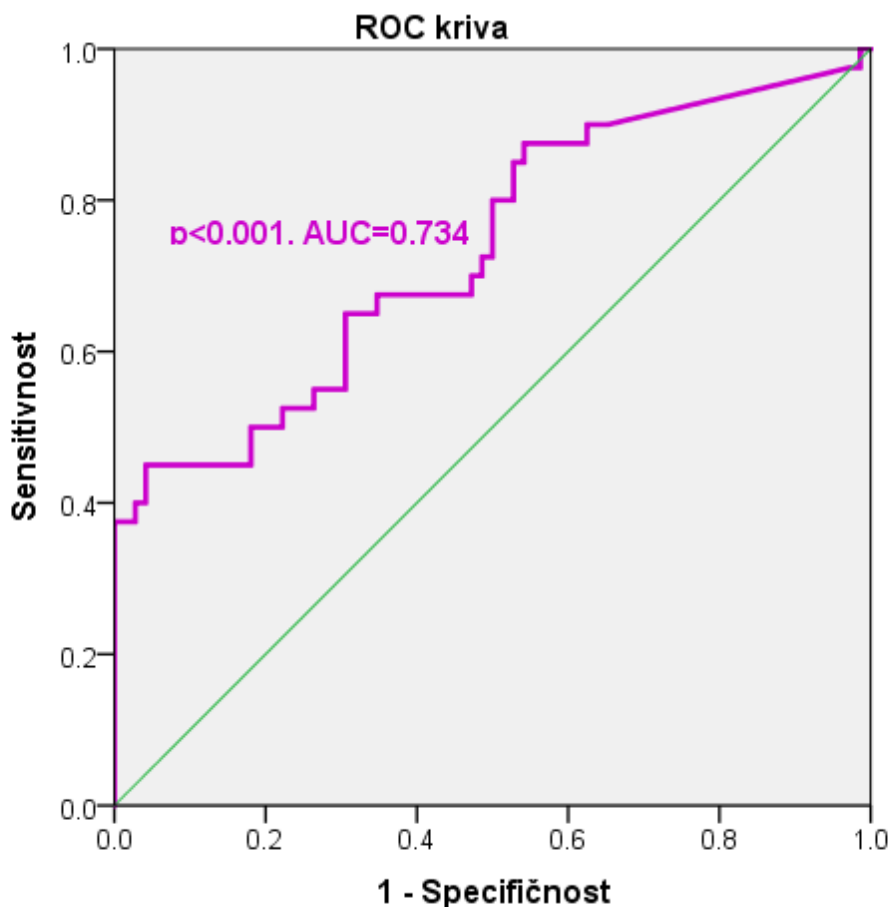
Test Result Variable(s): Resultati qHBs

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.734	.051	.000	.633	.835

The test result variable(s): Resultati qHBs has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5



Grafikon 6. Prikaz *cut off* vrednosti qHBsAg između aktivne i inaktivne forme hronične HBV infekcije

Još jedna potvrda povezanosti nivoa qHBsAg sa viremijom, dolazi iz podatka da je prosečna vrednost qHBsAg kod pacijenata koji imaju viremiju HBV DNK manju od 2.000 IU/ml iznosi 122,3 IU/ml (5–903,4 IU/ml), dok u grupi pacijenata sa viremijom HBV DNK preko 2.000 IU/ml srednja vrednost qHBsAg iznosi 2027,2 IU/ml (123,5–11.253,5 IU/ml). Man-Vitnijev U-test pokazuje da je razlika u nivou qHBsAg kod

pacijenata sa viremijom HBV DNK ispod 2.000 IU/ml statistički značajno niža u odnosu na grupu pacijenata kod kojih je viremija HBV DNK preko 2.000 UI/ml. Radi određivanja *cut off* vrednosti qHBsAg iznad koje bismo mogli očekivati da pacijent ima viremiju HBV DNK iznad 2.000 IU/ml, konstruisali smo ROC krivu. Sa senzitivnošću od 70% i specifičnošću od 70% vrednosti qHBsAg više od 700 IU/ml, ukazuju da bi se moglo raditi o pacijentu čija je očekivana viremija veća od 2.000 IU/ml.

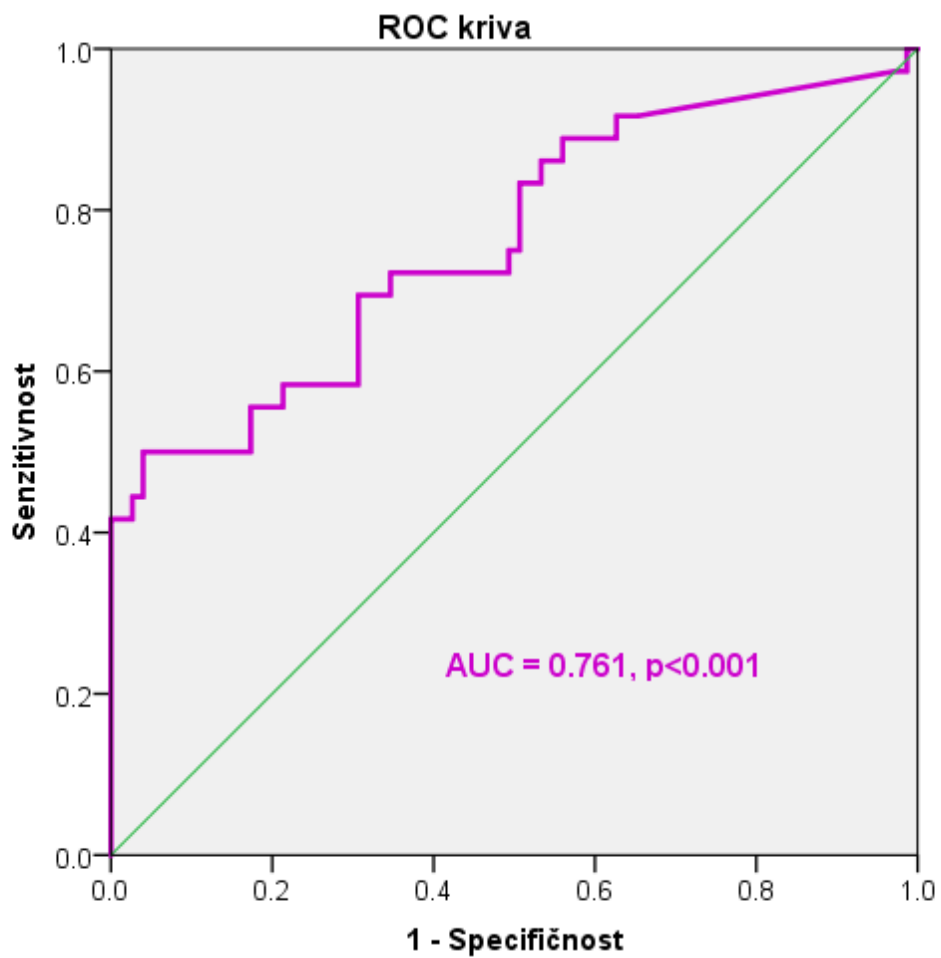
Area Under the Curve

Test Result Variable(s): Rezultati qHBs

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.761	.052	.000	.660	.863

The test result variable(s): Rezultati qHBs has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

- a. Under the nonparametric assumption
- b. Null hypothesis: true area = 0.5



Grafikon 7. ROC kriva koncentracije vrednosti qHBsAg kod pacijenata čije su vrednosti viremije HBV DNK > 2.000 IU/ml

5.2. Rezultati ispitivanja pacijenata koji su antivirusnoj terapiji NA

U drugoj grupi pacijenata koji su lečeni antivirusnom terapijom NA je takođe muški pol zastupljeniji 88/126 (69,8%) u odnosu na ženski pol 38/126 (30,2%), a prosečna starost je iznosila $52,71 \pm 15,66$ (raspon 18–83).

Prosečna dužina trajanja hronične HBV infekcije od momenta postavljanja dijagnoze do momenta uzimanja uzorka za ispitivanje iznosila je 5 (2–11,2) godina.

HBeAg pozitivnih je 26/126 (20,6%), a HBeAg negativnih je 100/126 (79,4%).

Najčešći pretpostavljeni način transmisije hronične HBV infekcije je kao i u grupi naivnih pacijenata bila vertikalna transmisija kod 19/126 (15,1%) pacijenata, potom seksualni put kod 14/126 (11,1%) pacijenata, podatak o operativnoj intervenciji je navelo 13/126 (10,3%) pacijenata, transfuziju krvi 13/126 (10,3%) pacijenata, najređi put prenosa je bio putem intravenske zloupotrebe narkotika kod 1/126 (0,8%) pacijenata. Nepoznati način transmisije je imalo 66/126 (52,4%) pacijenata.

U biohemijskim pokazateljima povišene vrednosti ALT (iznad GGN) imalo je 37 (29,4%) pacijenata, prosečna vrednost je iznosila 31 (19–49) i 25 (19,8%) pacijenata je imalo povišene vrednosti AST (iznad GGN), a posečna vrednost je iznosila 28 (22–38).

Prosečna vrednost qHBsAg iznosila je 1.256 (337–6.538), a viremije HBV DNK 37 (20–2.640).

Demografske karakteristike, pretpostavljeni način transmisije, dužina trajanja infekcije, biohemijski parametri, vrednosti qHBsAg i viremije HBV DNK druge grupe ispitanika prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. Demografske karakteristike i biohemijski parametri pacijenata na antivirusnoj terapiji NA

	Na antivirusnoj terapiji NA (n = 126)
Pol	
Muški	88 (69,8%)
Ženski	38 (30,2%)
Uzrast	52,71 ± 15,66
Dužina hronične HBV infekcije	5 (2–11,2)
HBeAg	
Pozitivni	26 (20,6%)
Negativni	100 (79,4%)
Način transmisije	
Transfuzija	13 (10,3%)
Seksualnim putem	14 (11,1%)
Operativne intervencije	13 (10,3%)
Vertikalna	19 (15,1%)
Intravenska zloupotreba narkotika	1 (0,8%)
Nepoznat	66 (52,4%)
AST	28 (22–38)
AST iznad GGN	25 (19,8%)
ALT	31 (19–49)
ALT iznad GGN	37 (29,4%)
qHBsAg	1256 (337–6538)
Viremija HBV DNK	37 (20-2640)

**Pacijenti koji su na antivirusnoj terapiji NA su u odnosu na korišćeni lek
podeljeni u dve podgrupe:**

1. Pacijenti lečeni lamivudinom (n = 75);
2. Pacijenti lečeni tenofovir disoproksil fumaratom (n = 51).

Upoređene su demografske i biohemijske karakteristike između ove dve grupe pacijenata i prikazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Demografske i biohemijske karakteristike pacijenata lečenih lamivudinom i tenofovir disoproksil fumaratom

	Lamivudin (n = 75)	Tenofovir disoproksil fumarat (n = 51)	P
Muški pol	51 (68,0%)	37 (72,5%)	0,693
Ženski pol	24 (32,0%)	14 (27,5%)	
Uzrast	53,17 ± 15,79	52,69 ± 15,55	0,866
Dužina terapije	2,0 (1,0–3,0)	1,0 (1,0–2,0)	0,045
HBeAg			
Pozitivni	17 (22,7%)	9 (17,6%)	0,654
Negativni	58 (77,3%)	42 (82,4%)	
AST	28,0 (21,2–41,2)	28,0 (23,0–37,0)	0,794
AST iznad GGN	16,0 (21,3%)	9,0 (17,6%)	0,656
ALT	30,0 (19,0–51,7)	34,0 (23,0–46,0)	0,472
ALT iznad GGN	23 (30,7%)	14 (27,5%)	0,842
qHBsAg	1256,0 (419,8–7163,0)	1030,0 (194,0–4150,0)	0,509
Viremija HBV DNK	69,8 (20,0–5902,5)	27,3 (20,0–604,5)	0,319

Rezultati korelacione analize vrednosti qHBsAg sa viremijom HBV DNK, aminotferazama, uzrastom i dužinom terapije u grupi pacijenata na antivirusnoj terapiji NA prikazani su u Tabeli 7.

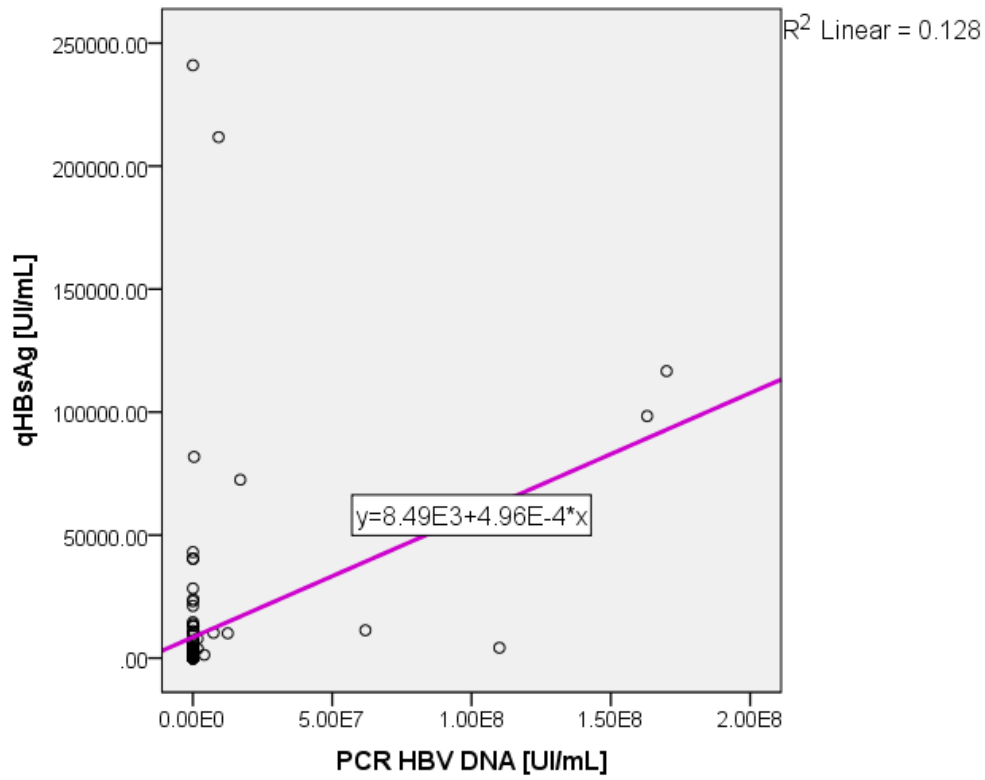
I u grupi pacijenata na antivirusnoj terapiji NA, kao i u grupi nelečenih pacijenata qHBsAg visoko statistički značajno pozitivno korelira sa viremijom HBV DNK i aminotferazama. Korelacija qHBsAg sa viremijom HBV DNK je umerenog intenziteta, dok se korelacija sa aminotferazama može okarakterisati kao korelacija slabog do umerenog intenziteta. U grupi pacijenata na antivirusnoj terapiji, gubi se povezanost qHBsAg i starosti pacijenata. Takođe, nije zabeležena korelacija qHBsAg sa dužinom primene antivirusne terapije.

S obzirom na dobijene rezultate da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima qHBsAg, aminotferaza i viremijom HBV DNK između dva antivirusna leka, korelaciona analiza rađena je na celokupnom uzorku pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji NA.

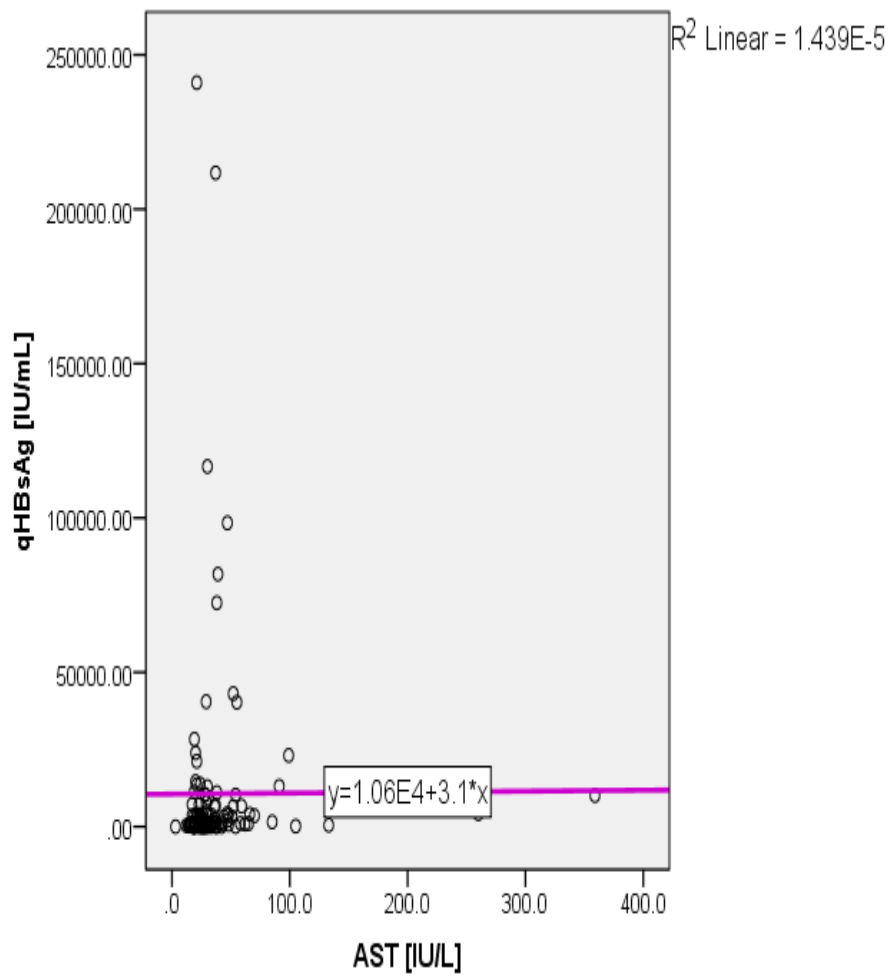
Tabela 7. Korelacione analize vrednosti qHBsAg sa viremijom HBV DNK, aminotransferazama, uzrastom i dužinom terapije u grupi pacijenata na antivirusnoj terapiji NA

			Uzrast	Dužina antivirusne terapije	qHBsAg	PCR HBV DNK	AST	ALT
Spearman's rho	Uzrast	Koeficijent ρ	1.000	.028	-.159	-.074	.071	-.115
		p	.	.762	.075	.414	.427	.199
		N	126	123	126	124	126	126
Dužina terapije	Koeficijent ρ Sig. (2- tailed)		.028	1.000	-.110	-.163	-.134	-.146
			.762	.	.228	.075	.141	.106
		N	123	123	123	121	123	123
qHBsAg	Koeficijent ρ Sig. (2- tailed)		-.159	-.110	1.000	.458**	.245**	.296**
			.075	.228	.	.000	.006	.001
		N	126	123	126	124	126	126
PCR HBV DNA	Koeficijent ρ Sig. (2- tailed)		-.074	-.163	.458**	1.000	.295**	.392**
			.414	.075	.000	.	.001	.000
		N	124	121	124	124	124	124
AST	Koeficijent ρ Sig. (2- tailed)		.071	-.134	.245**	.295**	1.000	.738**
			.427	.141	.006	.001	.	.000
		N	126	123	126	124	126	126
ALT	Koeficijent ρ Sig. (2- tailed)		-.115	-.146	.296**	.392**	.738**	1.000
			.199	.106	.001	.000	.000	.
		N	126	123	126	124	126	126

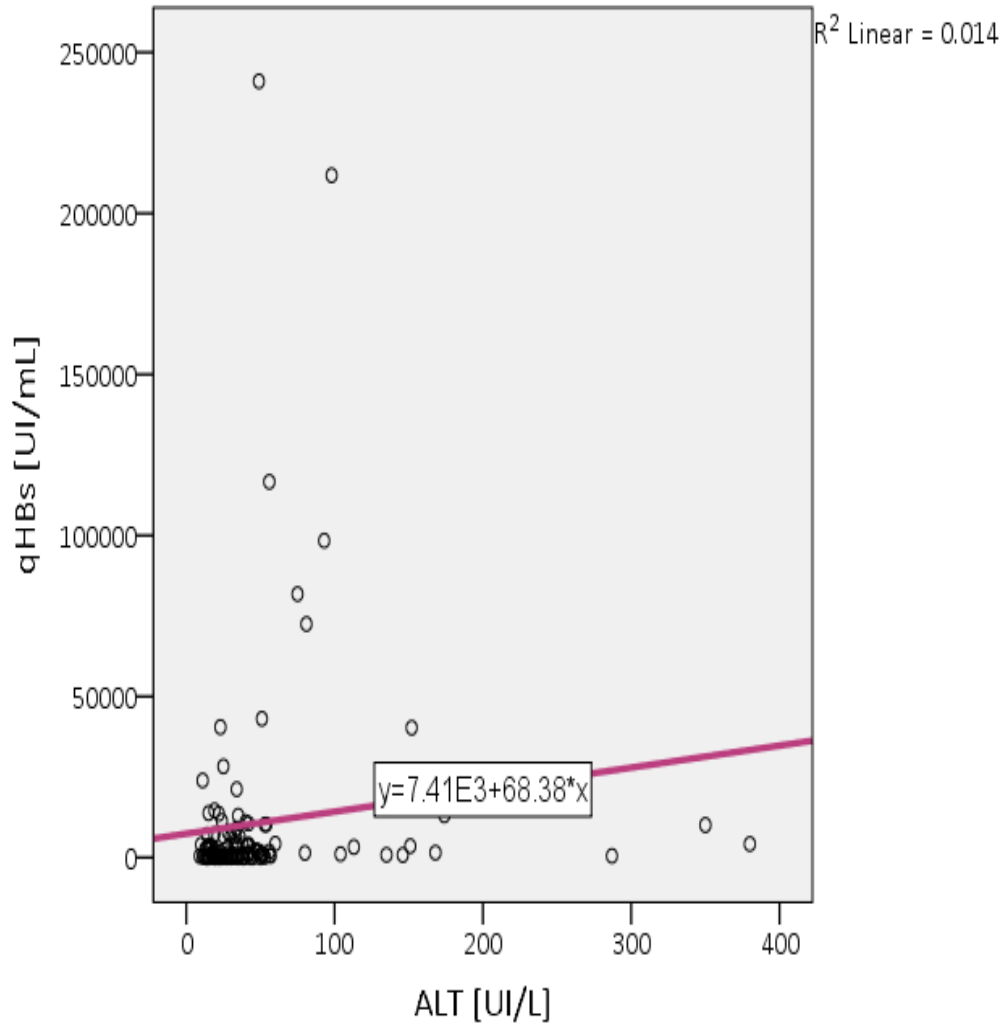
** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Grafikon 8. Korelacija qHBsAg i viremije HBV DNK kod pacijenata na antivirusnoj terapiji NA



Grafikon 9. Korelacija qHBsAg i AST kod pacijenata na antivirusnoj terapiji NA



Grafikon 10. Korelacija qHBsAg i ALT kod pacijenata na antivirusnoj terapiji

NA

Tabela 8. Prikaz demografskih karakteristika, biohemijskih pokazatelja, qHBsAg, viremije HBV DNK kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih pacijenata u toku antivirusne terapije NA

	HBeAg pozitivni (n = 26)	HBeAg negativni (n = 100)	
Uzrast	43,0 (32,5–70,0)	52,0 (44,0–62,0)	0,424
Dužina antivirusne terapije	1,0 (1,0–2,0)	2,0 (1,0–3,0)	0,113
ALT	43,0 (26,5–84,0)	33,0 (19,0–49,0)	0,304
AST	29,0 (21,5–44,5)	28,0 (22,0–37,0)	0,669
qHBsAg	1437,0 (437,2-61050,0)	1045,0 (297,5-6638,0)	0,304
Viremija HBV DNK	145,0 (20,0-27.395,0)	29,0 (20,0-4.410,0)	0,159

Iako su srednje vrednosti qHBsAg i viremije HBV DNK više u grupi HBeAg pozitivnih pacijenata nego u grupi HBeAg negativnih pacijenata, ova razlika nije dosegla statističku značajnost.

5.2.1. Rezultati ispitivanja nivoa qHBsAg i viremije HBV DNK kod pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji NA u vremenskom razmaku od godinu dana

Kod 49 pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji NA praćena je vrednost qHBsAg i viremije HBV DNK u vremenskom intervalu od godinu dana.

Lamivudinom je lećeno 26/49 (53,1%) pacijenata. Kod 16/26 (61,5%) pacijenata lećenih lamivudinom beleži se pad qHBsAg nakon godinu dana terapije, kod 9/26 (34,6%) beleži se porast, dok se kod 1/26 (3,85%) pacijenta nivo qHBsAg nije menjao ($p = 0,221$). Sa viremijom HBV DNK situacija je takva da je kod 12/26 (46,1%) pacijenta zabeležen pad, kod njih 13/26 (50%) nepromenjena vrednost, a kod 1/26 (3,85%) pacijenta je zapažen porast viremije. Vilkoksonov test ranga otkrio je statistićki znaćajan pad viremije za godinu dana, $z = -2,760$, $p = 0,006$. Medijana rezultata opala je od 396,5 do 26,20. Velićina uticaja terapije lamivudinom na pad viremije može se okarakterisati kao umerena (prema Koenovim kriterijumima). U pogledu qHBsAg nije dobijen statistićki znaćajan pad nivoa u prvom i drugom merenju.

Tabela 9. Prikaz vrednosti qHBsAg i viremije HBV DNK pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji lamivudinom u razmaku od godinu dana

	N	Percentiles			z	p	r
		25 th	50th (Median)	75 th			
PCR HBV DNK 1	26	20.0000	396.5000	43175.0000	-2,760	0,006	0,383
PCR HBV DNK 2	26	.0000	26.2000	2133.7500			
qHBsAg 1	26	563.6750	1343.8000	7830.5000	-1,224	0,221	
qHBsAg 2	26	257.0250	1058.5000	5305.0000			

Tenofovir disoproksil fumaratom lečeno je 23/49 (46,9%) pacijenta, kod 19/23 (82,6%) pacijenata lečenih beleži se značajan pad vrednosti qHBsAg, kod njih 4/23 (17,4%) beleži se porast, što se bliži statističkoj značajnosti ($p = 0,055$).

Vilkoksonov test ranga otkrio je statistički značajan pad viremije za godinu dana, $z = -1,956$, $p = 0,050$. Medijana rezultata opala je od 4120,5 do 20,00. Veličina uticaja terapije tenofovirom na pad viremije može se okarakterisati kao slaba do umerena (prema Koenovim kriterijumima).

U pogledu qHBsAg, zabeležen je pad vrednosti qHBsAg nakon godinu dana koji teži statističkoj značajnosti ($p = 0,055$). Medijana qHBsAg opala je sa 3538,0 na 1114,0.

Tabela 10. Prikaz qHBsAg i viremije HBV DNK pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji tenofovir disoproksil fumaratom

	N	Percentiles			z	p	R
		25 th	50th (Median)	75 th			
PCR HBV DNA	23	20.0000	4120.0000	889750.0000	-1,956	0,050	0,289
PCR_2	23	.0000	20.0000	1080.0000			
Rezultati qHBs	23	523.7000	3538.0000	13560.0000	-1,916	0,055	0,282
qHBS_2	23	280.4000	1114.0000	5904.0000			

6. Diskusija

Istraživanjem je obuhvaćeno 238 pacijenata Odseka hepatitisa i oboljenja hepatobilijarnog trakta, Klinike za infektivne bolesti, Kliničkog centra Vojvodine sa dijagnozom hronične HBV infekcije. Prosečna starost pacijenata je iznosila $50,62 \pm 15,55$ godina i muški pol (64,3%) dominantno je bio zastupljeniji u odnosu na ženski pol (35,7%), a slični podaci su dobijeni i u istraživanjima drugih autora (23, 96, 97, 98). Žene razvijaju snažniji imunodgovor na vakcinaciju, a i na HBV virusnu infekciju u odnosu na muškarce. U osnovi estrogene imaju imunostimulativni, a androgeni imunosuprimirajući efekat i mogu se ugraditi u jedro HBV genoma i aktivirati transkripciju onkoproteina HBV. Estrogeni štite hepatocite od inflamatornog oštećenja, oksidativnog stresa i apoptoze koji mogu dovesti do fibroze, maligne transformacije i nastanka HCC-a. Prema tome muškarci i žene mogu imati različitu prevalenciju, ishod i patogenetski mehanizam na HBV infekciju (99). Muškarci češće razvijaju hroničnu HBV infekciju, cirozu jetre i HCC u odnosu na žene, što može biti povezano sa protektivnim uticajem estrogena kod žena u sprečavanju razvoja hronične infekcije (100).

U našem istraživanju u obe grupe ispitanika većinu su činili HBeAg negativni pacijenti, 83,9% pacijenata u grupi naivnih i 79,4% u grupi lečenih pacijenata i bili su starijeg uzrasta, 52 godine, dok je HBeAg pozitivnih u grupi naivnih pacijenata bilo 16,1%, odnosno 20,6% u grupi lečenih pacijenata i bili su mlađeg uzrasta, 43 godine. Iako su HBeAg pacijenti bili starijeg uzrasta u odnosu na HBeAg negativne nije postignuta statistička značajnost ni u grupi lečenih ($p = 0,424$), niti u grupi naivnih pacijenata ($p = 0,358$). U studiji *Zoulim* i saradnika takođe su HBeAg negativni pacijenti bili stariji u odnosu na HBeAg pozitivne (47, odnosno 36 godina) (101).

Najčešći pretpostavljeni način transmisije hronične HBV infekcije u našem istraživanju u obe grupe je bila vertikalna transmisija kod 17% pacijenata u grupi naivnih, odnosno 15,1% u grupi lečenih pacijenata, potom seksualni put kod 13,4% u grupi naivnih, odnosno 11,1% u grupi lečenih, a podatak o operativnoj intervenciji je navelo 5,4% pacijenata u grupi naivnih, odnosno 10,3% u grupi lečenih, transfuziju krvi 7,1% pacijenata u grupi naivnih, odnosno 10,3% u grupi lečenih, a najređi put prenosa u obe grupe je bila intravenska zloupotreba narkotika kod 0,9%, odnosno 0,8% pacijenata. Nepoznati način transmisije imalo je 56,3%, odnosno 52,4% pacijenta.

U mnogim delovima sveta, endemičnim zemljama, posebno Kini, severoistočnoj Aziji, nerazvijenim zemljama vertikalna transmisija je glavni put prenosa (3, 17). Razlog visokog procenta vertikalne transmisije u našem istraživanju je verovatno posledica migracije stanovništva u Vojvodinu 90-ih godina iz Bosne i Hercegovine, Kosova i Metohije. Pre 2007. godine u Bosni i Hercegovini je prevalencija hepatitsa B u opštoj populaciji procenjena ekstrapolacijom prevalencije u susednim zemljama, te se smatralo da pripada regiji srednje endemičnosti. Međutim u studiji *Petrović i sar.* iz 2011. godine dobijeni su podaci da je prevalencija HBsAg među davaocima krvi 0,787%, a potom je procenjeno da je prevalencija HBsAg u opštoj populaciji Tuzlanskog kantona od 1,057 do 1,535% (102). Prevalencija hepatitsa B na Kosovu i Metohiji je značajno veća i iznosi 4,2% (103).

Među odraslima najčešći put transmisije je seksualni put. Pripadnici MSM populacije su grupa sa najvećim rizikom za HBV infekciju, što je povezano sa receptivnim analnim odnosom, dužinom seksualnog „staža” i velikim brojem seksualnih partnera. Rizik od HBV infekcije kod heteroseksualnih žena i muškaraca se povećava

takođe sa godinama seksualne aktivnosti, brojem seksualnih partnera i postojanjem drugih seksualno transmisivnih bolesti (104).

Prenos HBV infekcije preko zdravstvenih radnika je redak i uglavnom je povezan sa invazivnim procedurama koje su izvodili hirurzi, stomatolozi ili ginekolozi (104).

Transmisija putem transfuzija krvi skoro je u potpunosti eliminisana u većini zemalja skriningom donora na HBsAg, međutim i dalje je moguća transmisija putem neadekvatno sterilisanih igli, hirurških instrumenata, kontaminiranom okruženju i predmetima među pacijentima na hroničnom programu hemodijalize (104).

U mnogim studijama oko 30% inficiranih nema pozitivan epidemiološki rizik za HBV infekciju (3). U našem istraživanju preko 50% pacijenata nema jasan epidemiološki podatak. Razloge treba tražiti u neadekvatnom uzimanju epidemiološke ankete, ali i prikrivanju podataka o nezaštićenim seksualnim odnosima, pre svega u MSM populaciji. U poslednjoj dekadi akutni B hepatitis uglavnom se dijagnostikuje u MSM populaciji koja nije obuhvaćena vakcinacijom protiv hepatitisa B. Postoje pravne i socijalne prepreke u mobilizaciji MSM populacije za vakcinaciju protiv hepatitisa B, iako su preporučene od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) (105).

Dijagnoza hronične HBV infekcije postavljena je na osnovu prisutnog HBsAg u krvi duže od 6 meseci posle akutne faze bolesti (3, 7). Detekcija HBsAg je decenijama bila osnovni test za dijagnostiku HBV infekcije, koji je tek nedavno postao dodatni fokus interesovanja, kao komplementarni test za viremiju HBV DNK, kako u praćenju prirodnog toka hronične HBV infekcije, tako i u praćenju efekta antivirusne terapije (106). Iako merenje HBV DNK predstavlja zlatni standard za praćenje viremije to je i dalje skupa metoda i nije uvek dostupna, posebno u nerazvijenim zemljama, nasuprot

qHBsAg koji je značajno jeftinija tehnika (86). qHBsAg – označava kvantifikaciju HBsAg i poznat je unazad 20-ak godina, ali je tek poslednjih nekoliko godina dobio na značaju nakon poboljšanja testova (3). Nivo qHBsAg uglavnom predstavlja nivo slobodnih subvirusnih partikula i tokom vremena je mnogo stabilniji nego viremija HBV DNK i sa mnogo manjim smanjenjem vrednosti u toku infekcije (106). Važno pitanje je povezanost qHBsAg sa cccDNK koja je mini-hromozom i predstavlja glavno mesto održavanja hronične HBV infekcije. Uzrokovanje cccDNK iz jetrenog tkiva je veoma invazivna procedura, a qHBsAg je predložen kao surogat marker za cccDNK (86).

Prve kliničke studije imale su za cilj da utvrde postojanje veze između qHBsAg i viremije HBV DNK. Deguchi (*Deguchi*) i saradnici su 2004. godine dobili rezultate da je nivo qHBsAg značajno viši kod HBeAg pozitivnih, nego kod HBeAg negativnih pacijenata, kao i da nivo qHBsAg značajno korelira sa viremijom HBV DNK ($r = 0,862$) (87). Čen (*Chan*) i saradnici su takođe 2004. godine u studiji koja je obuhvatila 67 pacijenata dobili podatke da qHBsAg korelira sa viremijom HBV DNK ($r = 0,709$; $P < 0,001$) i da je qHBsAg viši kod HBeAg pozitivnih pacijenata sa višom viremijom HBV DNK, a niži kod pacijenata sa nižom viremijom HBV DNK (106).

U našem istraživanju su dobijeni podaci da je koncentracija qHBsAg značajno viša kod HBeAg pozitivnih, nego kod HBeAg negativnih pacijenata i postignuta je statistička značajnost ($p = 0,032$). Isto tako viremija HBV DNK pokazuje statistički značajnu višu vrednost kod HBeAg pozitivnih, u odnosu na HBeAg negativne pacijente ($p < 0,01$), a slični rezultati su dobijeni i u radu Zulima (*Zoulim*) i saradnika (101).

Takođe i koncentracije ALT-a i AST-a pokazuju statistički značajno više vrednosti u grupi HBeAg pozitivnih, nego u grupi HBeAg negativnih pacijenata ($p < 0,01$).

Na našem uzorku rezultati pokazuju da u grupi naivnih pacijenata qHBsAg statistički značajno pozitivno korelira sa viremijom HBV DNK, korelacijom visokog intenziteta. Statistički značajna pozitivna korelacija qHBsAg zabeležena je i sa nivoom ALT-a, ali je ona slabog do umerenog intenziteta. Nije zabeležena statistički značajna korelacija nivoa qHBsAg sa nivoom AST-a. Pored ovoga, pokazana je i statistički značajna negativna korelacija qHBsAg sa uzrastom pacijenta, kao i sa dužinom hronične HBV infekcije. Zabeležena korelacija sa uzrastom je umerenog, dok je korelacija sa dužinom hronične HBV infekcije slabog intenziteta. Dobijeni rezultati ukazuju na to da u prirodnom toku infekcije nivo qHBsAg opada sa uzrastom pacijenta i dužinom trajanja hronične HBV infekcije. U istraživanju Togo (*Togo*) i saradnika muški pol (239) je bio zastupljeniji u odnosu na ženski pol (185), kao i u našoj studiji i qHBsAg je pozitivno korelirao sa viremijom HBV DNK ($r = 0,586$, $P < 0,001$) i pokazao je slabu obrnutu korelaciju sa uzrastom ($r = 0,3325$, $P < 0,001$) (107). U studiji Zua i Zenga (*Zhu, Zhang*), kao i u studiji Jaroševića (*Jaroszewicz*) i saradnika su takođe dobijeni podaci o pozitivnoj korelaciji nivoa qHBsAg i viremije HBV DNK ($r = 0,657$, $p < 0,05$ i $r = 0,79$, $P < 0,01$) (108, 109). U pojedinim studijama su dobijeni drugačiji rezultati. U istraživanju Ganjija (*Ganji*) i saradnika nije nađena statistički značajna korelacija između nivoa qHBsAg i viremije HBV DNK ($r = 0,53$; $P = 0,606$) (110), kao ni u studiji Mahdavija (*Mahdavi*) i saradnika ($r = 0,231$, $P = 0,656$) (111). Interesantno je da u globalnoj populaciji HBeAg qHBsAg snažno korelira sa viremijom HBV DNK, jedino je korelacija slaba kod HBeAg

negativnih pacijenata. Nivoi HBsAg su generalno u korelaciji sa viremijom, međutim u niskim replikativnim stanjima, kao kod inaktivne HBV infekcije ostaju veći od serumske HBV DNK, verovatno odražavajući sekreciju HBsAg iz integrisane HBV DNK. Moguće da je razlog i zbog smanjene imunološke kontrole domaćina tokom proizvodnje HBsAg nasuprot virusnoj replikaciji. Nivo qHBsAg daje dodatne informacije o obimu zahvaćenih hepatocita, kao i imunokontroli pacijenta nad bolešću. Optimalnu supresiju virusa predstavlja gubitak HBsAg, a niži nivoi qHBsAg, kao i veća stopa pada tokom bolesti predviđaju ovaj ishod. (112).

Značajnu ulogu qHBsAg ima u kliničkoj praksi kod HBeAg negativnih pacijenata u cilju definisanja inaktivnog nosioca (3). Prvi su to istražili Bruneto (*Brunetto*) i saradnici i ukazali da nivo qHBsAg <1.000 IU/ml i PCR HBV DNK ispod 2.000 IU/ml, uz normalne vrednosti ALT može da okarakterise inaktivnu formu bolesti (89).

U našem istraživanju aktivna hronična HBV infekcija zabeležena je kod 37,5% pacijenata prosečne starosti 44 godine, dok je inaktivna forma bolesti zabeležena kod 62,5% pacijenata prosečne starosti 52 godine. Man-Vitnjev test pokazuje da ima statistički značajne razlike u uzrastu pacijenata sa aktivnom i inaktivnom formom hronične HBV infekcije. Pacijenti sa aktivnom formom hronične HBV infekcije su statistički značajano mlađi, nego pacijenti sa inaktivnom formom bolesti ($P = 0,023$). U istraživanju koji su sproveli Gunal (*Güenal*) i saradnici dobili su rezultate da je prosečna starost pacijenata u grupi sa aktivnom formom bolesti bila $41,90 \pm 16,06$, a u grupi inaktivnih nosilaca HBsAg je prosečna starost bila $44,35 \pm 13,41$ i nije postignuta statistička značajnost, kao ni u vrednosti ALT-a. Dobili su podatak da je nivo qHBsAg statistički značajno viši kod pacijenata sa aktivnom formom bolesti, kao što smo dobili i

mi na našem uzorku ($p = 0,00$) (6). U istraživanju sprovedenom na Tajlandu, Ungtrakul (*Ungtrakul*) i saradnici su dobili rezultate da je nivo HBV DNK statistički niži u grupi pacijenata sa inaktivnom formom bolesti, što je potvrđeno i u našem istraživanju ($p = 0,00$). Nisu dobili statističku značajnost u uzrastu, polu, niti u koncentraciji ALT-a (88). U istraživanju sprovedenom na Tajvanu dobijeni su rezultati u kome je muški pol dominantno bio zastupljeniji u odnosu na ženski pol i postignuta je statistička značajnost ($p = 0,003$) i imali su aktivniju formu bolesti. Takođe su vrednosti viremije HBV DNK i qHBsAg bile više u grupi pacijenata sa aktivnom formom bolesti (113).

HBeAg negativni HHB označava HBsAg pozitivnost, prisutnost anti-HBe antitela, detektibilnu viremiju HBV DNK, fluktuirajuću aktivnost aminotferaza i izraženu nekroinflamatornu aktivnost u histološkom nalazu jetre. Predominantni je oblik u grupi pacijenata sa hroničnom HBV infekcijom, pre svega zbog starenja populacije inficirane HBV, kao i zbog kasnog otkrivanja (3, 81). Iziskuje posebnu pažnju zbog *pre-core* mutacija koje su povezane sa bržom progresijom bolesti i lošijim terapijskim odgovorom. Ponekad je vrlo teško razlikovati aktivnu hroničnu HBV infekciju od inaktivne upravo zbog toga što se HBeAg negativni HHB karakteriše fluktuacijom aminotferaza i viremijom HBV DNK koja može da bude ispod 2.000 IU/ml i spontanom normalizacijom ALT za nekoliko nedelja ili meseci. Zato je za diferencijalnu dijagnozu aktivne i inaktivne forme bolesti neophodno u toku jedne godine više puta kontrolisati nivo viremije i ALT-a (114).

Kao što je već rečeno nivo qHBsAg korelira sa intrahepatičnom cccDNK i ova otkrića su doprinela tome da qHBsAg može pomoći da se kod HBeAg negativnih pacijenata definiše faza hronične HBV infekcije. Istraživanje Bruneta (*Brunetto*) i

saradnika 2010. godine sprovedeno je na 209 pacijenata HBeAg-/anti-HBe+ hronično inficiranih HBV sa genotipom D i dobijeni su rezultati slični kao i na našem uzorku, a to je da nivo qHBsAg i viremija HBV DNK niža kod inaktivne forme bolesti, nivo qHBsAg korelira sa viremijom HBV DNK, ALT i uzrastom, ali ne i sa polom. Kod njih je takođe nađeno da stariji pacijenti imaju niže vrednosti qHBsAg, viremiju DNK i češće imaju inaktivnu formu bolesti (81).

Nivo qHBsAg može opadati sa prelaskom bolesti u HBeAg negativni HHB ili inaktivnu formu, ali u slučaju reaktivacije bolesti dolazi do njegovog ponovnog porasta (112).

U našem istraživanju načinjena je ROC kriva radi određivanja *cut off* vrednosti qHBsAg na osnovu koje bi se moglo pretpostaviti da li se radi o aktivnoj ili inaktivnoj formi bolesti kod nelečenih pacijenata. Dobijeni su podaci da površina ispod ROC krive (AUC) iznosi 0,734, što analizu čini statistički značajnom na nivou $p < 0,001$. Vrednosti qHBsAg iznad 800 IU/ml, sa senzitivnošću od 60% i specifičnošću od 70% ukazuju na to da bi se moglo raditi o aktivnoj hroničnoj HBV infekciji. Povećanje specifičnosti analize na 90%, mogli bismo da kažemo da pacijenti sa vrednostima qHBsAg preko 2.000 IU/ml sa 90% sigurnosti imaju aktivnu formu bolesti. Vrednosti qHBsAg više od 700 IU/ml, ukazuju da bi se moglo raditi o pacijentu čija je očekivana viremija veća od 2.000 IU/ml sa senzitivnošću od 70% i specifičnošću od 70% i površinom ispod ROC krive (AUC) koja iznosi 0,761.

U istraživanju koje su sproveli Ungtrakul i saradnici su dobili da za vrednosti qHBsAg < 1.000 IU/ml i viremiju HBV DNK < 2000 IU/ml sa senzitivnošću od 41% i specifičnošću 72% i površinom ispod ROC krive (AUC) 0,6 može okarakterisati

inaktivnu formu bolesti (88). U istraživanju Gunala i saradnika je površina ispod ROC krive iznosila 0,738, sa cut off vrednosti qHBsAg 2147 IU/ml i senzitivnošću 76% i specifičnošću 70% za dijagnostiku inaktivnog nosilaštva kod HBeAg negativne HBV infekcije (6). Na uzorku Bruneta i saradnika površina ispod ROC krive je iznosila 0,94 sa cut off vrednosti 844,5 IU/ml sa senzitivnošću 88,2% i specifičnosti 89,3% (81). Njihova vrednost ROC krive je veća u odnosu na našu verovatno iz razloga različite strukture pacijenata, kod njih su obuhvaćeni HBeAg-/anti HBe+ pacijenti i genotip D, dok su kod nas obuhvaćeni i HBeAg pozitivni i HBeAg negativni pacijenti, a genotipizacija nije rađena.

Takođe qHBsAg ima važnu ulogu i u praćenju antivirusnog odgovora kod HBeAg pozitivnih i HBeAg negativnih pacijenata u toku terapije pegilovanim interferonom (89). Prva istraživanja 1987. godine koja su ukazivala na značajnost kvantifikacije HBsAg u serumu su u vezi sa *Grazu Š.* i saradnicima koji su određivali koncentraciju HBsAg radioimunoesej metodom (RIA) u toku terapije sa humanim leukocitarnim interferonom (3). U daljim istraživanjima Marselin (*Marcellin*) i saradnici ukazuju da redukcija koncentracije qHBsAg za $\geq 10\%$ u 12. nedelji lečenja pegilovanim interferonom $\alpha 2a$ rani znak pozitivnog terapijskog efekta. Na kraju lečenja će 47% pacijenata imati HBV DNK < 10.000 kopija/ml, a sa redukcijom HBsAg za $\leq 10\%$ će samo 16% pacijenata to ostvariti (115). Mukari (*Moucari*) i saradnici su dobili podatke kod HBeAg negativnih pacijenata da će 90% lečenih pacijenata u 12. nedelji lečenja postići terapijski uspeh ako dođe do pada qHBsAg $\geq 0,5$ log IU/ml (116). Pad nivoa qHBsAg < 1500 IU/ml u 12. nedelji lečenja kod HBeAg pozitivnih pacijenata je za HBeAg serokonverziju pozitivni prediktivni faktor (3).

U istraživanju Milošević i sar. uključena su bila 162 pacijenta obolela od hronične HBV infekcije koji su lečeni u periodu od 2000. do 2012. godine u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog centra Srbije i dobijeni su rezultati da je dominantan genotip na našem području genotip D (23). Određeni genotipovi HBV, kao što su genotip A i B su povezani sa boljim terapijskim efektom, nego genotip C i D. Kod genotipa B i C ukoliko je nivo qHBsAg u 12 nedelji lečenja veći od 20.000 IU/ml, a kod genotipa A i D uopšte ne pada do HBeAg serokonverzije verovatno neće doći. Terapiju treba obustaviti bez obzira na genotip ukoliko je nivo qHBsAg > 20.000 IU/ml u 24. nedelji lečenja. Kod pacijenata koji su HBeAg negativni i inficirani genotipom D interferonsku terapiju treba prekinuti u 12. nedelji lečenja ukoliko nije došlo do pada viremije za 100 puta i pada nivoa qHBsAg (3).

Gubitak HBsAg je glavni cilj lečenja hronične HBV infekcije, ali isto tako je bitno i vreme kada se postigne, najbolje je pre razvoja ciroze jetre i njenih komplikacija, kao što su dekompenzacija ciroze i nastanak HCC-a. Pacijenti koji postignu HBsAg negativizaciju imaju mnogo bolju prognozu, manji rizik od razvoja ciroze jetre, HCC-a i može doći do regresije fibroze. HBsAg je jedan od subviralnih produkata replikacije cccDNK, pa transkripcionu aktivnost cccDNK odražava nivo HBsAg. Eliminacija cccDNK je glavni izazov savremene antivirusne terapije (117). Spontani gubitak HBsAg se dešava veoma retko, čak i kod HBeAg negativnih pacijenata i iznosi svega 1-2% na godišnjem nivou (75). U Azijskim zemljama iznosi 0,12–2,38%, a u zapadnim zemljama 0,54–1,98%. Kumulativna HBsAg negativizacija raste do 8,1% na desetogodišnjem nivou, 24,9% na dvadestogodišnjem nivou i do 44,7% nakon 25 godina (117). Faktori kao što su starija dob, HBeAg negativnost, ciroza jetre ili masna jetra, normalna vrednost

ALT, nedektibilna viremija HBV DNK, *adr* HBsAg serotip, genotipovi A i B ili pacijenti koji imaju akutnu virusnu superinfekciju imaju veću šansu za HBsAg negativizaciju (117, 118). Genotip A ima najveći nivo qHBsAg, za njim slede genotipovi B i C, a najniži nivo je kod genotipa D (117, 119). Nivo qHBsAg varira tokom prirodnog toka hronične HBV infekcije i može da pomogne da se odredi tačna faza ove hronične infekcije. Najviši je nivo u imunotolerantnoj fazi ($4,5-5 \log_{10}$ IU/ml), opada u imunoeliminacionoj ($3-4,5 \log_{10}$ IU/ml) i nastavlja da opada progresivno i sporo nakon anti-HBe serokonverzije. HBeAg pozitivni pacijenti koji su lečeni klasičnom interferonskom terapijom imaju tri puta veću šansu za HBsAg negativizaciju u zapadnim zemljama i do šest puta u azijskim zemljama u poređenju sa nelečenim pacijentima. Anti-HBe serokonverzija se postiže u 20–40% slučajeva, u 10–15% se javlja kasna anti-HBe serokonverzija godinu-dve nakon lečenja. Kod HBeAg negativnih SVR je postignut kod 22–30% (117). Kod HBeAg pozitivnih pacijenata koji su lečeni pegilovanim interferonom gubitak HBsAg je postignut kod 3–7% u dugogodišnjem periodu praćenja. Pad nivoa qHBsAg u 12. i 24. nedelji lečenja može biti prediktor za SVR. Nizak novo qHBsAg ili brži pad nivoa tokom lečenja je povezan sa većom mogućnošću anti-HBe serokonverzije i supresijom HBV DNK šest meseci nakon lečenja. U istraživanju Čena i saradnika 2011. godine dobijeni su podaci da pacijenti koji imaju pad nivoa qHBsAg $> 1 \log_{10}$ i nivo ≤ 300 IU/ml u 24. nedelji terapije postižu SVR u 75% slučajeva u poređenju sa 15% kod pacijenata koji nisu ovo ostvarili (119). U velikoj studiji Gane i saradnika nađeno je da pacijenti koji imaju qHBsAg veći od 20.000 IU/ml u 12. i 24. nedelji neće postići adekvatan post-terapijski odgovor i kod njih treba prekinuti lečenje. Pacijenti sa qHBsAg < 1.500 IU/ml u 12. nedelji lečenja postižu HBsAg negativizaciju 17,6% šest meseci posle terapije

(120). Kod HBeAg negativnih pacijenata lečenih pegilovanim interferonom gubitak HBsAg iznosi 10% na godišnjem nivou. U dugogodišnjoj studiji gubitak HBsAg je postignut kod 44% pacijenata koji su imali nedektibilnu viremiju tri godine nakon lečenja. Nivo qHBsAg < 10 IU/ml u 48. nedelji lečenja je povezan sa gubitkom HBsAg tri godine nakon lečenja (121).

Sprovedena su i istraživanja da qHBsAg može da bude značajan prediktor HBsAg gubitka u toku antivirusne terapije NA (75). Gubitak HBsAg u toku lečenja NA je veoma nizak iako oni imaju veliki uticaj na supresiju virusne replikacije, ali nakon prekida terapije postoji veliki rizik od relapsa HBV infekcije (117). Razlog tome je što NA blokiraju reverznu transkriptazu i inhibišu HBV DNK, a nemaju uticaj na samu cccDNK, niti na produkciju HBsAg. Kada sintezu intrahepatičnih HBV DNK intermedijara suprimiraju NA, HBV može i dalje da nadoknadi cccDNK, transportujući virusni genom unutar kapsida nazad u jezgro hepatocita umesto da bude omotano i oslobođeno u perifernu krv (122).

Smanjenje nivoa qHBsAg je izraženo u toku prve godine lečenja telbivudinom ili TDF, nakon čega se značajno ne menja, a za HBeAg negativne pacijente nivo qHBsAg značajno ne varira. Tačan mehanizam redukcije qHBsAg u toku antivirusne terapije NA se ne zna, ali se pretpostavlja da pokazuje bolji stepen imunokontrole domaćina protiv virusa ili smanjenje količine cccDNK. Pegilovani interferon indukuje apoptozu ili nekrozu HBV inficiranih hepatocita, te iz tog razloga dovodi do izraženijeg pada nivoa qHBsAg nego NA. Rano smanjenje qHBsAg u toku terapije NA može biti povezano sa restauracijom imunodgovora domaćina protiv HBV kao odraz nivoa ALT pre terapije.

Kada se smanji imunoodgovor, što se dešava tokom druge i treće godine antivirusne terapije i smanjenje nivoa qHBsAg biva manje (82).

NA se uzimaju oralno, dobro se podnose i nemaju značajnije neželjene efekte prilikom dugotrajne upotrebe. Tenofovir i entakavir su lekovi sa visokom genetskom barijerom i najčešće su upotrebljavani lekovi. Pacijenti postižu nedektibilnu viremiju tokom višegodišnjeg lečenja, čak i oni sa visokom viremijom HBV DNK. Mogu se primeniti u svim stadijumima bolesti, uključujući dekompenzovanu jetrenu bolest. Mogu da poboljšaju fibrozu jetre i dovedu do regresije ciroze i karcinogeneze (1, 3, 23).

Lamivudin je antivirusni lek koji je otkriven 90-ih godina i bio je prvi lek koji je redukovao dekompenzaciju ciroze jetre i pojavu HCC-a. Danas se više ne preporučuje kao lek prvog izbora zbog velike rezistencije na njega. Istraživanjem molekularnih mehanizama otkriveno je da su, zavisno od šećernog ostatka, rezistencije specifične za pojedine NA. L-nukleozidi (lamivudin i telbivudin) imaju slično ciljno mesto delovanja, molekulsku strukturu i obrazac razvoja rezistentnih mutanata. Mutacije koje rezultiraju zamenom metionina u motivu katalitičkog mesta tirozin-metionin-aspartat (IMDD) sa valinom ili izoleucinom daju rezistenciju na lamivudin. Ove promene su označene kao (rtM204V/I) i sama ova mutacija je dovoljna za razvoj rezistencije, ali je češće udružena sa kompenzatornim mutacijama rtL80V/I, rtI169T, rtV173L, rtL180M, rt184S/G, rtS202I i rtQ215S. Ove kompenzatorne promene obično dovode do pojačane replikacije virusa, ali nemaju direktan uticaj na rezistenciju antivirusnih lekova (123).

Gubitak HBsAg je veoma nizak u toku terapije lamivudinom, iznosi 0–1% na godišnjem nivou kod HBeAg pozitivnih i 0% kod HBeAg negativnih pacijenata, a anti-HBe serokonverzija iznosi 16–18%. Tokom devet godina lečenja gubitak HBsAg raste

do 7%, a anti-HBe serokonverzija na 95% (124). Gubitak HBeAg raste progresivno sa dužinom lečenja (111). Seto (*Setto*) i saradnici su došli do rezultata da je 10% pacijenata koji su lečeni lamivudinom postiglo HBsAg negativizaciju u periodu praćenja, a da je smanjenje nivoa qHBsAg slično i kod HBeAg pozitivnih i kod HBeAg negativnih pacijenata i iznosi $-0,104 \log \text{ IU/mL/godišnje}$. Kod lečenih entekavirom su dobijeni slični rezultati, sem što je zapažen veći pad qHBsAg kod HBeAg pozitivnih pacijenata (75).

Kod lečenih TDF tokom pet godina gubitak HBsAg iznosi oko 10% kod HBeAg pozitivnih pacijenata, nije zapažen gubitak HBsAg nakon dve godine lečenja ni kod ETV ni kod TDF (125).

Dužina lečenja NA i dalje predstavlja najveći problem u svakodnevnoj kliničkoj praksi, kod pojedinih pacijenata koji imaju nisku mogućnost relapsa je moguće obustaviti terapiju. Kod HBeAg pozitivnih pacijenata ukoliko postignu anti-HBe serokonverziju i nedektabilnu viremiju u trajanju od godinu dana može se prekinuti terapija, dok se za HBeAg negativne pacijente to ne preporučuje (117). Studija koju su sproveli Čen i saradnici 2017. godine je pokazala da qHBsAg može da bude i pokazatelj prekida terapije NA. Izabrani su pacijenti sa niskim rizikom od mogućnosti relapsa nakon prekida antivirusne terapije i pacijenti koji nisu imali cirozu jetru i dobili su rezultate u petogodišnjem praćenju da je gubitak HBsAg iznosio 47,3% kod HBeAg pozitivnih pacijenata koji su na kraju terapije imali qHBsAg $< 300 \text{ IU/mL}$, a u osmogodišnjem praćenju kod HBeAg negativnih 69,3% sa qHBsAg $< 200 \text{ IU/mL}$ na kraju terapije (75). Pacijenti kod kojih je prekinuta terapija NA, a qHBsAg je bio manji od 100 IU/ml imali su veću šansu za SVR u odnosu na pacijente sa qHBsAg $> 1.000 \text{ IU/ml}$ kod kojih je 70%

došlo do relapsa u toku jednogodišnjeg praćenja. Istraživanje sprovedeno među azijskom populacijom je pokazalo da je gubitak HBsAg između 21,1–58,8% sa qHBsAg < 100 IU/ml u odnosu na 3,3–7,4% sa qHBsAg > 100 IU/ml (125). Neke studije su pokazale da pacijenti koji su HBeAg negativni i koji su 2-3 godine na antivirusnoj terapiji NA i kod kojih je postignuta virusna supresija, da po prekidanju terapije imaju veću stopu HBsAg negativizacije nego pacijenti koji su nastavili sa terapijom. Tačan razlog za to još uvek nije poznat. Pretpostavlja se da dolazi do relapsa virusne infekcije nakon dugotrajne supresije izazivajući buran imunoodgovor na HBV, imitirajući akutnu infekciju nakon čega može doći do gubitka HBsAg. Zapažena je veća stopa HBsAg negativizacije kod pacijenata kod kojih nije vraćena antivirusna terapija po relapsu HBV infekcije u odnosu na one kod kojih je ponovo uključena, ukazujući na to da će se postići gubitak HBsAg ukoliko se nastavi imunoeliminaciona faza i ako ne bude prerano prekinuta. Međutim dugotrajna imunološka liza inficiranih hepatocita može dovesti može dovesti do jetrene insuficijencije (126, 127).

Antivirusna terapija interferonom i NA smanjuje rizik od razvoja ciroze, dekompenzacije ciroze i njenih komplikacija, HCC-a i smanjuje smrtnost (126). Hronična inflamacija i nekroza su ključni faktori koji predisponiraju razvoj HCC-a. Visoka viremija HBV DNK, HBeAg pozitivnost, ciroza jetre, genotip C, povišeni nivoi HBsAg u serumu koreliraju sa razvojem HCC. Pacijente sa hroničnom HBV infekcijom treba lečiti sa pegilovanim interferonom pre svega zbog njegovih imunomodulatornih, antifibrotičkih i antionkogenih efekata bez obzira na njegov antivirusni efekat. Približno 30% pacijenata i nakon efikasnog lečenja imaju detektibilne nivoe HBsAg iako je HBV RNK negativna, te i dalje postoji rizik od razvoja HCC-a. Kod pacijenata kod kojih je kontraindikovana

primena pegilovanog interferona, potrebno je koristiti NA sa visokom genetskom barijerom. NA sprečavaju dalje napredovanje bolesti jetre u cirozu, povećavaju šansu pacijenta za efikasnim lečenjem čak i ukoliko se razvije HCC zbog bolje funkcije jetre. Ukoliko se dijagnostikuje HCC lečenje NA treba nastaviti doživotno (128). Dugotrajna virusna supresija TDF, duža od pet godina trajno suzbija virus, značajno smanjujući fibrozu i cirozu kod 96% pacijenata (126). Nivoi HBsAg su povezani sa rizikom od hepatokarcinogeneze, kao i viremija HBV DNK kod nelečenih pacijenata sa HHB. Sve više se qHBsAg prepoznaje kao marker kojim se procenjuje infekcija domaćina i imunokontrola HBV replikacije. Na nižu aktivnost hepatitisa i veliku verovatnoću klirensa HBV ukazuju niski nivoi qHBsAg kod genotipa B i C. U studiji Kavanake (*Kawanaka*) i sar. iz 2014. godine koja je sprovedena na 167 pacijenata koji su lečeni NA duže od dve godine ispitivana je korisnost qHBsAg i viremije HBV DNK, kao prediktore razvoja HCC-a i dobijeni su rezultati da je uočena hepatokarcinogeneza kod pacijenata sa visokim nivoom qHBsAg, iako je viremija HBV DNK bila negativna pod antivirusnom terapijom NA (129).

U ostalom delu našeg istraživanja ispitivali smo ulogu qHBsAg u toku antivirusne terapije NA. Lamivudinom je lečeno 75 pacijenata, a TDF 51 pacijent. Upoređene su demografske i biohemijske karakteristike između ove dve grupe pacijenata i nije nađena statistička značajnost u vrednostima qHBsAg, aminotferaza, viremije HBV DNK između dva antivirusna leka. Dobijeni su podaci da qHBsAg visoko statistički značajno pozitivno korelira sa viremijom HBV DNK i aminotferazama. Korelacija qHBsAg sa viremijom je umerenog intenziteta, dok se korelacija sa aminotferazama može okarakterisati kao korelacija slabog do umerenog intenziteta. Sniženje nivoa qHBsAg u

toku antivirusne terapije NA je sporije i manje značajno u odnosu na pegilovani interferon. Isto tako HBeAg pozitivni pacijenti imaju veću redukciju qHBsAg nego HBeAg negativni pacijenti (82). U studiji Hitkota (*Heathcote*) i saradnika dobijeni su podaci da kod HBeAg pozitivnih pacijenata gubitak HBeAg je imalo njih 34% u toku terapije TDF, a 26% je postiglo anti-HBe serokonverziju. Gubitak HBsAg je procenjen na 8% tokom trogodišnje terapije TDF. Pacijenti koji su izgubili HBsAg u 144. nedelji imali su značajno viši početni nivo qHBsAg nego oni koji ga nisu izgubili. HBeAg negativni pacijenti su imali pet puta niže početne vrednosti qHBsAg nego HBeAg pozitivni pacijenti i manji pad qHBsAg u 144. nedelji. Pacijenti koji su postigli HBsAg negativizaciju imali su više početne nivoe viremije HBV DNK, qHBsAg, viši stepen nekroinflamatorne aktivnosti u histološkom nalazu jetre, zastupljeniji genotipovi A, D i F (130). U trogodišnjem periodu praćenja u istraživanju Vurstorna (*Wursthorn*) i saradnika na 162 HBeAg pozitivna pacijenta, lečena lamivudinom, dobijeni su rezultati da su nakon dve godine terapije svi pacijenti imali HBV DNK ≤ 60 IU/ml, njih 6% je izgubilo HBsAg. Gubitak HBsAg može da se predvidi ukoliko nakon godinu dana terapije dođe do smanjenja nivoa qHBsAg >1 log (131). U toku perioda praćenja pod terapijom TDF dobijeni su slični podaci. HBeAg negativni pacijenti koji su lečeni ETV I TDF imali su nižu redukciju qHBsAg nego HBeAg pozitivni (132). U našoj studiji kod 49 pacijenata koji su na antivirusnoj terapiji NA praćena je vrednost qHBsAg i viremije HBV DNK u vremenskom intervalu od godinu dana. Lamivudinom je lečeno 26 pacijenata i zapaženo je da se nakon godinu dana terapije kod 61,5% pacijenata beleži pad nivo qHBsAg i pad viremije HBV DNK kod 46,1% pacijenata, porast qHBsAg kod 34,6% i porast viremije HBV DNK kod 3,85% što je verovatno posledica razvoja rezistencije na lamivudin ili

neadekvatne komplijanse. Vilkoksonov test ranga otkrio je statistički značajan pad viremije za godinu dana, $z = -2,760$, $p = 0,006$. Medijana rezultata opala je od 396,5 do 26,20. Veličina uticaja terapije lamivudinom na pad viremije može se okarakterisati kao umerena (prema Koenovim kriterijumima). U pogledu qHBsAg iako nije dobijen statistički značajan pad nivoa u prvom i drugom merenju, registrovano je smanjene nivoa qHBsAg kod > 60% pacijenata u prvih godinu terapije. U studiji *Milošević i sar.* su dobijeni rezultati da je posle 30 meseci terapije lamivudinom verovatnoća da se razvije rezistencija bila 35% (23).

U istraživanju Komota (*Kohmoto*) i saradnika koncentracije qHBsAg bile su više kod HBeAg pozitivnih, nego kod HBeAg negativnih pacijenata i nivo qHBsAg je korelirao sa viremijom HBV DNK. Takođe je zabeležen pad viremije HBV DNK, kao i qHBsAg kod većine pacijenata, ali je on bio sporiji. Ukoliko se razvila rezistencija došlo je i do porasta qHBsAg, obično čak i pre biohemijskog proboja. Kod rezistencije na lamivudin viremija HBV DNK je bila stalno povišena, dok je kod nekih pacijenata povišena vrednosti qHBsAg bila prolazna, a kod pojedinih je porast nivoa viremije HBV DNK bio praćen i daljim porastom qHBsAg (133).

U još jednoj studiji koja je sprovedena na 21 HBeAg negativna pacijenta lečenih lamivudinom koji su bili praćeni 46 meseci zabeležen je srednji pad vrednosti qHBsAg za 470 IU/mL (64–2.354), sa mesečnim padom za 7,7 IU/ml (134). U našoj studiji TDF lečeno je 23 pacijenta, kod 82,6% pacijenata beleži se značajan pad vrednosti qHBsAg, a kod njih 17,4% je registrovan porast, što se bliži statističkoj značajnosti ($p = 0,055$). Ovaj porast qHBsAg je moguć usled nedekvatne adherencije pacijenata. Vilkoksonov test ranga otkrio je statistički značajan pad viremije za godinu dana, $z = -1,956$, $p = 0,050$.

Medijana rezultata opala je od 4120,5 do 20,00. Veličina uticaja terapije TDF na pad viremije može se okarakterisati kao slaba do umerena (prema Koenovim kriterijumima). Takođe u pogledu qHBsAg, zabeležen je pad vrednosti qHBsAg nakon godinu dana koji teži statističkoj značajnosti ($p = 0,055$). Medijana qHBsAg opala je sa 3538,0 na 1114,0. Studije kojom su praćene vrednosti qHBsAg u toku terapije TDF su dosta oskudne, u jednom trogodišnjem istraživanju kod HBeAg pozitivnih pacijenata dobijeni su podaci da oni koji su izgubili HBsAg su imali veću promenu medijane od početnog nivoa do 24. nedelje u poređenju sa onima koji nisu postigli HBsAg negativizaciju. HBeAg negativni pacijenti su imali zanemarljiv pad qHBsAg. Pad nivoa qHBsAg je bio brži kod pacijenata koji su postigli HBsAg negativizaciju u odnosu na one koji nisu (134). U radu Vanga (*Wang*) i sar. 2018. godine ispitivani su faktori rizika loše adherencije u toku antivirusne terapije NA i promene u viremiji HBV DNK i dobijeni su rezultati da muški pol ima slabiju adherenciju u odnosu na ženski pol, a takođe i pacijenti koji su prethodno već lečeni NA. Lošije pridržavanje pri uzimanju NA će pre dovesti do virusološkog proboja i rezistencije na antivirusne lekove (135, 136, 137). Lošija adherencija je utvrđena kod 13 (16,9%) pacijenata lečenih LAM i kod 11 (14,3%) pacijenata lečenih TDF. Mogući razlozi neadekvatne adherencije su i slabija informisanost pacijenata o hroničnoj HBV infekciji, tako da boljim pristupom prema pacijentu i detaljnijim upoznavanjem o bolesti možemo motivisati pacijenta za boljom komplijansom (135).

Smatra se da početni pad qHBsAg u toku antivirusne terapije NA može pomoći da se predvidi mogućnost i vreme postizanja serološkog odgovora i da se odredi dužina lečenja, ali dosadašnja istraživanja su dosta nekonzistentna i nedovoljna, te je neophodno dalje ispitivanje (101, 138, 139).

Novi antivirusni lekovi su u razvoju i deluju na različite faze HBV replikacije (inhibitori ulaska u ćelije, replikacije, ugradnje, sekrecije) i imunomodulatorne terapije koji mogu da dopune do sada jedine terapijske opcije (pegilovani interferon i NA). Inhibicija ekspresije virusnog gena preko transkripcije cccDNK ili translacije mRNK može smaniti nivo qHBsAg. Polimeri nukleinske kiseline deluju protiv HBV na taj način što blokiraju oslobađanje HBsAg iz inficiranih hepatocita (125) i studije su pokazale visoku stopu gubitka HBsAg, ali je tačan mehanizam ostao nerazjašnjen (126). Zapažen je porast ALT-a kod velikog broja pacijenata, te su neophodna dodatna istraživanja da bi se potvrdila njihova bezbednost i efikasnost. Imunomodulatorne terapije imaju ograničeni uspeh, terapijska vakcina stimuliše T-ćelijski odgovor i *Toll-like* receptore da poboljša urođeni imunoodgovor. Najveći problem imunomodulatorne terapije je nekontrolisana imunoaktivacija što može dovesti do oštećenja ekstrahepatičkih organa i fatalnog hepatitisa (126).

S obzirom da su u razvoju novi antivirusni lekovi, potrebni su nam i novi dijagnostički markeri hronične HBV infekcije (qHBsAg, HBcrAg, HBV RNK) da bi se postigli novi ciljevi koji se baziraju na funkcionalnom izlečenju koje podrazumeva nedektibilan HBsAg i HBV DNK sa serokonverzijom ili bez nje u anti-HBs (90).

Nekoliko studija ukazuje na značaj qHBsAg, HBcrAg, HBV RNK kao surogat markere za cccDNK i mogu se koristiti kao prediktori virusnog relapsa i koji mogu pomoći u odluci kada treba prekinuti terapiju NA što predstavlja najveći problem današnjice (140).

HBcrAg je otkriven nedavno kao dodatni marker za hroničnu HBV infekciju. Istovremeno detektuje HBeAg, HBcAg i p22cr. Studija koja je sprovedena u Aziji

uglavnom na genotipovima B i C je došla do rezultata da bi HBcrAg mogao da bude značajan prediktor ishoda nakon prekida terapije NA (92). Nivo serumskog HBcrAg korelira sa intrahepatičkom cccDNK i može da predvidi relaps virusne infekcije nakon prekida antivirusne terapije NA (90). Prema tome može da predstavlja i neinvazivni virusni marker za indirektnu transkripcionu aktivnost cccDNK u jetri (90–93). Nivo HBcrAg je udružen sa povećanim rizikom od hepatocelularnog karcinoma kako kod naivnih, tako i kod pacijenata lečenih NA. Takođe je nađeno da HBcrAg korelira sa nivoom HBV DNK, ali ne i sa qHBsAg kod pacijenata na terapiji (91).

U svakodnevnoj kliničkoj praksi prekid antivirusne terapije NA i dalje predstavlja veliki izazov uprkos trenutnim vodičima. Kompletna eradikacija virusa nije moguća zbog perzistentne cccDNK u jetri. Trenutne terapijske opcije dovode do supresije virusne replikacije, ali ne i do eradikacije virusa, te nakon prekida antivirusne terapije zbog perzistentne cccDNK dolazi do reaktivacije bolesti. Novi biomarkeri kao što su qHBsAg i HBcrAg mogu da obezbede bolje smernice kada obustaviti terapiju NA (91). Cirkulišuća HBV RNK je 1996. godine dokazana u serumu obolelih od HBV infekcije (3). U toku terapije NA pruža informacije o transkripcionoj aktivnosti cccDNK, čak iako postoji supresija HBV DNK. Najveći klinički značaj se ogleda u proceni antivirusne potentnosti u toku terapije NA i pegilovanim interferenom, dobar je rani prediktor virusne mutacije u toku terapije lamivudinom, a nakon prekida antivirusne terapije predviđa HBV reaktivaciju (92–94). U studiji *Chen EQ* i saradnika su dobijeni podaci da kod HBeAg pozitivnih pacijenata HBcrAg pozitivno korelira sa qHBsAg i HBV RNK, dok kod HBeAg negativnih pacijenata nije dobijena značajna korelacija između HBcrAg, qHBsAg i HBV RNK. HBcrAg bolje korelira sa cccDNK nego sa qHBsAg i HBV RNK

nezavisno od HBeAg statusa (141). HBcrAg može biti detektibilan čak i ukoliko je viremija HBV DNK nedetektibilna i HBsAg negativan. Veoma je koristan virusni marker u diferenciranju HBeAg negativne hronične HBV infekcije i HBeAg negativnog hroničnog hepatitisa. Predviđa anti HBe serokonverziju spontanu ili indukovanu antivirusnom terapijom, efekat antivirusne terapije NA, rizik od reaktivacije okultne HBV infekcije u toku imunosupresivne terapije, rizik od HCC-a, kao i recidiv HCC-a nakon operativne intervencije (142). U istraživanju Testonija (*Testoni*) i saradnika na 130 pacijenata koji nisu lečeni antivirusnom terapijom dobijeni rezultati pokazuju da je HBcrAg viši kod HBeAg pozitivnih nego kod HBeAg negativnih pacijenata i da korelira sa serumskom HBV DNK, intrahepatičkom HBV DNK, pgRNK, cccDNK. Pacijenti koji imaju negativan HBcrAg imaju nižu cccDNK i nižu aktivnost cccDNK u odnosu na HBcrAg pozitivne pacijente. HBcrAg bi mogao biti veoma koristan u evaluaciji novih antivirusnih lekova u postizanju funkcionalnog izlečenja HBV infekcije ciljajući direktno ili indirektno intrahepatičnu cccDNK (143).

U studiji Lijua (*Liu*) i saradnika dobijeni su podaci da je nivo serumske HBV RNK niži kod HBeAg negativnih nego kod HBeAg pozitivnih pacijenata i sa najnižom vrednosti u inaktivnoj fazi hronične HBV infekcije. Nivo serumske HBV RNK raste kod HBeAg negativnih pacijenata u slučaju reaktivacije HBV infekcije. HBV RNK pozitivno korelira sa serumskom HBV DNK i qHBsAg kod HBeAg pozitivnih pacijenata, dok kod HBeAg negativnih HBV RNK korelira samo sa HBV DNK. HBV RNK reflektuje intrahepatičku cccDNK transkripcionu aktivnost i najviše se koristi u proceni efikasnosti antivirusne terapije, relapsa HBV infekcije po prekidu antivirusne terapije i virusne rezistencije (144). Istraživanjem Gaoa (*Gao*) i saradnika ispitivano je da li je serumska

HBV RNK jak surogat marker za intrahepatičku cccDNK u poređenju sa serumskom HBV DNK, nivoom qHBsAg i HBeAg kod HBeAg pozitivnih pacijenata. Njihove vrednosti su merene na početku i 96 nedelja nakon antivirusne terapije NA. Dobijeni su rezultati da preterapijski cccDNK bolje korelira sa serumskom HBV DNK nego sa HBV RNK i da nije dobijena korelacija između cccDNK i qHBsAg ili HBeAg. U 96. nedelji nakon antivirusne terapije NA intrahepatička cccDNK dobro korelira sa qHBsAg, ali ne sa HBV RNK, HBV DNK i HBeAg. Smanjenje intrahepatičke cccDNK od početnog nivoa do 96. nedelje korelira bolje sa smanjenjem qHBsAg nego sa smanjenjem ostalih virusnih markera (HBV DNK, HBV RNK, HBeAg) (145). Značaj ovih dijagnostičkih markera se još uvek ispituje, ali ukoliko se daljim istraživanjima utvrdi njihova korisnost moraju biti dostupni za kliničku praksu (126).

7. ZAKLJUČCI

- U našem istraživanju rezultati pokazuju da je nivo qHBsAg statistički značajno niži kod pacijenata sa inaktivnom formom hronične HBV infekcije.
- Vrednosti qHBsAg iznad 800 IU/ml, sa senzitivnošću od 60% i specifičnošću od 70%, ukazuju na aktivnu formu hronične HBV infekcije.
- Utvrđeno je da nivo qHBsAg pokazuje statistički značajno više vrednosti u grupi HBeAg pozitivnih, nego u grupi HBeAg negativnih pacijenata koji nisu na antivirusnoj terapiji NA.
- Nivo qHBsAg statistički značajno pozitivno korelira sa viremijom HBV DNK, korelacijom visokog intenziteta u grupi naivnih pacijenata.
- Nivo qHBsAg statistički značajno pozitivno korelira sa viremijom HBV DNK, korelacijom umerenog intenziteta i u grupi pacijenata na antivirusnoj terapiji NA.
- Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima qHBsAg, aminotransferaza i viremije HBV DNK između dva antivirusna leka.
- Utvrđeno je da su srednje vrednosti qHBsAg i viremije HBV DNK više u grupi HBeAg pozitivnih, nego u grupi HBeAg negativnih pacijenata, iako ova razlika nije dosegla statističku značajnost kod pacijenata lečenih NA.

LITERATURA

1. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370-98.
2. Lin S, Zhang YJ. Interference of apoptosis by hepatitis B virus. *Viruses* [serial on the Internet]. 2017 Aug [cited 2019 Jan 05];9(8):E230. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28820498>.
3. Delić D. Hronični virusni hepatitis. Beograd: Zavod za udžbenike; 2018.
4. Lim JK, Nguyen MH, Kim WR, Gish R, Perumalswami P, Jacobson IM. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2020;115(9):1429-38.
5. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet.* 2015;386(10003):1546-55.
6. Günal Ö, Barut Ş, Etikan İ, Duygu F, Tuncel U, Sünbül M. Relation between serum quantitative HBsAg, ALT and HBV DNA levels in HBeAg negative chronic HBV infection. *Turk J Gastroenterol.* 2014;25(1 Suppl):142-6.
7. Ružić M. Hepatitis B. U: Brkić S, Turkulov V, urednice. *Infektivne bolesti.* Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad; 2018. str. 138-46.
8. Leroi C, Adam P, Khamduang W, Kawilapat S, Ngo-Giang-Huong N, Ongwandee S, et al. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection in

- Thailand: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2016;51:36-43.
9. The World Health Organization. Hepatitis B [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 23]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
 10. Teo EK, Lok ASF. Epidemiology, transmission, and prevention of hepatitis B virus infection [Internet]. 2020 [updated 2020 Aug 31; cited 2020 Dec 5]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-transmission-and-prevention-of-hepatitis-b-virus-infection>.
 11. EMI. EMI Guidelines - Appendix 21 Hepatitis B virus: epidemiology and transmission risks [Internet]. [updated 2016 May; cited 2020 Dec 5]. Available from: <https://www.hpsc.ie/a-z/EMIToolkit/appendices/app21-26.pdf>.
 12. Ilić D, Dimitrijević D, Drakulović M, Milinković M, Plavša D, Simić D, i sar. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2015. godinu [monografija na Internetu]. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; 2016 [pristupljeno 2019 jan 04]. Dostupno na: <http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/Zarazne%20bolesti%20godisnji%20izvestaj%202015.pdf>.
 13. Knežević T. Izveštaj o sprovedenoj imunizaciji na teritoriji Republike Srbije u 2011. godini [monografija na Internetu]. Beograd: Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“; 2012 Apr [pristupljeno 2019 jan 04]. Dostupno na:

<http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/Izvestaj%20o%20sprovedenoj%20i munizaciji%202011.pdf>.

14. Siddiqui MH, Alamri SA, Al-Whaibi MH, Hussain Z, Ali HM, El-Zaidy ME. A mini-review of anti-hepatitis B virus activity of medicinal plants. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2017;31(1):9-15.
15. Kashyap B, Tiwari U, Prakash A. Hepatitis B virus transmission and health care workers: epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Indian Journal of Medical Specialities.* 2018;9(1):30-5.
16. Schillie S, Murphy TV, Sawyer M, Ly K, Hughes E, Jiles R, et al. CDC guidance for evaluating health-care personnel for hepatitis B virus protection and for administering postexposure management. *MMWR Recomm Rep.* 2013;62(RR-10):1-19.
17. Zage AU, Ali M, Diso SU. Epidemiology, virology, transmission, clinical manifestation and vaccine for hepatitis virus B: a review. *International Journal of Vaccines and Vaccination.* 2018;5(3):48-52.
18. Sofian M, Banifazl M, Ziai M, Aghakhani A, Farazi AA, Ramezani A. Intra-familial transmission of hepatitis B virus infection in Arak, Central Iran. *Iran J Pathol.* 2016;11(4):328-33.
19. Lobato C, Tavares-Neto J, Rios-Leite M, Trepo C, Vitvitski L, Parvaz P, et al. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(5):863-8.

20. Niederhauser C, Candotti D, Weingand T, Maier A, Tinguely C, Stolz M, et al. Reverse vertical transmission of hepatitis B virus (HBV) infection from a transfusion-infected newborn to her mother. *J Hepatol.* 2012;56(3):734-7.
21. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol.* 2004;38(10 Suppl 3):S158-68.
22. Dionne-Odom J, Njei B, Tita ATN. Elimination of vertical transmission of hepatitis B in Africa: a review of available tools and new opportunities. *Clin Ther.* 2018;40(8):1255-67.
23. Milošević I. Uticaj genotipova virusa hepatitisa B na klinički tok i ishod hronične infekcije [disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet; 2015.
24. Španović M. Kretanje utvrđenih profesionalnih zaraznih oboljenja kod radnika na teritoriji Vojvodine [disertacija]. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2016.
25. Podlaha O, Wu G, Downie B, Ramamurthy R, Gaggar A, Subramanian M, et al. Genomic modeling of hepatitis B virus integration frequency in the human genome. *PLoS One.* 2019;14 (7):e0220376.
26. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology.* 2009;49(5 Suppl):S13-21.
27. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2003;38(5):1075-86.
28. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008;134(1-2):235-49.

29. Minor MM, Slagle BL. Hepatitis B virus HBx protein interactions with the ubiquitin proteasome system. *Viruses*. 2014;6(11):4683-702.
30. Cento V, Mirabelli C, Dimonte S, Salpini R, Han Y, Trimoulet P, et al. Overlapping structure of hepatitis B virus (HBV) genome and immune selection pressure are critical forces modulating HBV evolution. *J Gen Virol*. 2013;94(Pt 1):143-9.
31. Madden CR, Slagle BL. Stimulation of cellular proliferation by hepatitis B virus X protein. *Dis Markers*. 2001;17(3):153-7.
32. Tralhao JG, Roudier J, Morosan S, Giannini C, Tu H, Goulenok C, et al. Paracrine in vivo inhibitory effects of hepatitis B virus X protein (HBx) on liver cell proliferation: an alternative mechanism of HBx-related pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(10):6991-6.
33. Kim K, Kim KH, Kim HH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha. *Biochem J*. 2008;416(2):219-30.
34. Na TY, Shin YK, Roh KJ, Kang SA, Hong I, Oh SJ, et al. Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(4):1122-31.
35. Song CZ, Bai ZL, Song CC, Wang QW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol*. 2003;9(7):1521-4.

36. Kim SY, Kim JK, Kim HJ, Ahn JK. Hepatitis B virus X protein sensitizes UV-induced apoptosis by transcriptional transactivation of Fas ligand gene expression. *IUBMB Life*. 2005;57(9):651-8.
37. Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol*. 2005;79(15):9810-20.
38. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2009;51(3):581-92.
39. Luo L, Chen S, Gong Q, Luo N, Lei Y, Guo J, et al. Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *Int J Mol Med*. 2013;31(1):197-204.
40. Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, et al. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 7):1854-64.
41. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*. 2011;55(5):996-1003.
42. Al-Sadeq DW, Taleb SA, Zaied RE, Fahad SM, Smatti MK, Rizeq BR, et al. Hepatitis B virus molecular epidemiology, host-virus interaction, coinfection, and laboratory diagnosis in the MENA region: an update. *Pathogens*. 2019;8(2):63.

43. Yim HJ. Hepatitis B virus genetic diversity and mutant. *Korean J Hepatol.* 2008;14(4):446-64.
44. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis.* 2005;25 Suppl 1:9-19.
45. Horvat RT. Diagnostic and clinical relevance of HBV mutations. *Lab Med.* 2011;42(8):488-96.
46. Bouvier GL, Williams A. Serotypes of hepatitis B antigen (HBs Ag): the problem of "new" determinants, as exemplified by "t". *Am J Med Sci.* 1975;270(1):165-71.
47. Purdy MA. Hepatitis B virus S gene escape mutants. *Asian J Transfus Sci.* 2007;1(2):62-70.
48. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt8):2059-73.
49. Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, Shahriar R, Liu T, Wang C, et al. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naïve patients. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1275-85.
50. Svicher V, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, Van Hemert F, Chen M, et al. Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res.* 2012;93(1):86-93.

51. Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol.* 2012;57(4):720-9.
52. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 2007;127(2):164-76.
53. Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result enhanced viral replication. *J Clin Invest.* 1996;98(10):2268-76.
54. Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, et al. Genome replication, virion secretion and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol.* 2003;77(12):6601-12.
55. Tong S, Kim KH, Chante C, Wands J, Li J. Hepatitis B virus e antigen variants. *Int J Med Sci.* 2005;2(1):2-7.
56. Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, Otegbayo JA, Olinger CM, Charpentier E, et al. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(1):88-94.
57. Pourkarim MR, Lemey P, Amini-Bavil-Olyae S, Maes P, Van Ranst M. Novel hepatitis B virus subgenotype A6 in African-Belgian patients. *J Clin Virol.* 2010;47(1):93-6.
58. Mulyanto, Depamede SN, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M, et al. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in

Indonesia:

identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Arch Virol.* 2009;154(7):1047-59.

59. Shi W, Zhu C, Zheng W, Zheng W, Ling C, Carr MJ, et al. Subgenotyping of genotype C hepatitis B virus: correcting misclassifications and identifying a novel subgenotype. *PLoS One.* 2012;7(10):e47271.
60. Ghosh S, Banerjee P, Deny P, Mondal RK, Nandi M, Roychoudhury A, et al. New HBV subgenotype D9, a novel D/C recombinant, identified in patients with chronic HBeAg-negative infection in Eastern India. *J Viral Hepat.* 2013;20(3):209-18.
61. Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thamavong T, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(11):1777-80.
62. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7152-68.
63. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol.* 2008;82(11):5657-63.
64. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009;83(20):10538-47.

65. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5427-34.
66. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58(4):258-66.
67. Feitelson MA. Pathogenesis of hepatitis B virus associated chronic liver disease. In: Lasfar A, editor. *Liver cancer*. London: IntechOpen; 2018.
68. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int*. 2009;29 Suppl 1:100-7.
69. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S173-81.
70. Hadziyannis SJ. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *J Hepatol*. 2011;55(1):183-91.
71. Wong GL, Chan HL, Yu Z, Chan HY, Tse CH, Wong VW. Liver fibrosis progression is uncommon in patients with inactive chronic hepatitis B - a prospective cohort study with paired transient elastography examination. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(12):1842-8.
72. Burek V. Dijagnostika virusnih hepatitisa. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*. 2008;4(15).
73. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1118-29.

74. Chen YC, Jeng WJ, Chu CM, Liaw YF. Decreasing levels of HBsAg predict HBsAg seroclearance in patients with inactive chronic hepatitis B virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(3):297-302.
75. Chen CH, Hung CH, Wang JH, Lu SN, Hu TH, Lee CM. Long-term incidence and predictors of hepatitis B surface antigen loss after discontinuing nucleoside analogues in noncirrhotic chronic hepatitis B patients. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(9):997-1003.
76. Chen Y, Yu D, Zhang W, Qiu C, Xiang G, Dai W, et al. HBV subgenotype C2 infection, A1762T/G1764A mutations may contribute to hepatocellular carcinoma with cirrhosis in Southeast China. *Iran J Public Health*. 2012;41(11):10-8.
77. World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection: Mar-15. Geneva: World Health Organization; 2015.
78. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "New" antigen in leukemia sera. *JAMA*. 1965;191:541-6.
79. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Intern Med*. 1967;66(5):924-31.
80. Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science*. 1977;197(4298):17-25.

81. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology*. 2010;139(2):483-90.
82. Tseng TC, Kao JH. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. *J Gastroenterol*. 2013;48(1):13-21.
83. Lesnikar V. Epidemiologija hepatitis B i C u Hrvatskoj. *Acta Med Croatica*. 2005;59(5):377-81.
84. World Health Organization. WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization; 2017.
85. Baudi I, Inoue T, Tanaka Y. Novel Biomarkers of Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma: Clinical Significance of HBcrAg and M2BPGi. *Int J Mol Sci* [internet]. 2020 Jan; [cited 2021 Jan 10];31;21(3):949. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC70373646>
86. Lee JM, Ahn SH. Quantification of HBsAg: basic virology for clinical practice. *World J Gastroenterol*. 2011;17(3):283-9.
87. Degushi M, Yamashita N, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminiscent microparticle immunoassay. *J Virol Methods*. 2004;115(2):217-22.
88. Ungtrakul T, Sriprayoon T, Kusuman P, Chunnuan P, Soonklang K, Sornsamdang G, et al. Role of quantitative hepatitis B surface antigen in predicting inactive carriers and HBsAg seroclearance in HBeAg-negative

chronic hepatitis B patients. *Medicine (Baltimore)* 2017 Mar [cited 2019 Jan 07];96(13):E6554.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28353619>.

89. Broquetas T, Garcia-Retortillo M, Hernandez JJ, Puigvehí M, Cañete N, Coll S, et al. Quantification of HBsAg to predict low levels and seroclearance in HBeAg-negative patients receiving nucleos(t)ide analogues. *PLoS One* [serial on the Internet]. 2017 Nov [cited 2019 Jan 07];12(11):e0188303. Available from:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0188303>.
90. Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, Ghany MG. Hepatitis B cure: from discovery to regulatory approval. *Hepatology*. 2017;66(4):1296-313.
91. Kho-Herman SGR, Chan HLY. Stopping nucleos(t)ide analog treatment in chronic hepatitis B - who and when? *Liver Res*. 2017;1(2):135-9.
92. van Bömmel F, Berg T. Stopping long-term treatment with nucleos(t)ide analogues is a favourable option for selected patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Liver Int*. 2018;38(Suppl 1):90-6.
93. Lu F, Wang J, Chen X, Xu D, Xia N. Potential use of serum HBV RNA in antiviral therapy for chronic hepatitis B in the era of nucleos(t)ide analogs. *Front Med*. 2017;11(4):502-8.
94. Huang YW, Chayama K, Kao JH, Yang SS. Detectability and clinical significance of serum hepatitis B virus ribonucleic acid. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015;4(3):197-202.

95. Vigano M, Grossi G, Loglio A, Lampertico P. Hepatitis B: is there still a role for interferon? *Liver Int.* 2018;38 Suppl 1:79-83.
96. von Bömmel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Krüger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology.* 2015;61(1):66-76.
97. Assis DR, Tenore Sde B, Pinho JR, Lewi DS, Ferreira PR. Characteristics of an outpatient chronic hepatitis B virus infection cohort. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(2):189-95.
98. Bixler D, Zhong Y, Ly KN, Moorman AC, Spradling PR, Teshale EH, et al. Mortality among patients with chronic hepatitis B infection: the Chronic Hepatitis Cohort Study (CHeCS). *Clin Infect Dis.* 2019;68(6):956-63.
99. Ruggieri A, Gagliardi MC, Anticoli S. Sex-dependent outcome of hepatitis B and C viruses infections: synergy of sex hormones and immune responses? *Front Immunol.* 2018;9:2302.
100. Baig S. Gender disparity in infections of hepatitis B virus. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2009;19(9):598-600.
101. Zoulim F, Carosi G, Greenbloom S, Mazur W, Nguyen T, Jeffers L. Quantification of HBsAg in nucleos(t)ide-naïve patients treated for chronic hepatitis B with entecavir with or without tenofovir in the BE-LOW study. *J Hepatol.* 2015;62(1):56-63.
102. Petrovic J, Salkic NN, Ahmetagic S, Stojic V, Mott-Divkovic S. Prevalence of chronic hepatitis B and hepatitis C among first time blood donors in Northeast

- Bosnia and Herzegovina: an estimate of prevalence in general population. *Hepat Mon.* 2011;11(8):629-33.
103. Fejza H, Telaku S. Prevalence of HBV and HCV among blood donors in Kosovo. *Virologia*. 2009;6:21.
104. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol.* 2003;39 Suppl 1:S64-9.
105. Duric P, Rajcevic S, Ilic S, Milosevic V, Hintringer K, Fabri M, et al. Hepatitis B outbreak among men who have sex with men in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. *LGBT Health.* 2018;5(1):91-3.
106. Larsson SB, Malmström S, Hannoun C, Norkrans G, Lindh M. Mechanisms downstream of reverse transcription reduce serum levels of HBV DNA but not of HBsAg in chronic hepatitis B virus infection. *Virologia*. 2015;12(1):213.
107. Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, et al. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2011;18(10):e508-15.
108. Zhu HY, Zhang XS. Relationship between HBV DNA load and levels of serum HBsAg in patients with chronic hepatitis B. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(10):2061-4.
109. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol.* 2010;52(4):514-22.

110. Ganji A, Esmaeilzadeh A, Ghafarzadegan K, Helalat H, Rafatpanah H, Mokhtarifar A. Correlation between HBsAg quantitative assay results and HBV DNA levels in chronic HBV. *Hepat Mon.* 2011;11(5):342-5.
111. Mahdavi MR, Haghshenas MR, Roshan P, Hojjati MT, Mahdavi M, Jalali H, et al. Is quantitative HBsAg measurement a reliable substitute for HBV DNA quantitation? *Research in Molecular Medicine.* 2015;3(3):33-7.
112. Pita I, Horta-Vale AM, Cardoso H, Macedo G. Hepatitis B inactive carriers: an overlooked population? *GE Port J Gastroenterol.* 2014;21(6):241-9.
113. Liu J, Yang HI, Lee MH, Jen CL, Batrla-Utermann R, Lu SN, et al. Serum levels of hepatitis B surface antigen and DNA can predict inactive carriers with low risk of disease progression. *Hepatology.* 2016;64(2):381-9.
114. Alexopoulou A, Karayiannis P. HBeAg negative variants and their role in the natural history of chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014;20(24):7644-52.
115. Marcellin P, Bonino F, Yurdaydin C, Hadziyannis S, Moucari R, Kapprell HP, et al. Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e-antigen-negative patients. *Hepatol Int.* 2013;7(1):88-97.
116. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, Ripault MP, Castelnau C, Martinot-Peignoux M, et al. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology.* 2009;49(4):1151-7.

117. Pérez-Cameo C, Pons M, Esteban R. New therapeutic perspectives in HBV: when to stop NAs. *Liver Int.* 2014;34 Suppl 1:146-53.
118. Chu CM, Liaw YF. Hepatitis B surface antigen seroclearance during chronic HBV infection. *Antivir Ther.* 2010;15(2):133-43.
119. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, et al. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 – a core group report. *J Hepatol.* 2011;55(5):1121-31.
120. Gane E, Jia J, Han K, Tanwandee T, Chuang WL, Marcellin P, et al. NEPTUNE study: on-treatment HBsAg level analysis confirms prediction of response observed in phase-3 study of peginterferon alfa-2A in HBeAg-positive patients. *J Hepatol.* 2011;54(Suppl 1):S31.
121. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, et al. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2009;49(4):1141-50.
122. Wong DK, Seto WK, Fung J, Ip P, Huang FY, Lai CL, et al. Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(8):1004-10.
123. Warner N, Locarnini S. Mechanisms of hepatitis B virus resistance development. *Intervirology.* 2014;57(3-4):218-24.
124. Kwon JH, Jang JW, Choi JY, Park CH, Yoo SH, Bae SH, et al. Should lamivudine monotherapy be stopped or continued in patients infected with

- hepatitis B with favorable responses after more than 5 years of treatment? *J Med Virol.* 2013;85(1):34-42.
125. Tout I, Loureiro D, Mansouri A, Soumelis V, Boyer N, Asselah T. Hepatitis B surface antigen seroclearance: immune mechanisms, clinical impact, importance for drug development. *J Hepatol.* 2020;73(2):409-22.
126. Suk-Fong Lok A. Hepatitis B treatment: what we know now and what remains to be researched. *Hepatol Commun.* 2018;3(1):8-19.
127. Jeng WJ, Chen YC, Chien RN, Sheen IS, Liaw YF. Incidence and predictors of hepatitis B surface antigen seroclearance after cessation of nucleos(t)ide analogue therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2018;68(2):425-34.
128. Pazgan-Simon M, Simon KA, Jarowicz E, Rotter K, Szymanek-Pasternak A, Zuwała-Jagiello J. Hepatitis B virus treatment in hepatocellular carcinoma patients prolongs survival and reduces the risk of cancer recurrence. *Clin Exp Hepatol.* 2018;4(3):210-6.
129. Kawanaka M, Nishino K, Nakamura J, Oka T, Urata N, Goto D, et al. Quantitative levels of hepatitis B virus DNA and surface antigen and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B receiving long-term nucleos(t)ide analogue therapy. *Liver Cancer.* 2014;3(1):41-52.
130. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, Gane E, De Man RA, Krastev Z, et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2011;140(1):132-43.

131. Wursthorn K, Jung M, Riva A, Goodman ZD, Lopez P, Bao W, et al. Kinetics of hepatitis B surface antigen decline during 3 years of telbivudine treatment in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatology*. 2010;52(5):1611-20.
132. Liu YY, Liang XS. Progression and status of antiviral monitoring in patients with chronic hepatitis B: from HBsAg to HBV RNA. *World J Hepatol*. 2018;10(9):603-11.
133. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D, Takeda T, Kawada N, et al. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J Med Virol*. 2005;75(2):235-9.
134. Viganò M, Lampertico P. Clinical implications of HBsAg quantification in patients with chronic hepatitis. *Saudi J Gastroenterol*. 2012;18(2):81-6.
135. Wang L, Chen P, Zheng C. Poor adherence is a contributor to viral breakthrough in patients with chronic hepatitis B. *Infect Drug Resist*. 2018;11:2179-85.
136. Cai S, Cao J, Yu T, Xia M, Peng J. Effectiveness of entecavir or telbivudine therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection pretreated with interferon compared with de novo therapy with entecavir and telbivudine. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(22):e7021.
137. Cai S, Yu T, Jiang Y, Zhang Y, Lv F, Peng J. Comparison of entecavir monotherapy and de novo lamivudine and adefovir combination therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B with high viral load: 48-week result. *Clin Exp Med*. 2016;16(3):429-36.

138. Seto WK, Wong DK, Fung J, Huang FY, Lai CL, Yuen MF. Reduction of hepatitis B surface antigen levels and hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B patients receiving 10 years of nucleoside analogue therapy. *Hepatology*. 2013;58(3):923-31.
139. Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(12):1462-8.
140. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol*. 2016;65(4):700-10.
141. Chen EQ, Wang ML, Tao YC, Wu DB, Liao J, He M, et al. Serum HBcrAg is better than HBV RNA and HBsAg in reflecting intrahepatic covalently closed circular DNA. *J Viral Hepat*. 2019;26(5):586-95.
142. Mak LY, Wong DK, Cheung KS, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Review article: hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an emerging marker for chronic hepatitis B virus infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(1):43-54.
143. Testoni B, Lebossé F, Scholtes C, Berby F, Miaglia C, Subic M, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients. *J Hepatol*. 2019;70(4):615-25.

144. Liu Y, Jiang M, Xue J, Yan H, Liang X. Serum HBV RNA quantification: useful for monitoring natural history of chronic hepatitis B infection. *BMC Gastroenterol.* 2019;19(1):53. Erratum in: *BMC Gastroenterol.* 2019;19(1):72.
145. Gao Y, Li Y, Meng Q, Zhang Z, Zhao P, Shang Q, et al. Serum hepatitis B virus DNA, RNA, and HBsAg: which correlated better with intrahepatic covalently closed circular DNA before and after nucleos(t)ide analogue treatment? *J Clin Microbiol.* 2017;55(10):2972-82.

LISTA SKRAĆENICA

HBV – hepatitis B virus

HHB- hronični hepatitis B

HCC – hepatocelularni karcinom

HBsAg – *hepatitis B s (površinski) antigen*

qHBsAg – kvantitativni hepatitis B s (površinski) antigen

HBcAg – hepatitis B c antigen (eng. core jezgro)

HBeAg – hepatitis B e antigen

Anti HBe – antitela na hepatitis B e antigen

Anti HBs – antitela na hepatitis B s (površinski) antigen

HBcrAg – hepatitis B (*core*) – povezan antigen

cccDNK – cirkularna kovalentno vezana DNK (eng. circular covalently closed DNA)

ELISA – enzimoinmuno test (*eng. Enzyme-linked immunosorbent assay*)

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (*eng. polymerase chain reaction*)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

NA – analozi nukleoz(t)ida

ALT – alanin aminotransferaza

AST – aspartat aminotransferaza

SIK – stabilna imunska kontrola

HIV – virus humane imunodeficijencije

ROC – *receiver operating curve*

AUC – *area under the curve*

EASL – *European Association for the Study of the Liver*

ETV – entekavir

TDF – tenofovir disoproksil fumarate

TAF – tenofovir alafenamide

LAM – lamivudin

TBV – telbivudin

ADV – adefovir dipivoksil

SZO- Svetska Zdravstvena Organizacija

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Улога квантитативног <i>HBsAg</i> у дијагностици и терапији хроничне хепатитис Б вирусне инфекције
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
Универзитет у Новом Саду, Медицински факултет Нови Сад
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије-Клиничка истраживања
1. Опис података
1.1 Врста студије Докторска дисертација <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Истраживање је конципирано као проспективна студија пресека, која је обухватила 238 пацијената Одсека хепатитиса и обољења хепатобилијарног тракта, Клинике за инфективне болести, Клиничког центра Војводине са дијагнозом хроничне ХБВ инфекције у периоду 2019./2020. године.
1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи , електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту узорци венске крви ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

- е) текст, навести врсту: **литературни изводи**
ж) мапа, навести врсту _____
з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека _____ **.xls** _____
б) SPSS фајл, датотека _____ **.sav** _____
в) PDF фајл, датотека _____
г) Текст фајл, датотека _____ **.docx** _____
д) JPG фајл, датотека _____
е) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли: **велики број**
б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): **велики број**

1.3.3. Поновљена мерења

- а) **да**
б) **не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је: 12 месеци
б) варијабле које се више пута мере односе се на мерење вредности *qHBsAg* и *виремије HBV DNK*.
в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као: годину дана након антивирусне терапије *HA. sav*

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) **Да**

б) **Не**

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип _____
б) корелационо истраживање, навести тип _____
в) анализа текста, навести тип: **Прикупљање података анализом доступне литературе**

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
 - б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
 - в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода, одбацивањем екстрема и валидацијом добијених података.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Упоредњем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности

(https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање 24.04.2019. године, Комисија за етичност клиничких испитивања

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**
Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) **јавно доступни**

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство-некомерцијално-без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Марија Пете maria.pete@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Марија Пете maria.pete@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Мариа Пете maria.pete@mf.uns.ac.rs