

*Dorota Kozielowicz<sup>1</sup>, Anna Grabińska<sup>2</sup>, Grzegorz Madej<sup>2</sup>, Magdalena Wietlicka-Piszcz<sup>3</sup>*

**IMPACT OF SELECTED PREDICTIVE FACTORS ON SUSTAINED VIROLOGIC RESPONSE IN HCV GENOTYPE 4 INFECTED PATIENTS TREATED WITH PEGYLATED INTERFERON ALPHA AND RIBAVIRIN**

**WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW PREDYKCYJNYCH NA UZYSKANIE TRWAŁEJ ODPOWIEDZI WIRUSOLOGICZNEJ U PACJENTÓW ZAKAŻONYCH GENOTYPEM 4 HCV LECZONYCH INTERFERONEM PEGYLOWANYM ALFA I RYBAWIRYNĄ**

<sup>1</sup>Collegium Medicum Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University Toruń, Department of Infectious Diseases and Hepatology Faculty of Medicine, Bydgoszcz, Poland

<sup>2</sup>Second Department of Infectious Diseases Voivodship Specialist Hospital, Wrocław, Poland

<sup>3</sup>Collegium Medicum Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University Toruń, Department of Theoretical Foundations of Biomedical Sciences and Medical Computer Science Faculty of Pharmacy, Bydgoszcz, Poland

<sup>1</sup> Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Lekarski, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Polska

<sup>2</sup> Drugi Oddział Chorób Zakaźnych Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. J. Gromkowskiego, Wrocław, Polska

<sup>3</sup> Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Podstaw Teoretycznych Nauk Biomedycznych i Informatyki Medycznej, Polska

ABSTRACT

**BACKGROUND.** Dual therapy (PegIFN and ribavirin) (DT) had been the standard of care in patients infected with HCV genotype 4 (HCV-4) until 2014. Thereafter, new treatment options were available including IFN-based and other IFN-free regimens.

**Objectives:** The aim was to assess the efficacy (SVR24) of DT and a selection of predictive factors of SVR in HCV-4 infected patients.

**METHODS.** 112 patients (62 men) of median age 23 years were treated with DT for 48/72 weeks (107/5). Most of them were treatment naïve (80.4%) and with fibrosis  $F \leq 2$  (83.1%). Individuals with prior hepatitis B virus (HBV) infection, i.e. positive antibodies to the hepatitis B core antigen (anti-HBc), negative hepatitis B surface antigen and undetectable serum HBV DNA were included into the analysis.

**RESULTS.** SVR24 was achieved in 46/112 (41.1%) patients. Null response (NR) was recognized in 24.1%, partial response in 13.4%, relapse in 10.7% and breakthrough in 6.2% of patients. SVR24 was associated with lack of previous treatment experience, younger age (<40 years), pretreatment viral load  $< 2 \times 10^5$  IU/ml, less advanced fibrosis ( $F \leq 2$ ) and >10% loss of baseline weight. Anti-HBc was detected in 25 (22.3%) patients out of which four (16%) achieved SVR24 in comparison to 42 (48.8%) patients with anti-HBc negative ( $p < 0.005$ ); NR was observed in 10 (40%) individuals vs 17 (19.8%) in anti-HBc negative patients.

**CONCLUSIONS.** SVR24 was low. The age <40 years, less advanced fibrosis, pretreatment viral load  $< 2 \times 10^5$  IU/ml, lack of previous treatment experience, loss of body weight were the positive predictive factors of SVR24. Prior HBV infection correlated with poorer SVR24 and NR.

**Key words:** *pegylated interferon, HCV genotype 4, sustained virologic response, anti-Hbc*

## STRESZCZENIE

**WSTĘP.** Terapia dwulekowa (PegIFN i rybawiryna) (TD) do 2014 roku była leczeniem z wyboru w przypadku pacjentów zakażonych genotypem 4 HCV (HCV-4). Następnie pojawiły się nowe opcje terapeutyczne uwzględniające schematy oparte na interferonie i wykluczające jego wykorzystanie.

**CEL.** Założeniem pracy było oszacowanie skuteczności (SVR24) TD i wyłonienie czynników predykcyjnych osiągnięcia trwałej odpowiedzi wirusologicznej u chorych zakażonych genotypem 4 HCV.

**METODY.** 112 pacjentów (62 mężczyzn) o medianie wieku 23 lata było leczonych TD przez 48/72 tygodnie (107/5). Większość z nich nie otrzymywała uprzednio leczenia przyczynowego (80,4%) i charakteryzowała się włóknieniem ocenianym na poziomie  $F \leq 2$  (83,1%). W analizie uwzględniono osoby z wykładnikami serologicznymi przebytej infekcji HBV, identyfikowane na podstawie obecności przeciwciał do antygenu rdzeniowego wirusa (anty-HBc) i braku antygenu powierzchniowego (HBsAg) oraz niewykrywalnego HBV DNA.

**WYNIKI.** SVR24 osiągnęło 46/112 (41,1%) pacjentów. Brak odpowiedzi wirusologicznej (null responders, NR) stwierdzono u 24,1% badanych, częściową odpowiedź wirusologiczną rejestrowano u 13,4% leczonych, nawrót u 10,7% a u 6,2% przełom wirusologiczny. Większą szansę na uzyskanie SVR24 mieli pacjenci uprzednio nie leczeni, w młodszym wieku (<40 lat), z niską wiremią wyjściową (< $2 \times 10^5$  IU/ml), mniej zaawansowanym włóknieniem i utratą powyżej 10% wyjściowej masy ciała w trakcie leczenia. Anty-HBc zostały wykryte u 25 (22,3%) pacjentów, z których czterech (16%) uzyskało SVR24 w porównaniu do 42 (48,8%) chorych z ujemnym wynikiem antyHBc ( $p < 0,005$ ); brak odpowiedzi wirusologicznej stwierdzono u 10 (40%) leczonych anty-HBc(+) w odniesieniu do 17 (19,8%) anty-HBc (-) pacjentów.

**WNIOSKI.** Odsetek SVR24 był niski. Wiek <40 lat, mniej zaawansowane włóknienie, niska wiremia wyjściowa < $2 \times 10^5$  IU/ml, brak uprzedniego leczenia przyczynowego oraz utrata masy ciała w trakcie terapii były pozytywnymi czynnikami predykcyjnymi uzyskania SVR24. Przebyta infekcja HBV korelowała z niższym odsetkiem SVR2 i częstszym brakiem odpowiedzi na leczenie.

**Słowa kluczowe:** *interferon pegylogowany, genotyp 4 HCV, trwała odpowiedź wirusologiczna, anty-HBc.*

## BACKGROUND

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the main causes of chronic liver disease worldwide. The global viraemic HCV infections were estimated at 1.1% (0.9-1.4%), corresponding to 80 (64-103) million infections (1). HCV genotype 4 (HCV-4) is the most common in North Africa and the Middle East, what is attributable to its high prevalence in Egypt (1). In Europe, HCV-4 prevalence ranges from 0.5-1.7% (i.e. Slovakia, Hungary, Sweden) to above 10% (i.e. Greece, Montenegro, Albania, Belgium). In these countries, most of the infected patients are intravenous drug users (IVDUs), HCV/HIV co-infected individuals and immigrants from endemic countries and returning expatriate communities who lived in Africa (1-4). Dual therapy (DT) with pegylated interferon alpha (PegIFN) and ribavirin (RBV) had been the standard of care in chronic HCV-4 until the beginning of 2014 (5). Thereafter, new treatment options were available, some of them IFN-based and other IFN-free regimens (6-7). New studies show that the IFN-containing composition has high efficacy and low rate of relapse, even in patients with advanced fibrosis (8). Moreover, in children DT remains the only possible treatment option. Therefore, our assumption is that in certain countries the IFN-containing regimens remain in use.

## WPROWADZENIE

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) jest jedną z głównych przyczyn przewlekłej choroby wątroby u ludzi na całym świecie. Jego globalne rozpowszechnienie szacowane jest na 1,1% (0,9-1,4%), co oznacza 80 (64-103) milionów osób dotkniętych tą infekcją (1). Genotyp 4 HCV (HCV-4) jest najbardziej rozpowszechniony w krajach Afryki Północnej i na Środkowym Wschodzie, co koresponduje z wysoką liczbą infekcji w Egipcie (1). W Europie odsetkowy udział genotypu 4 we wszystkich infekcjach HCV waha się od 0,5-1,7% (m.in. Słowacja, Węgry, Szwecja) do ponad 10% (m.in. Grecja, Montenegro, Albania, Belgia). Większość chorych w tych krajach stanowią osoby stosujące dożylne środki psychoaktywne, osoby z koinfekcją HCV/HIV, imigranci z krajów endemicznych i repatrianci, którzy przebywali w Afryce (1-4).

Terapia dwulekowa (TD) z zastosowaniem pegylogowanego interferonu alfa (PegIFN) i rybawiryny (RBV) do początku 2014 roku stanowiła standard terapeutyczny (5). Od tego czasu dostępne stały się nowe opcje terapeutyczne, z których jedne są nadal oparte na interferonie, a inne wykluczają jego zastosowanie - tzw. terapie bezinterferonowe (6-7). Nowe badania wykazały wysoką skuteczność i niski odsetek nawrotów po terapiach opartych na interferonie, nawet

## OBJECTIVES

The aim of our study was to assess the efficacy, i.e. sustained virologic response at post treatment week 24 (SVR24) of DT in HCV-4 infected patients. The secondary objective was to assess a selection of predictive factors of SVR24.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

One hundred and thirty two consecutive patients with confirmed chronic HCV-4 infection started DT at the two liver centers between January 2006 and December 2014. One hundred and twelve patients fulfilled the inclusion criteria and were enrolled in the analysis. The group included 50 women and 62 men aged 18-80 years who underwent therapy with PegIFN- $\alpha$ 2a and RBV (54 patients), or PegIFN- $\alpha$ 2b and RBV (58 patients). The inclusion criteria were presence of chronic HCV infection defined as detectable levels of HCV RNA in serum together with positive anti-HCV antibodies for more than 6 months and histological changes for chronic hepatitis C in percutaneous liver biopsy performed within two years before the start of DT. The fibrosis stage was assessed in Metavir score. Individuals with prior hepatitis B virus (HBV) infection, i.e. positive antibodies to the hepatitis B core antigen (anti-HBc), negative hepatitis B surface antigen (HBsAg) and undetectable serum HBV DNA were included into the analysis. Patients with other hepatic diseases (e.g., active HBV infection, Wilson's disease, alcoholic liver disease, autoimmune hepatitis, drug-induced hepatitis), HIV co-infection, decompensated cirrhosis and other known contraindications to DT were excluded.

Patients received one subcutaneous dose of 180  $\mu$ g PegIFN- $\alpha$ 2a (Pegasys<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) weekly and oral RBV (Copegus<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) twice daily, adjusted to patients' weight (1000 mg for <75 kg, 1200 mg for >75 kg). PegIFN- $\alpha$ 2b (PegIntron<sup>®</sup>, MSD, Herdfordshire, GB) was injected subcutaneously at a dose of 1.5  $\mu$ g/kg once a week and RBV (Rebetol<sup>®</sup>, MSD, Herdfordshire, GB) was given orally twice daily at a dose adjusted to patients' weight (800 mg for <65 kg, 1000 mg for 65-85 kg, 1200 mg for >85kg). PegIFN and RBV type was prescribed at the discretion of the doctor as patients were treated in routine practice. The planned treatment duration was 48 weeks. In case of the delayed virologic response, treatment duration was extended to week 72. Standard definitions for rapid, early, delayed and sustained virologic response as well as null, partial response and relapse or breakthrough were applied (5). Futility rules were defined in compliance with the guidelines valid in a given treatment period (2,5).

w grupie pacjentów z zaawansowanym włóknieniem (8). Co więcej, u dzieci TD pozostaje jak dotąd jedyną dostępną opcją terapeutyczną. Zakładamy, że w pewnych krajach terapie oparte na interferonie nadal pozostaną w użyciu.

## CEL

Celem naszego badania była ocena skuteczności TD (m.in. trwałej odpowiedzi wirusologicznej ocenianej 24 tygodnie po zakończonym leczeniu (SVR24)) u chorych zakażonych genotypem 4 HCV.

## MATERIAŁ I METODY

### Pacjenci

Stu trzydziestu dwóch kolejnych pacjentów z potwierdzonym przewlekłym zakażeniem genotypem 4 HCV rozpoczęło TD w dwóch polskich ośrodkach hepatologicznych pomiędzy styczniem 2006 a grudniem 2014 roku. Stu dwunastu pacjentów spełniało kryteria włączenia do badania i zostało uwzględnionych w dalszej analizie. Grupa składała się z 50 kobiet i 62 mężczyzn w wieku 18-80 lat, którzy przebyli terapię PegIFN- $\alpha$ 2a i RBV (54 pacjentów), oraz PegIFN- $\alpha$ 2b i RBV (58 pacjentów). Kryteria włączenia obejmowały cechy przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C, definiowane jako wykrywalny poziom HCV RNA w surowicy oraz dodatnie przeciwciała anti-HCV, utrzymujące się co najmniej 6 miesięcy oraz zmiany histologiczne typowe dla przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C, stwierdzone w przeszłorocznej biopsji wątroby wykonanej w ciągu dwóch lat poprzedzających rozpoczęcie TD. Stopień włóknienia był oceniany w skali Metavir. W analizie uwzględniono osoby z przebytą infekcją wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), definiowaną jako wykrywalne przeciwciała dla antygeny rdzeniowego HBV (anty-HBc), z nieobecny antygenem powierzchniowym HBV (HBsAg) oraz z niewykrywalnym surowiczym HBV DNA. Pacjenci z innymi hepatopatiami (m.in. aktywna infekcja HBV, choroba Wilsona, alkoholowa choroba wątroby, autoimmunizacyjne zapalenie wątroby, zapalenie wątroby indukowane lekami), z koinfekcją HIV, zdekompensowaną marskością wątroby oraz innymi znanymi przeciwwskazaniami do TD zostali wykluczeni z analizy.

Pacjenci otrzymywali 180  $\mu$ g PegIFN- $\alpha$ 2a (Pegasys<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Wyhlen, Niemcy) podskórnie raz w tygodniu oraz RBV (Copegus<sup>®</sup>, Roche, Grenzach-Wyhlen, Niemcy) doustnie dwa razy dziennie w dawce dobowej dostosowanej do masy ciała pacjenta (1000 mg dla <75 kg, 1200 mg dla >75 kg). PegIFN- $\alpha$ 2b (PegIntron<sup>®</sup>, MSD, Herdfordshire, Wielka Brytania) był podawany w iniekcji podskórnej raz

## Methods

Biochemical laboratory tests [serum alanine aminotransferase (ALT), hemoglobin level, platelet and leukocyte counts] and HCV RNA levels were determined in all patients at baseline, treatment weeks 4, 12, 24, 48 or 72, and 24 weeks after the end of therapy. Two quantitative PCR assays were used to measure HCV RNA: Roche COBAS TaqMan v.2.0 (lower limit of quantification (LLOQ) of 15IU/mL) or Abbott RealTime System (LLOQ of 12IU/mL). HCV genotype was determined using INNO-LiPA HCV assay (Immunogenetics®, Belgium) or Linear Array HCV Genotyping Test (LA HCV GT) reagents from Roche. Anti-HCV antibodies were analyzed using Elisa Murex HCV v.4.0 assay. HBsAg and anti-HBc were determined by chemiluminescent immunoassays (CLIA), using the Biomedica test (Vienna, Austria) and the LIAISON XL analyser from DiaSorin (Saluggia, Italy). HBV DNA was quantified by PCR-based method with product analysis using real-time PCR, automatic DNA isolation on the Cobas AmpliPrep apparatus and amplification on the Cobas TaqMan Roche analyser (Amplicor HBV monitor, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). A LLOQ was 20IU/ml and it was linear over the range from 20 to  $1.7 \times 10^8$  IU/ml ( $1.3-8.23 \log_{10}$ ).

### Compliance with Ethical Standards

This study was retrospective, conducted with respect to the Declaration of Helsinki principles and was approved by local Ethics Committee (KB/684/2016). Analysis of medical records of patients was used to collect the study data. All patient data were de-identified.

### Statistical analysis

The summary statistics for normally distributed continuous variables are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or as median with range for non-normally distributed variables. Categorical variables are presented as frequencies. Differences between continuous normally distributed variables were analyzed by the *t* test or by the Wilcoxon test for not normally distributed variables. Differences for categorical variables were assessed using the chi-square or Fisher exact test for independence. The Logistic Regression Analysis was used to find the independent predictors of SVR24. Variables significant at the 0.2 level in the univariable models were considered for inclusion into the multivariable model. The backward elimination feature selection procedure was applied for selection of the most significant subset of predictor variables. The virologic response to the therapy defined as an undetectable or detectable HCV RNA level during the course of treatment was also studied using *the Generalized Estimating Equations* (GEE) for binary data, which takes account of the correlation between repeated observations of the same individual

w tygodniu w dawce 1,5  $\mu$ g/kg wraz z RBV (Rebetol®, MSD, Herdfordshire, Wielka Brytania) podawaną doustnie dwa razy dziennie w dawce dobowej dostosowanej do masy ciała pacjenta (800 mg dla <65 kg, 1000 mg dla 65-85 kg, 1200 mg dla >85kg). Rodzaj PegIFN i RBV był ustalany przez lekarza prowadzącego terapię. Planowany czas trwania terapii wynosił 48 tygodni. W przypadku opóźnionej odpowiedzi wirusologicznej był on wydłużany do 72 tygodni. Dla określenia szybkiej, wczesnej, opóźnionej i trwałej odpowiedzi wirusologicznej oraz braku odpowiedzi, nawrotu i wyłomu zastosowano standardowe definicje (5). Zasady przerywania kuracji z powodu nieskuteczności były zgodne z wytycznymi obowiązującymi w okresie, w którym je prowadzono (2,5).

### Metody

Badania biochemiczne (aktywność transaminazy alaninowej (ALT), stężenie hemoglobiny, płytek i leukocytów) oraz poziom HCV RNA wykonano u wszystkich pacjentów przed rozpoczęciem leczenia oraz w 4, 12, 24, 48 lub 72 tygodniu terapii i 24 tygodnie po jej zakończeniu. Do oceny ilościowej HCV RNA wykorzystano dwie metody: Roche COBAS TaqMan v.2.0 (minimalny próg detekcji (LLOQ) - 15 IU/mL) lub Abbott RealTime System (LLOQ - 12 IU/mL). Genotyp HCV określono przy pomocy testu INNO-LiPA HCV (Immunogenetics®, Belgia) lub Linear Array HCV Genotyping Test (LA HCV GT) firmy Roche. Przeciwciała anty-HCV wykrywano przy pomocy testu Elisa Murex HCV v.4.0. HBsAg i anty-HBc były wykrywane metodą chemoimmunoluminescencji (CLIA), firmy Biomedica (Wiedeń, Austria) na aparacie LIAISON XL firmy DiaSorin (Saluggia, Włochy). HBV DNA oceniano metodą PCR (real-time PCR) wykorzystującą zautomatyzowane aparaty do izolacji DNA (Cobas AmpliPrep) i amplifikacji uzyskanego materiału (analyzer Cobas TaqMan Roche, Amplicor HBV monitor, Roche Diagnostics, Basel, Szwajcaria). LLOQ wynosił 20 IU/ml, zakres uzyskiwanych wyników od 20 do  $1,7 \times 10^8$  IU/ml ( $1.3-8.23 \log_{10}$ ).

### Standardy etyczne

Poniższa analiza miała charakter retrospektywny, prowadzono ją zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Badanie zostało zatwierdzone przez lokalną Komisję Bioetyczną (KB/684/2016). Wszystkie dane pochodzące od chorych zostały pozbawione możliwości identyfikacji personalnej.

### Analiza statystyczna

Zbiorcza analiza statystyczna dla zmiennych ciągłych o rozkładzie normalnym została zaprezentowana jako średnia i odchylenie standardowe (SD) lub jako mediana i rozstęp dla zmiennych o rozkładzie innym niż normalny. Zmienne nominalne i skategoryzowane zaprezentowano jako częstości. Porównanie rozkładów zmiennych typu ciągłego zgodnych z rozkła-

at multiple time points. *The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis* was used to select the cut-off point of baseline HCV RNA concentration, referring to its discriminative properties in predicting the SVR achievement by a patient. A p-value < 0.05 was considered as statistically significant. The statistical analysis was performed with the use of the R-software, version 3.0.3.

## RESULTS

### Baseline patients' characteristics

112 patients fulfilled the inclusion criteria and were further analyzed. At the beginning of DT, the median age of patients was 23 years. The majority was men (55.4%) and treatment-naïve individuals (80.4%). Risk factor analysis confirmed nosocomial and health-care associated transmissions as the major routes of transmission (49.1%). The mean (SD) viral load was  $5.55\log_{10}(0.65\log_{10})$  IU/ml. Forty-one patients (36.6%) had an increased ALT activity. Mild fibrosis (F0-F2) was present in 93 subjects and 3/15 patients with advanced fibrosis (F3-F4) had compensated liver cirrhosis. In four patients liver biopsy was not performed because of contraindications or lack of patient consent forms. 54(48%) patients discontinued therapy before week 48. The most common reasons for premature discontinuation was lack of efficacy (49 patients), serious adverse events (3 patients) or withdrawal of consent (2 patients).

### Factors associated with sustained virologic response

Overall, SVR24 was achieved in 46/112(41.1%) patients treated for 48/72 weeks. It was significantly higher in treatment-naïve patients (48%) than in those treatment-experienced (14%). Null response (NR) was recognized in 27(24.1%) patients, partial response in 15(13.4%) patients, relapse in 12(10.7%) patients and breakthrough in 7(6.2%) patients. NR was observed in 10/25(40%) anti-HBc positive individuals vs 17/86(19.8%) in anti-HBc negative patients ( $p<0.005$ ). Table I presents characteristics of the patients who achieved SVR and those who failed to respond to the therapy. Gender, baseline ALT activity and PegIFN type did not demonstrate any association with the DT response, while younger age (<40 years) ( $p=0.001$ ), lower pretreatment viral load ( $\leq 2 \times 10^5$  IU/ml) ( $p=0.024$ ), less advanced fibrosis ( $F \leq 2$ ) ( $p=0.004$ ), platelet count  $>140 \times 10^9/L$  ( $p=0.044$ ), hemoglobin level within the normal range ( $p=0.040$ ) and lack of anti-HBc ( $p=0.005$ ) were associated with good response to DT. SVR rate was significantly higher in treatment-naïve patients than in those treatment-experienced (47.8% vs 13.6%;  $p=0.004$ ). Additionally, loss of weight, defined as >10% loss of baseline weight over the first 24 weeks of treatment, was associated with higher SVR rate ( $p=0.038$ ). To select

dem normalnym przeprowadzono za pomocą testu *t* lub - dla zmiennych o rozkładzie innym niż normalny - testu Wilcoxon. Sprawdzenie zależności między zmiennymi nominalnymi przeprowadzono za pomocą testu niezależności chi-kwadrat lub dokładnego testu Fishera. Do wyłonienia niezależnych czynników predykcyjnych SVR24 wykorzystano analizę regresji logistycznej. Zmienne istotne na poziomie 0,2 w modelach z jedną zmienną objaśniającą były uwzględniane w modelach z wieloma zmiennymi objaśniającymi. Procedura wstecznej eliminacji zmiennych pozwoliła na identyfikację najistotniejszych predyktorów. Odpowiedź wirusologiczna na terapię, definiowana jako wykrywalny lub niewykrywalny poziom HCV RNA w trakcie leczenia, była również analizowana przy użyciu uogólnionych równań estymujących (*Generalized Estimating Equations - GEE*), które umożliwiają uwzględnienie korelacji pomiędzy obserwacjami u tych samych osób. Analiza krzywej ROC (*Receiver Operating Characteristic - ROC*) została wykorzystana do określenia punktu odcięcia dla stężenia HCV RNA wykazującego najlepsze własności predykcyjne SVR. Różnice uznawano za statystycznie istotne, gdy  $p<0,05$ . Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą pakietu R version 3.0.3.

## WYNIKI

### Charakterystyka wyjściowa pacjentów

112 pacjentów odpowiadało kryteriom włączenia i zostało uwzględnionych w analizie. Na początku TD mediana wieku pacjentów wynosiła 23 lata. Większość stanowili mężczyźni (55,4%) i osoby nie poddawane uprzednio leczeniu przeciwwirusowemu (80,4%). Analiza potwierdziła, że kontakty szpitalne i związane ze służbą zdrowia były głównym czynnikiem ryzyka sprzyjającym transmisji zakażenia (49,1%). Średnia wiremia wyjściowa wynosiła  $5,55\log_{10}(0,65\log_{10})$  IU/ml. Czterdziestu jeden pacjentów (36,6%) miało podwyższoną aktywność ALT. Łagodne włóknienie wątroby (F0-F2) stwierdzono u 93 chorych, a 3/15 pacjentów z zaawansowanym włóknieniem (F3-F4) prezentowało marskość wątroby bez cech dekomensacji jej funkcji. U 4 chorych nie wykonywano biopsji wątroby z powodu przeciwwskazań do zabiegu lub braku zgody. U 54 (48%) chorych przerwano terapię przed 48 tygodniem. Najczęstszą przyczyną przedwczesnego ukończenia leczenia była jego nieskuteczność (49 pacjentów), poważne działania niepożądane (3 chorych) lub wycofanie zgody na leczenie (2 pacjentów).

### Czynniki związane z trwałą odpowiedzią wirusologiczną

Ogółem SVR24 osiągnęło 46/112 pacjentów (41,1%) leczonych przez 48/72 tygodnie. Odsetek ten był znacząco wyższy w grupie chorych dotychczas

a subset of independent predictors Logistic Regression Analysis was applied (Table II). Younger age and lack of therapy experience increase the odds of achieving SVR (OR=4.17(1.11-16.67) and OR=5.56(1.33-25.0), respectively), whereas higher baseline viral load and anti-HBc presence tend to decrease the probability of achieving SVR (OR=0.35(0.12-1.01) and OR=0.15(0.03-0.63), respectively). The weight loss is also associated with higher probability of the virologic response (OR=7.06(1.84-27.06)). Also, more advanced fibrosis seems to decrease the probability of SVR (OR=0.07(0-1.29),  $p=0.074$ ). Figure 1 shows the virologic response to the therapy and the proportion of patients during the therapy with undetectable HCV RNA level for factors recognized as potentially related to the DT response. For all time points considered, the virologic response rate is higher in treatment-naïve patients, in anti-HBc negative individuals, in younger patients, in patients with less advanced fibrosis and finally in individuals with lower baseline viral load. Also, loss of weight brought a better response to the therapy as compared to the figures for patients without the observed weight loss. In order to get a deeper insight into the dynamics of the virologic response and its correlation with the causing factors, the GEE model with logit link function was applied. The obtained estimates (Table II) indicate that the more advanced fibrosis, higher baseline viral load and anti-HBc presence lower the odds of HCV RNA suppression by about 85%, 50% and 60%, respectively (OR=0.15(0.06-0.36), OR=0.46(0.26-0.81) and OR=0.4(0.18-0.86)) at any time point. In contrast, lack of the previous treatment experience increases the probability of achieving the undetectable HCV RNA level (OR=2.92(1.05-8.17)). The weight loss is also associated with higher probability of the virologic response (OR=3.23(1.77-5.89)). In general, the estimates obtained from both models are in good agreement and mutually confirm the significance of factors selected as associated with SVR24. They cover the same set of covariates, though the estimates obtained by the Logistic Regression model refer to the probability of achieving SVR at the end of treatment while the GEE model estimates refer to the probability of the HCV RNA suppression at any time point during the therapy period.

## DISCUSSION

HCV genotype 4 infection is not common among native residents of Europe, especially in its northern region. Higher HCV-4 prevalence may be noted in western but mainly southern European countries (1). In our country, HCV-4 is recognized in 4.9% of HCV infected patients (1). High percentage of HCV-4 infections is demonstrated among HIV co-infected individuals (24.0%) while low in the HBV co-infected group (9). Our data confirm this as well: 18 out of 20

nieleczonych (48%) niż uprzednio poddawanych terapii (14%). Brak odpowiedzi wirusologicznej (null response - NR) rozpoznano u 27 (24,1%) pacjentów, częściową odpowiedź wirusologiczną u 15 (13,4%), nawrót u 12 (10,7%), a wyłom wirusologiczny u 7 (6,2%) chorych. NR rejestrowano u 10/25 (40%) anty-HBc pozytywnych badanych w odniesieniu do 17/86 (19,8%) chorych z grupy anty-HBc negatywnej ( $p<0,005$ ). Tabela I prezentuje charakterystykę chorych, którzy osiągnęli SVR i tych, którzy nie odpowiedzieli na terapię. Płeć, wyjściowa aktywność ALT oraz typ PegIFN nie wpływały na odsetek osiągniętych odpowiedzi na TD, podczas gdy młodszy wiek ( $<40$  r.ż.) ( $p=0,001$ ), niższa wiremia wyjściowa ( $\leq 2 \times 10^5$  IU/ml) ( $p=0,024$ ), mniej zaawansowane włóknienie ( $F \leq 2$ ) ( $p=0,004$ ), liczba płytek krwi  $>140 \times 10^9/L$  ( $p=0,044$ ), poziom hemoglobiny mieszczący się w zakresie normy ( $p=0,040$ ) oraz brak przeciwciał anty-HBc ( $p=0,005$ ) były powiązane z dobrą odpowiedzią na TD. Odsetek SVR był znacząco wyższy w grupie pacjentów niedoświadczonych wcześniejszymi terapiami, niż u uprzednio leczonych (47,8% vs 13,6%;  $p=0,004$ ). Dodatkowo utrata masy ciała, definiowana jako jej spadek o  $>10\%$  w pierwszym półroczu leczenia, w stosunku do wartości wyjściowej, była związana z wyższym odsetkiem SVR ( $p=0,038$ ). Dla wyłonienia zbioru niezależnych predyktorów odpowiedzi wirusologicznej zastosowano metodę Analizy Regresji Logistycznej (Tabela II). Młodszy wiek, brak uprzedniego leczenia zwiększały szanse na uzyskanie SVR (odpowiednio OR=0,35(0,12-1,01) i OR=0,15(0,03-0,63)). Utrata masy ciała była również związana z większym prawdopodobieństwem odpowiedzi wirusologicznej (OR=7,06(1,84-27,06)). Ponadto bardziej zaawansowane włóknienie wydawało się zmniejszać szansę na skuteczność leczenia (OR=0,07(0-1,29),  $p=0,074$ ). Rycina 1 przedstawia odpowiedź wirusologiczną na terapię i stosunek pacjentów z niewykrywalnym HCV RNA w odniesieniu do czynników identyfikowanych jako potencjalnie związane z efektywnością TD. Dla wszystkich analizowanych punktów czasowych odpowiedź wirusologiczna była wyższa w grupie chorych uprzednio nieleczonych, anty-HBc negatywnych, młodszych, z mniej zaawansowanym włóknieniem wątroby i z niższą wiremią wyjściową. Dodatkowo utrata masy ciała wpływała na lepszy współczynnik odpowiedzi w odniesieniu do danych obrazujących efektywność kuracji w grupie bez utraty masy ciała. Dla uzyskania lepszego wglądu w dynamikę odpowiedzi wirusologicznej i jej korelację z potencjalnymi czynnikami na nią wpływającymi, zastosowano model GEE z funkcją logitową. Uzyskane kalkulacje (Tabela II) wskazują, że bardziej zaawansowane włóknienie, wyższa wiremia wyjściowa i obecność przeciwciał anty-HBc obniżają szansę na supresję HCV RNA od-

Table I. Factors associated with sustained virologic response (SVR24).

Tabela I. Czynniki związane z trwałą odpowiedzią wirusologiczną (SVR24).

Factors		SVR = no	SVR = yes	p-value
		(N=66)	(N=46)	
		n (%)	n (%)	
Gender	Women	31 (62.0)	19 (38.0)	0.689
	Men	35 (56.5)	27 (43.5)	
Age (in years)		25 (18-73)*	21 (18-80)*	0.007
	< 40	39 (49.4)	40 (50.6)	0.001
	≥ 40	27 (81.8)	6 (18.2)	
Liver fibrosis	F ≤ 2	51 (54.8)	42 (45.2)	0.004
	F > 2	14 (93.3)	1 (6.7)	
Type of PegIFN-α	PegIFN-α2a	34 (63.0)	20 (37.0)	0.518
	PegIFN-α2b	32 (55.2)	26 (44.8)	
PegIFN-α dose reduction	No	45 (58.4)	32 (41.6)	1
	Yes	21 (60.0)	14 (40.0)	
PegIFN-α dose reduction due to thrombocytopenia	No	57 (55.9)	45 (44.1)	0.045
	Yes	9 (90.0)	1 (10.0)	
PegIFN-α dose reduction due to neutropenia	No	57 (58.2)	41 (41.8)	0.885
	Yes	9 (64.3)	5 (35.7)	
RBV dose reduction	No	45 (56.2)	35 (43.8)	0.485
	Yes	21 (65.6)	11 (34.4)	
Treatment experience	No	47 (52.2)	43 (47.8)	0.004
	Yes	19 (86.4)	3 (13.6)	
Anti-HBc presence**	No	44 (51.2)	42 (48.8)	0.005
	Yes	21 (84.0)	4 (16)	
HCV RNA level (IU/l)	≤ 2x 10 <sup>5</sup>	15 (42.9)	20 (57.1)	0.024
	>2x 10 <sup>5</sup>	51 (66.2)	26 (33.8)	
ALT activity	> ULN <sup>a</sup>	46 (64.8)	25 (35.2)	0.113
	normal value	20 (48.8)	21 (51.2)	
Hb level	< LLN <sup>b</sup>	7 (100)	0 (0)	0.040
	normal value	59 (56.2)	46 (43.8)	
Platelet count	< LLN <sup>c</sup>	12 (92.3)	1 (7.7)	0.044
	normal value	53 (54.1)	45 (45.9)	
Leukocyte count	< LLN <sup>d</sup>	7 (77.8)	2 (22.2)	0.304
	normal value	59 (57.3)	44 (42.7)	
ILS	No	37 (63.8)	21 (36.2)	0.338
	Yes	29 (53.7)	25 (46.3)	
Loss of body weight <sup>e</sup>	No	56 (64.4)	31 (35.6)	0.038
	Yes	10 (40.0)	15 (60.0)	

SVR, sustained virologic response; \*, median (range); PegIFN-α, pegylated interferon alpha; RBV, ribavirin; anti-HBc, antibodies to the hepatitis B core antigen; \*\*for 1 patient in group SVR = no the data referring to the anti-HBc presence is not available; ULN<sup>a</sup>, upper limit of normal (ALT activity ≥ 33U/l for women and ≥ 41U/l for men); Hb, hemoglobin; LLN<sup>b</sup>, lower limit of normal (<sup>b</sup> – for Hb of 12g/dl and 14g/dl for women and man, respectively; <sup>c</sup> – for platelets of 140x10<sup>9</sup>/L; <sup>d</sup> – for leukocytes of 4x10<sup>9</sup>/L); ILS, influenza-like symptoms; <sup>e</sup>, defined as > 10% loss of baseline body weight over the first 24 weeks of treatment

patients withdrawn from the analysis were HIV co-infected while only 2 carried also HBV. The analyzed group consisted mostly of young individuals where the most common mode of transmission was nosocomial and health-care associated contact, mainly in childhood. This stands in opposition to the studies from other countries where median age of HCV-4 infected patients was higher (45 years in France, 44 years in Greece, 39 years in Spain) and the predominant route of HCV transmission was IVD abuse (3-4, 10-13). Another factor analyzed was liver fibrosis. A low percentage of patients with advanced fibrosis (F3-F4), recognized in 13.4% of the treated individuals, is particularly striking. The proportion of patients with advanced fibrosis was higher in Spain (21%), French group (24.2%) and in Greek patients (58.4%) (3-4,10). Another newer Greek study demonstrated 11.2% of patients with liver cirrhosis (13).

powiednio o około 85%, 50% i 60% (OR=0,15(0,06-0,36), OR=0,46(0,26-0,81) i OR=0,4(0,18-0,86)) w dowolnym punkcie czasowym. Natomiast brak uprzedniego leczenia zwiększa szansę na uzyskanie niewykrywalnej wirerii (OR=2,92(1,05-8,17)). Utrata masy ciała również była związana z wyższym prawdopodobieństwem uzyskania odpowiedzi wirusologicznej (OR=2,92(1,05-8,17)). W ujęciu całościowym, szacunki uzyskane z obu modeli są zgodne i wspólnie potwierdzają znaczenie czynników wyłonionych jako związane z SVR24. Oba modele uwzględniają te same zbiory zmiennych objaśniających, jednak wyniki uzyskane z modelu regresji logistycznej odnoszą się do prawdopodobieństwa uzyskania SVR w momencie zakończenia leczenia, podczas gdy wyniki z modelu GEE odnoszą się do prawdopodobieństwa supresji HCV RNA w dowolnym punkcie terapii.

Table II. Predictive factors of SVR24 identified by Simple and Multiple Logistic Regression and by GEE analysis. OR (CI) – odds ratio with 95% confidence interval.

Tabela II. Czynniki predykcyjne SVR 24 zidentyfikowane przez zastosowanie Prostej i Złożonej Regresji Logistycznej oraz analizę GEE. OR(CI) - iloraz szans z 95% przedziałem ufności.

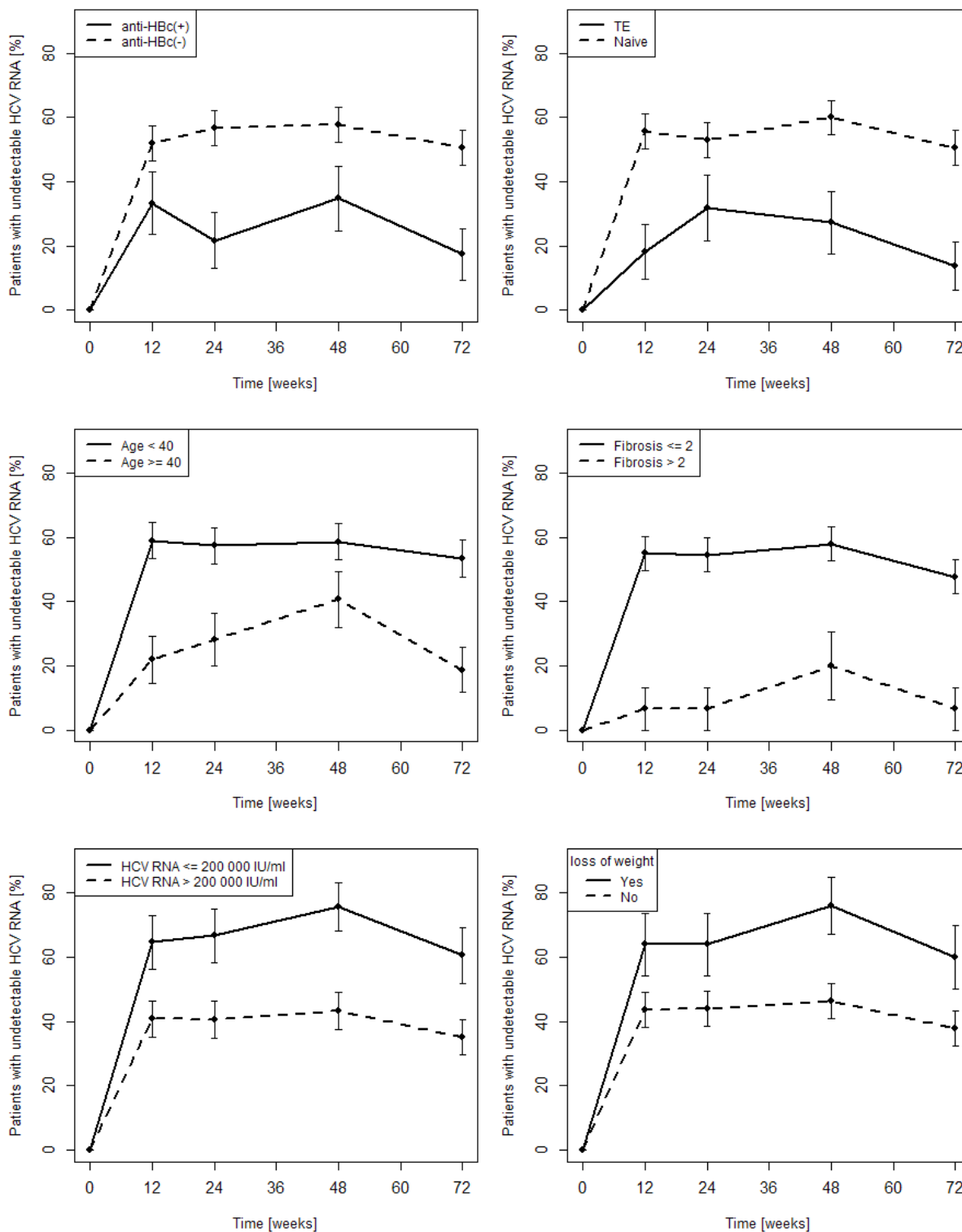
Logistic Regression model				
Covariate	Unadjusted OR (CI)	p-value	Adjusted OR (CI)	p-value
Age < 40 vs ≥ 40	4.54 (1.82 – 14.29)	0.002	4.17 (1.11 - 16.67)	0.035
Liver fibrosis F> 2 vs ≤ 2	0.17 (0.03 - 0.67)	0.026	0.07 (0 - 1.29)	0.074
ALT activity: ULN* vs normal	0.52 (0.24 - 1.13)	0.099		
Hemoglobin level < LLN vs > LLN**	0.09 (0.0 - 1.86)	0.118		
Platelet count < 140x10 <sup>9</sup> /L vs > 140x10 <sup>9</sup> /L	0.1 (0.01 - 0.78)	0.029		
PegIFN dose reduction due to thrombocytopenia	0.14 (0.02 - 1.15)	0.068		
Naïve vs TE	5.88 (1.82 – 25.0)	0.006	5.56 (1.33 – 25.0)	0.019
HCV RNA level > 2x 10 <sup>5</sup> vs ≤ 2x10 <sup>5</sup> IU/ml	0.38 (0.17 - 0.87)	0.022	0.35 (0.12 - 1.01)	0.052
Anti-HBc present vs absent	0.2 (0.06 - 0.63)	0.006	0.15 (0.03 - 0.63)	0.010
Loss of body weight	2.71 (1.09 - 6.75)	0.032	7.06 (1.84 - 27.06)	0.004
Generalized Estimating Equations model				
Covariate	OR(CI)	p-value		
Time [weeks]	1.02 (1.02 - 1.03)	<0.001		
Age < 40 vs ≥ 40	1.77 (0.86 - 3.65)	0.122		
Liver fibrosis F> 2 vs F≤ 2	0.15 (0.06 - 0.36)	<0.001		
Naïve vs TE	2.92 (1.05 - 8.17)	0.041		
HCV RNA level > 2x10 <sup>5</sup> vs ≤ 2x10 <sup>5</sup> IU/ml	0.46 (0.26 - 0.81)	0.007		
Anti-HBc present vs absent	0.4 (0.18 - 0.86)	0.019		
Loss of body weight	3.23 (1.77 - 5.89)	<0.001		

ALT, alanine aminotransferase; ULN\*, upper limit of normal (ALT activity ≥ 33U/l for women and ≥ 41U/l for men); LLN\*\*, lower limit of normal for hemoglobin of 12 and 14g/dl for women and men, respectively; TE, treatment – experienced; anti-HBc, antibodies to the hepatitis B core antigen



Fig. 1. Virologic response (percentage of patients with undetectable HCV RNA level) during treatment and the follow-up period depending on patients' characteristics. Error bars represent standard errors of proportion estimates.

Ryc. 1. Odpowiedź wirusologiczna (odsetek pacjentów z niewykrywalnym HCV RNA) podczas leczenia i kontroli po zakończonym leczeniu w zależności od czynników zależnych od chorych. Słupki błędów odzwierciedlają standardowe błędy szacowania proporcji.



Legend to Figure 1.

anti-HBc, antibodies to the hepatitis B core antigen; TE, treatment - experience; Naïve, treatment naïve; loss of weight, > 10% loss of baseline body weight over the first 24 weeks of treatment

The DT response rate in Central and Eastern European countries is poorly documented. We found the results from the two prospective studies from Austria. In the first, HCV-4 infected patients with early virologic response were randomized to 48 (12 patients) or 72 (16 patients) weeks of treatment with PegIFN- $\alpha$ 2a+RBV. SVR24 achieved 50% and 43.5% of patients, respectively (14). In another study, 26/30 patients (87%) with rapid virologic response treated for 24 weeks with PegIFN- $\alpha$ 2a+RBV achieved SVR24 (15). The limitation of these clinical trials were small HCV-4-infected patient groups. Although there is more data coming from other European countries, the number of Europeans included in the cohorts is limited. In the French group presented by *Roulot et al.*, 40.3% of patients achieved SVR24 (3). *Papastergiou et al.* received a similar result in Greek patients (43.6%) (4). This is compatible with the findings of another recent trial in Greece (37.1%) (13). By contrast, in Spain 55% of 29 patients group treated with rIFN- $\alpha$ +RBV or PegIFN- $\alpha$ 2b+RBV achieved SVR24 (10). In a more recent and larger Spanish study published in 2013, the SVR24 rate was similar (52.7%) (12). Here, the response rate was lower and only 41.1% of patients had SVR24. Interestingly, except for Spaniards, there is a similar SVR24 rate in the majority of European groups, despite the country of their origin.

Up to date, the following predictive factors of SVR24 in HCV-4-infected patients were analyzed: age, gender, ethnicity, advanced liver fibrosis, pretreatment viral load, type of PegIFN used, coexisting conditions like diabetes or insulin resistance, treatment discontinuation, *IL28B* polymorphism and HCV-4 subtype. Not all of them were addressed in our analysis because of retrospective character of the study. In the multivariable analysis, we found the following factors as independently associated with SVR: lower age, less advanced fibrosis, lower pretreatment viral load, lack of previous treatment experience, absence of anti-HBc, and loss of weight. There is no unequivocal consensus on positive predictors of SVR in HCV-4 infected patients. According to the available results of European studies, the most commonly listed is absence of advanced liver fibrosis and lack of previous history of HCV treatment (3-4,13). Our results confirm this as well. With regard to the remaining predictors such as lower age, ethnicity, low pretreatment viral load and *IL28B* polymorphism, the results are not conclusive. The studies differ in defining a young age, e.g. our group included patients <40 years of age, while for the Greek group it was <45 years of age. Also, unlike for HCV-1 infection, definitions of a low baseline viral load vary and no arbitrary standards are available. In our study it was defined as  $5.3 \log_{10}$  ( $2 \times 10^5$  IU/ml), in the French group the value was just above  $5.4 \log_{10}$  ( $3 \times 10^5$  IU/ml) while in a trial conducted in Greece  $5.6 \log_{10}$  ( $4 \times 10^5$  IU/ml) (3-4). Moreover, analyzing the baseline HCV RNA levels across Europeans infected with HCV-4, a tendency towards values lower than the literature data on HCV-1-

## DYSKUSJA

Zakażenie genotypem 4 HCV nie jest powszechne wśród rdzennych mieszkańców Europy, szczególnie zamieszkujących jej północne rejony. Wyższa prevalencja HCV-4 jest odnotowywana w zachodnich i głównie południowych krajach kontynentu (1). W Polsce infekcja HCV-4 jest rozpoznawana u 4,9% pacjentów zakażonych HCV (1). Częściej dotyczy osób współzakażonych HIV (24%), niż chorych z koinfekcją HBV (9). Nasze dane potwierdzają te obserwacje: 18 spośród 20 chorych wyłączonych z analizy było zakażonych HIV, podczas gdy zaledwie 2 HBV. Badana grupa składała się głównie z osób młodych, wśród których najpowszechniejszym modelem transmisji zakażenia były kontakty szpitalne/ze służbą zdrowia, głównie w dzieciństwie. Dane te pozostają w opozycji do tych pochodzących innych krajów, gdzie mediana wieku osób zakażonych HCV-4 była wyższa (45 lat we Francji, 44 lata w Grecji, 39 lat w Hiszpanii), a dominującą drogą transmisji dożylnie stosowanie środków psychoaktywnych (3-4, 10-13). Innym czynnikiem poddanym analizie było włóknienie wątroby. Zwraca uwagę niski odsetek pacjentów z zaawansowanym włóknieniem (F3-F4), które stwierdzono u 13,4% leczonych. Odsetek pacjentów z zaawansowanym włóknieniem był wyższy w Hiszpanii (21%), w grupie francuskiej (24,2%) oraz wśród pacjentów narodowości greckiej (58,4%) (3-4,10). Nowsze badanie greckie wykazało marskość wątroby u 11,2% leczonych (13).

Danych dotyczących odpowiedzi na TD pochodzących z Europy Centralnej i Wschodniej jest niewiele. Znaleźliśmy wyniki dwóch prospektywnych badań z Austrii. W pierwszym, pacjenci zakażeni HCV-4 z wczesną odpowiedzią wirusologiczną byli randomizowani do dwóch grup leczonych PegIFN- $\alpha$ 2a+RBV przez 48 (12 pacjentów) lub 72 tygodnie (16 pacjentów). SVR24 osiągnęło odpowiednio 50% i 43,5% pacjentów (14). W innym badaniu 26/30 pacjentów (87%) z szybką odpowiedzią wirusologiczną, leczonych przez 24 tygodnie PegIFN- $\alpha$ 2a+RBV osiągnęło SVR24 (15). Ograniczeniem tych badań były mało liczne grupy chorych zakażonych HCV-4. Mimo że dostępnych jest więcej danych z innych krajów europejskich, liczba Europejczyków włączonych do kohort jest ograniczona. W grupie francuskiej, przedstawionej przez *Roulot i wsp.*, 40,3% pacjentów osiągnęło SVR24 (3). *Papastergiou i wsp.* uzyskali podobne wyniki w grupie pacjentów greckich (43,6%) (4). Dane te są zbieżne z wynikami innego badania przeprowadzonego niedawno w Grecji (37,1%) (13). Dla kontrastu, w Hiszpanii 55% z 29 pacjentów leczonych rIFN- $\alpha$ +RBV lub PegIFN- $\alpha$ 2b+RBV osiągnęło SVR24 (10). W nowszym i większym badaniu hiszpańskim opublikowanym w 2013 roku odsetek SVR24

infected individuals may be noticed. In Spain, a mean value noted was  $5.6\log_{10}$  ( $4.1 \times 10^5$  IU/ml) and  $5.8\log_{10}$  ( $6.9 \times 10^5$  IU/ml) (10-12).

As determined in the studied population, an additional predictive factor of SVR not analyzed in the available literature was loss of body weight. Although still to be confirmed in a bigger study, this adverse event of DT may have an effect on SVR. Weight loss during therapy without a concurrent RBV dose reduction may result in blood RBV concentration increase. It was demonstrated that in patients receiving RBV at a dose  $>10.6$  mg/kg, regardless of viral genotype or its load, the response rate was significantly higher than in patients receiving RBV at a dose  $\leq 10.6$  mg/kg. Patients receiving RBV at a dose  $>13.2$  mg/kg achieved the highest SVR. Most likely we observed the same effect in the studied population. PegIFN was responsible for the weight loss but it did not have an effect on the rise in SVR. Multiple dosing of PegIFN resulted in accumulation of immunoreactive interferons in the body. However, the rise in their biological activity is only minor with no effect on the virologic response.

A separate issue analyzed was an impact of prior hepatitis B infection on the SVR24. Patients did not meet a criterion for diagnosis of occult hepatitis B virus infection (OBI). We have not examined HBV DNA in liver tissue before the start of therapy. OBI is defined as the presence of viral DNA in the liver tissue (regardless of HBV DNA detectability in serum) of individuals testing negative for serum HbsAg (16). Hence we were able to compare our results only to research used the similar criteria. *Trapero-Marugan* et al. reported presence of anti-HBc in 41% of HCV-4 Spanish patients analyzed, which was more frequent than in Egypt (1.85% - 38.3%) (10,17-18). In France, it amounts 18.7% in patients with undetectable serum HBV DNA regardless of HCV genotype (19). We found anti-HBc in 22.3% of our patients. This would be the first published result of anti-HBc prevalence in HCV-4-infected patients in Poland. Role of anti-HBc presence or OBI in treatment response in chronic HCV infected individuals is still unclear and controversial. *Emara* et al. reported that anti-HBc presence was associated with poor response to the DT in patients infected with HCV-4 (20). Also, our study suggested an association between the presence of anti-HBc and a lower virologic response rate.

Some limitations of our study result from its retrospective character. We examined HBV DNA in serum only before the start of therapy. Lack of serum HBV DNA evaluation in patients during and after the end of treatment limits the correlation assessment between prior HBV infection and HCV infection. However, our group of anti-HBc positive patients was sufficiently large and carefully selected. Moreover, we evaluated the effect of anti-HBc presence on the treatment results in HCV-4-infected individuals.

In conclusion, this is the first study presenting the DT results in Polish adult patients infected with HCV-4 and develops our understanding of HCV genotype 4

był podobny (52,7%) (12). W naszej kohorcie odpowiedzi na terapię był niższy i wynosił 41,1% pacjentów uzyskało SVR24. Interesujące jest, że z wyjątkiem Hiszpanów, obserwowany jest podobny współczynnik SVR24 w większości grup europejskich, niezależnie od kraju ich pochodzenia.

Dotychczas, zgodnie z danymi z piśmiennictwa, następujące czynniki podlegały analizie jako potencjalne czynniki predykcyjne uzyskania odpowiedzi wirusologicznej w grupie chorych zakażonych HCV-4: wiek, płeć, pochodzenie etniczne, zaawansowanie włóknienia wątroby, wyjściowy poziom wirerii, typ zastosowanego PegIFN, współistniejące schorzenia, takie jak cukrzyca czy insulinooporność, przerwanie leczenia, polimorfizm *IL28B* i podtyp HCV-4. Nie wszystkie z powyższych zmiennych mogły być wzięte pod uwagę w naszej analizie ze względu na jej retrospektywny charakter. Niemniej jednak wyłoniliśmy następujące predyktory uzyskania SVR: niższy wiek, mniej zaawansowane włóknienie, niższą wiramię wyjściową, brak uprzedniego leczenia, nieobecność przeciwciał anti-HBc i utratę masy ciała. Brak jest jednoznacznej zgody co do pozytywnych predyktorów SVR24 u pacjentów zakażonych HCV-4. Najczęściej wymienianymi w badaniach europejskich są brak zaawansowanego włóknienia i uprzednich prób leczenia przyczynowego (3-4, 13), co pokrywa się z wnioskami płynącymi z naszej pracy. W odniesieniu do pozostałych predyktorów, takich jak młodszy wiek, pochodzenie etniczne, niska wiremia wyjściowa i polimorfizm *IL28B* wyniki, nie są rozstrzygające. W różnych badaniach różnie definiowany jest młody wiek, np. w naszej grupie obejmował osoby  $<40$  roku życia, podczas gdy w grupie pacjentów greckich był to wiek  $<45$  roku życia. Również próg niskiej wirerii wyjściowej nie został arbitralnie ustalony dla pacjentów zakażonych HCV-4. W naszym badaniu zdefiniowano go na poziomie  $5,3\log_{10}$  ( $2 \times 10^5$  IU/ml), w badaniu francuskim  $5,4\log_{10}$  ( $3 \times 10^5$  IU/ml), podczas gdy w badaniu prowadzonym w Grecji  $5,6\log_{10}$  ( $4 \times 10^5$  IU/ml) (3-4). Na podstawie danych z dostępnego piśmiennictwa, analiza wyjściowego poziomu HCV RNA u Europejczyków zakażonych HCV-4 wyłania tendencję do utrzymywania się wartości niższych, niż te notowane u chorych zakażonych HCV-1. W Hiszpanii poziomy wirerii wynosiły przeciętnie odpowiednio  $5,6\log_{10}$  ( $4.1 \times 10^5$  IU/ml) (HCV-4) i  $5,8\log_{10}$  ( $6.9 \times 10^5$  IU/ml) (HCV-1) (10-12).

Dodatkowym czynnikiem predykcyjnym, ustalonym w badanej grupie, a nie analizowanym w dostępnej literaturze, była utrata masy ciała. Redukcja wagi może wpływać na prawdopodobieństwo uzyskania SVR, choć wymaga to jeszcze potwierdzenia na szerszej grupie badanej. Zmniejszenie masy ciała w trakcie terapii, bez towarzyszącej redukcji dawki RBV, pro-

infection in Europe. Also, we demonstrate differences in the demographic characteristics and severity of the condition among Polish patients and those of other European countries. SVR rate achieved in HCV-4 infected patients in our study was low. The following factors were demonstrated to be independently associated with SVR: lower age, less advanced fibrosis, lower pretreatment viral load, lack of previous treatment experience, absence of anti-HBc and body weight loss.

Therapeutic schemes have evolved from the long-lasting, immunomodulator-based treatments, associated with significant adverse events and limited efficacy (DT) into short regimens with nearly 100% efficacy and high safety profile. The latter are based on oral direct acting antivirals (DAA).

According to the Polish Group of HCV Experts (PGE HCV), the recommended treatment for HCV-4 patients is ombitasvir, paritaprevir and ritonavir with or without ribavirin (+/-RBV). Alternatively, a combination of ledipasvir and sofosbuvir (+/-RBV) or grazoprevir and elbasvir is used. Additionally, the European Association for the Study of Liver recommends therapies, currently unavailable in Poland, with sofosbuvir and velpatasvir, sofosbuvir and daclatasvir or sofosbuvir and simeprevir (22).

#### REFERENCES

1. Estes C, Blach S, et al. Global epidemiology and genotype distribution of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014;61(Suppl 1):S45–S57.
2. Khatib MA, Ferenci P, Hadziyannis SJ, et al. Management of hepatitis C virus genotype 4: recommendations of an international expert panel. *J Hepatol* 2011;54(6):1250–62.
3. Roulot D, Bourcier V, Grando V, et al. Epidemiological characteristics and response to peginterferon plus ribavirin treatment of hepatitis C virus genotype 4 infection. *J Viral Hepat* 2007;14(7):460–7.
4. Papastergiou V, Dimitroulopoulos D, Skorda L, et al. Predictors of sustained virological response in Greek and Egyptian patients with hepatitis C genotype 4: does ethnicity matter? *J Med Virol* 2012;84(8):1217–23.
5. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of Hepatitis C [editorial] *Virus Infection. J Hepatol* 2014;60(2):392–420.
6. EASL Recommendation on Treatment of Hepatitis C [editorial] 2014. *J Hepatol* 2014;61(2):373–95.
7. EASL Recommendation on Treatment of Hepatitis C [editorial] 2015. *J Hepatol* 2015;63(1):199–236.
8. Doss W, Esmat G, El-Sefary M, et al. Real-life results of sofosbuvir based therapy for Egyptian patients with hepatitis C and advanced fibrosis-cirrhosis. *J Hepatol* 2016;64(Suppl 2):S772.
- 9.

wadzi do wzrostu stężenia RBV w surowicy. Wykazano, że w grupie chorych otrzymujących RBV w dawce >10,6 mg/kg, bez względu na genotyp lub ładunek wirusa, odpowiedź na leczenie była znacząco lepsza, niż u pacjentów otrzymujących RBV w dawce ≤10,6 mg/kg. Chorzy leczeni RBV w dawce >13,2 mg/kg osiągnęli najwyższy odsetek SVR. Prawdopodobnie podobny efekt obserwowano w naszej grupie badanej. PegIFN był odpowiedzialny za utratę masy ciała, ale nie wpływał na wzrost odsetka SVR. Wielokrotna podaż PegIFN skutkowałą co prawda kumulacją immunomodulującego działania interferonu, jakkolwiek wzrost jego aktywności biologicznej ma znaczenie drugorzędne, bez wpływu na odpowiedź wirusologiczną.

Odrębnym zagadnieniem poddanym analizie, był wpływ przebytej infekcji HBV na SVR24. Utajona infekcja HBV (OBI) definiowana jest jako obecność wirusowego DNA w tkance wątrobowej (niezależnie od detekcji wirerii w surowicy krwi obwodowej) u pacjentów z niewykrywalnym HBsAg (16). Chorzy nie spełniali kryteriów rozpoznania OBI, przed rozpoczęciem terapii nie dokonywano bowiem oznaczeń wirusowego DNA w tkance wątrobowej. Z powyższych względów nasze wyniki musieliśmy porównać do prac, w których posłużono się podobnymi kryteriami. *Trapero-Marugan* i wsp. wykazali obecność anti-HBc u 41% hiszpańskich pacjentów zakażonych HCV-4, co było znacząco wyższym odsetkiem niż notowany w Egipcie (1,85%–38,3%) (10,17–18). We Francji odsetek ten wynosił 18,7% u chorych z niewykrywalnym HBV DNA niezależnie od genotypu HCV (19). W naszej grupie badanej anti-HBc wykryto u 22,3% pacjentów. Jest to pierwsze opublikowane doniesienie o prewalencji przeciwciał anti-HBc u chorych zakażonych HCV-4 w Polsce. Znaczenie obecności anti-HBc lub OBI w odpowiedzi na leczenie przewlekłego zakażenia HCV pozostaje nadal niejasne i kontrowersyjne. *Emara* i wsp. donosili, że obecność anti-HBc jest związana ze słabszą odpowiedzią na TD u pacjentów zakażonych HCV-4 (20). Również wyniki naszej pracy sugerują związek pomiędzy obecnością przeciwciał anti-HBc a niższym odsetkiem odpowiedzi wirusologicznej.

Nasze badanie ma pewne ograniczenia wynikające z jego retrospektywnego charakteru. HBV DNA było oznaczane wyłącznie przed rozpoczęciem leczenia. Brak oceny HBV DNA u chorych w trakcie prowadzonej terapii i po jej zakończeniu limituje możliwość oceny związku pomiędzy przebytą infekcją HBV a infekcją HCV. Niemniej jednak grupa chorych z obecnymi przeciwciałami anti-HBc była wystarczająco duża i uważnie dobrana. Co więcej, oceniliśmy wpływ obecności przeciwciał anti-HBc na wyniki leczenia w szczególnej grupie chorych z infekcją HCV-4.

10. Panasiuk A, Flisiak R, Mozer-Lisewska I, et al. Distribution of HCV genotypes in Poland. *Przegl Epidemiol* 2013;67(1):11-6,99-103.
11. Trapero-Marugan M, Moreno-Montegudo JA, Garcia-Buey L, et al. Clinical and pathological characteristics and response to combination therapy of genotype 4 chronic hepatitis C patients: experience from a Spanish center. *J Chemother* 2007;19(4):423-7.
12. Buti M, Franco A, Carmona I, Sánchez-Ruano JJ, et al. Profiles and clinical management of hepatitis C patients in Spain: disHCover study. *Rev Esp Quimioter* 2015;28(3):145-53.
13. Urquijo JJ, Diago M, Boadas J, et al. Safety and efficacy of treatment with pegylated interferon alpha-2a with ribavirin in chronic hepatitis C genotype 4. *Ann Hepatol* 2013;12(1):30-5.
14. Anagnostou O, Manolakopoulos S, Bakoyannis G, et al. Genotype 4 HCV infection is difficult to cure with pegylated interferon and ribavirin. Results from a Greek Nationwide Cohort Study. *Hippokratia* 2014;18(1):57-64.
15. Ferenci P, Laferl H, Scherzer TM, et al. Peginterferon alfa-2a/ribavirin for 48 or 72 weeks in hepatitis C genotypes 1 and 4 patients with slow virologic response. *Gastroenterology* 2010;138(2):503-12.
16. Ferenci P, Laferl H, Scherzer TM, et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 24 weeks in hepatitis C type 1 and 4 patients with rapid virological response. *Gastroenterology* 2008;135(2):451-8.
17. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2008;49(4):652-7.
18. Kishk R, Atta HA, Ragheb M, et al. Genotype characterization of occult hepatitis B virus strains among Egyptian chronic hepatitis C patients. *East Mediterr Health J* 2014;20(3):130-8.
19. Selim HS, Abou-Donia HA, Taha HA, et al. Role of occult hepatitis B virus in chronic hepatitis C patients with flare of liver enzyme. *Eur J Intern Med* 2011;22(2):187-90.
20. Mrani S, Chemin I, Menouar K, et al. Occult HBV infection may represent a major risk factor of nonresponse to antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2007;79(8):1075-81.
21. Emara MH, El-Gammal NE, Mohamed LA, et al. Occult hepatitis B infection in Egyptian chronic hepatitis C patients: prevalence, impact on pegylated interferon/ribavirin therapy. *Virology* 2010;7:324. doi:10.1186/1743-422X-7-324.
22. Halota W, Flisiak R, et al. Rekomendacje leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C Polskiej Grupy Ekspertów HCV - 2016. [http://www.pteilchz.org.pl/data/standardy/rekomendacje\\_2016.pdf](http://www.pteilchz.org.pl/data/standardy/rekomendacje_2016.pdf)
23. EASL Recommendation on Treatment of Hepatitis C 2016 [editorial]. *J Hepatol* 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.001>.

Reasumując, powyższe badanie jest pierwszą pracą oceniającą wyniki leczenia TD w grupie polskich dorosłych pacjentów zakażonych HCV-4 i stanowi ważny element w rozwoju wiedzy na temat zakażenia HCV-4 w Europie. Dodatkowo prezentuje różnice w charakterystyce demograficznej i zaawansowaniu choroby u polskich pacjentów i tych pochodzących z innych krajów europejskich. Odsetek SVR osiągnięty przez chorych przedstawionych w naszym badaniu był niski. Następujące czynniki w sposób obiektywny i niezależny były związane z SVR24: młodszy wiek, mniej zaawansowane włóknienie, niższa wiremia wyjściowa, brak uprzedniego leczenia przeciwwirusowego, brak przeciwciał anti-HBc oraz utrata masy ciała w czasie prowadzonego leczenia.

Schematy terapeutyczne ewoluowały od długotrwałych, opartych na substancjach immunomodulujących, obciążonych istotnymi działaniami niepożądanymi i ograniczoną skutecznością (TD) do krótkich, cechujących się prawie 100-procentową skutecznością i wysokim bezpieczeństwem. Podstawą tych ostatnich są doustne leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (*Direct Acting Antivirals* - DAA).

Zgodnie z rekomendacjami Polskiej Grupy Ekspertów HCV (PGE HCV) dla pacjentów zakażonych genotypem 4 HCV zalecane są terapie ombitaswirem, parytaprewirem i rytonawirem z lub bez rybawiryny (+/-RBV). Alternatywna kuracja obejmuje zastosowanie ledipaswiru z sofosbuwirem +/-RBV lub grazoprewiru z elbaswirem +/-RBV (21). Europejskie Towarzystwo Badań nad Wątrobą (*European Association for the Study of Liver*) dodatkowo zaleca, aktualnie niedostępne w Polsce, terapie sofosbuwirem i velpataswirem, sofosbuwirem i daklataswirem lub sofosbuwirem i simeprewirem (22).

Received: 8.03.2017 r.

Accepted for publication: 23.05.2016

Otrzymano: 8.03.2017 r.

Zaakceptowano do publikacji: 23.05.2017 r.

#### Author for correspondence:

#### Autor do korespondencji:

Dorota Kozielowicz

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii

ul. Św. Floriana 12, 85-030 Bydgoszcz, Polska  
telefon/fax: +48 52 3255605

e-mail: d.kozielowicz@wsoz.pl



**PROJEKT KIK/35**

**„ZAPOBIEGANIE ZAKAŻENIOM HCV”  
JAKO PRZYKŁAD ZINTEGROWANYCH  
DZIAŁAŃ W ZDROWIU PUBLICZNYM  
NA RZECZ OGRANICZENIA  
ZAKAŻEŃ KRWIPOCHODNYCH  
W POLSCE**

Praca zbiorowa pod redakcją:

Prof. dr hab. Mirosław J. Wysocki

Prof. dr hab. Andrzej Zieliński

Dr hab. Rafał Gierczyński

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego  
- Państwowy Zakład Higieny

Warszawa 2017