

Д-р Димитър Страшимиров,

проф. Татяна Червенякова

СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ ЕАД, София

Специализирани изследвания при острите вирусни хепатити

Резюме

Острите вирусни хепатити са глобален проблем както в развитите, така и в развиващите се страни. Диагнозата на острите вирусни хепатити е комплексна и се базира, на първо място, на щателно снетата анамнеза и обективно изследване и се потвърждава от лабораторни изследвания. Характерната лабораторна находка включва откриването на завишени функционални чернодробни проби. Оттук нататък диагностичният подход включва установяване на вида на вирусния хепатит, което се базира на серологични изследвания. Молекулярни изследвания намират приложение при вирусните хепатити В и С. Засега те не са рутинна процедура, но напоследък намират широко приложение.

Ключови думи: остър вирусен хепатит, серологични изследвания, молекулярни изследвания

Острите вирусни хепатити са глобален проблем както в развитите, така и в развиващите се страни. Водещите причинители са петте хепатотропни вируса А, В, С, D, Е (90–95%). Редица други вируси, които могат да предизвикат засягане на черния дроб в хода на мултисимптомно заболяване, основно EBV, HSV, CMV, HIV, rubella, PV В19, арбо- и робовируси^{1, 2, 4}.

Диагнозата на острите вирусни хепатити е комплексна и се базира, на първо място, на щателно снетата анамнеза и обективно изследване и се потвърждава от лабораторни изследвания. Пациентите се разпитват за рискови фактори: кръвни манипулации, венозна употреба на наркотични вещества, близък контакт с болни от остри заразни заболявания. От значение са вредните навици, придружаващите заболявания, рискови фактори от страна на социалната и работната среда, пътувания в чужбина. В болшинството от случаите (60–80%) хепатитите протичат аниктерично.

При иктеричен ход се различават симптоми на предиктерния и иктерния стадий на заболяването. Обикновено пациентите описват характерен предиктерен период с продължителност 3, 5, 7 до 10 и повече дни с водещи оплаквания: адинамия, анорексия, гадене, пов-

Specialized Tests In Viral Hepatitis

Dimitar Strashimirov, Tatyana Tcherveniakova

Specialized Hospital for Infectious and Parasitic Diseases „Prof. Ivan Kirov“, Sofia

Abstract

Acute viral hepatitis is a global health problem in the developing and developed countries as well. Diagnosis of viral hepatitis is complex and is based on anamnesis, physical examination and laboratory tests as well. The characteristic laboratory finding includes detection of elevated liver enzymes (ALT). The confirmation of the type of hepatitis is based on serologic tests. Molecular tests are performed in viral hepatitis B and C. Although they are not a routine procedure they play an increasing role in the diagnostic process.

Key words: acute viral hepatitis, serologic tests, molecular tests

ръщане, тежест в епигатриума и гясното подгребрие, ставно-мускулни болки. След това те закономерно забелязват потъмняване на урината, пожълтяване на склери и кожа. Обективно е налице хепатомегалия, черният дроб е с мекоеластична консистенция, гладка повърхност, заоблен ръб, чувствителен при палпация;

При аниктеричния ход на фона на характерни оплаквания (адинамия, анорексия и др.) се стига до провеждане на лабораторни изследвания. Характерната лабораторна находка включва откриването на завишени функционални чернодробни проби (ALT – 5–10 пъти и повече над нормата). Оттук нататък диагностичният подход включва установяване на вида на вирусния хепатит, което се базира на серологични изследвания (серологичен профил)⁵.

Остър вирусен хепатит А. Съществуват три серологични маркера: anti-HAV IgM, anti-HAV IgG, anti-HAV total. Изследват се посредством ELISA китове. Изследването на екскрецията на вирусни частици в изпражненията засега не е рутинна процедура. HAV се отделя в изпражненията 14 дни преди до 7 дни след началото на клиничните оплаквания. **Основният диагностичен маркер, поставящ диагноза остър вирусен хепатит А, е го-**

казването на anti-HAV IgM в серума на пациентите. Те са налични във времето на поява на клиничните оплаквания, когато обикновено е и пикът на стойностите на ALT (фиг. 1)^{1, 6}.

Остър вирусен хепатит В. Основните тестове тук са:

Серологични: изследване на наличието на антигени (HBsAg, HBeAg) и антитела (anti-HBs, anti-HBcIgM и IgG, anti-HBe). Те се изследват посредством четвъртогенерационни ELISA китове.

Молекулярни: количествено определяне на HBV DNA (посредством real-time PCR), генотипиране на HBV (INNO LiPA HBV DNA Genotyping assay), изследване на лекарствена резистентност на HBV.

Серологични маркери

HBsAg: открива се при пациенти, които са инфектирани с вируса. Доказват се посредством ELISA китове – чувствителност около 0.15 ng/ml и специфичност 99.5%. Anti-HBs показва имунитет към HBV (преболедуване, имунизация) и защитава от заболяване. Протективното ниво е >10 IU/ml.

Anti-HBc. Anti-HBc IgM се позитивират при остра HBV инфекция и са основният маркер, поставящ диагнозата остър хепатит В. Могат обаче да са налице и при реактивация на хронична HBV инфекция. Anti-HBc Total показват минала или активна инфекция, присъстват, когато пациентът е имунен или хроничен носител. Специфичност на ELISA тестовете – около 98.8–98.9%. Няма антигенен тест за доказване на HBcAg.

HBeAg. Маркер с високоактивна вирусна репликация. Показва, че пациентът е високо заразен. Служи за селекция на пациентите с хронична HBV инфекция при започване на терапия. Anti-HBe са показател за оздравяване от инфекцията. Появата им в хода на остър хепатит В маркира началото на оздравителния процес, който по правило се характеризира със спад на трансаминазите и последващо негативизиране на HBsAg. В случаите

на хронична HBV инфекция anti-HBe сероконверсията е маркер за преминаване в нискорепликативна фаза. Такава спонтанна сероконверсия се наблюдава в 10–20% от пациентите годишно.

Времето на поява на различните антигени и антитела при остра инфекция със самоограничаващ се ход е показано на фиг. 2^{2, 12}.

На таблица 1 са посочени серологичните характеристики на HBV инфекцията.

Някои особености при серологичните маркери

✦ Персистирането на HBsAg след 6 месеца от началото на инфекцията показва хронификация на хепатита.

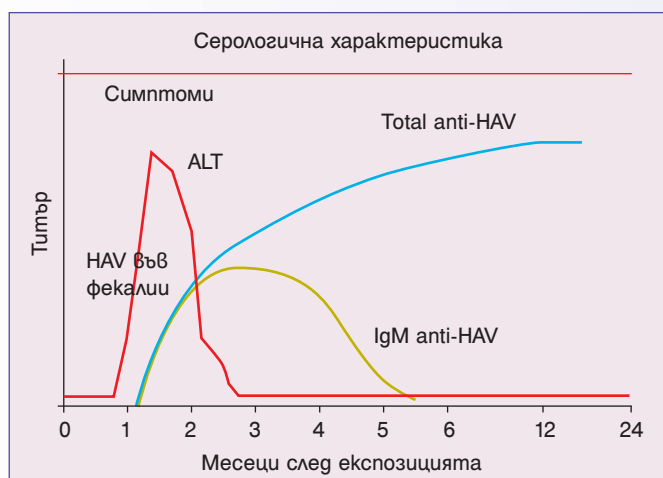
✦ HBsAg и anti-HBs могат да се откриват едновременно при до 25% от хроничните носители, вероятно поради мутации в „а“ детерминантата на S гена.

✦ Anti-HBc IgM могат да персistirат в ниски титри до 2 години в 20%. Хроничните носители също могат да имат ниски титри, които да се покачват по време на екзацербациите.

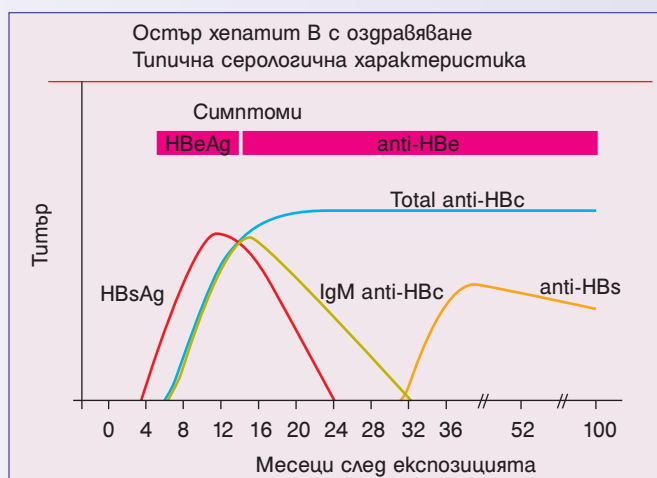
✦ Т.нар. prescore – мутанти. Те са следствие на мутации в prescore или core promotor регионите, които блокират или намаляват продукцията на HBeAg. Те понякога водят до фулминантен ход с лоша прогноза. В случаите с хронификация HBeAg (-) хроничен хепатит е по-труден за лечение^{12, 13}.

Изолирана детекция на anti-HBcIgM. Може да се наблюдава в прозоречния период между HBsAg и anti-HBs сероконверсията, при ниска продукция на HBsAg в неуловими със съвременните китове за детекция стойности, при фулминантен хепатит с хепатална кома вследствие на изчезване на HBsAg от серума, фалшиво положителен резултат^{2, 11, 13}.

Остър вирусен хепатит С. Хепатит С вирусната инфекция относително рядко се представя с клинически проявена остра фаза – около 15–20% от случаите. Иктеричен ход се наблюдава в 20% от симптоматичните инфекции. При болшинството от случаите липсва сим-



Фиг. 1. Серологична характеристика на HAV инфекцията



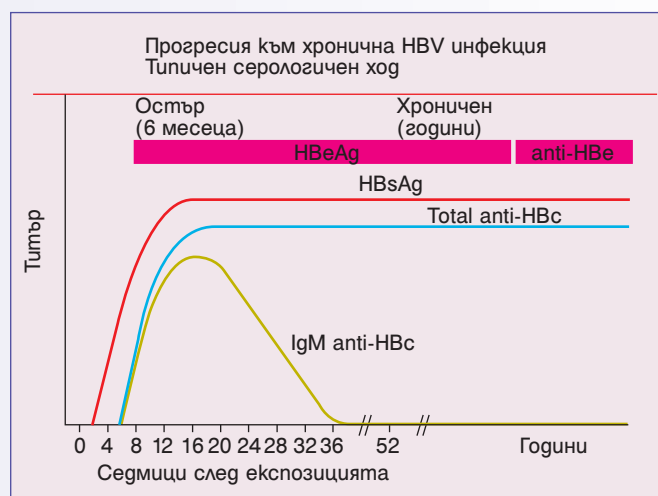
Фиг. 2. Типична серологична характеристика на острата HBV инфекция с оздравяване

Тест	Остър хепатит В	Имунитет след преболеване	Имунитет след ваксинация	Хроничен хепатит В	НВeAg (-) Хроничен хепатит В	Здраво носителство
HBsAg	+	-	+	+	+	+
Anti-HBs	-	+	-	-	-	-
HBeAg	+	-	-	-	-	-
Anti-HBe	-	+/-	-	-	+	+
Anti-HBcIgM	+	-	-	-	-	-
HBV DNA	+	-	-	+	+	-
ALT	↑	норма	норма	↑	↑	норма

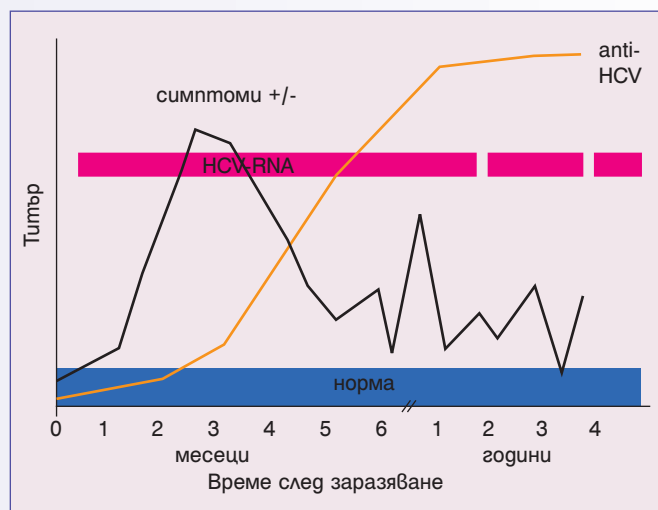
Табл. 1. Серологични характеристики на HBV инфекцията

птоматика за период от няколко десетилетия (20–30) години. Откриването на антитела срещу HCV (anti-HCV) е основен метод, претърпял съществен прогрес по отношение на чувствителност и специфичност в годините след откриването на вируса, като съществено беше съкратен (до 35–50 дни) прозоречният период между началото на инфекцията и откриването на anti-HCV антителата. Детекцията се извършва основно с четвъртогенерационни ELISA китове. Липсата на специфичен маркер за ранната фаза на HCV инфекцията, подобен на този при HBV, съществено затруднява нейното точно определяне. Наличието на HCV РНК при липса на anti-HCV при имунокомпетентни лица за период от един до два месеца с последваща поява на антитела е най-съществената параклинична характеристика на острата HCV инфекция. Проследяване на сероконверсията на anti-HCV антителата за период от 2–3 месеца също е характеристика на остра HCV инфекция, особено при наличие на анамнестични данни за рисков фактори за това заболяване. Изчезването на HCV РНК скоро след първоначалната инфекция (2–3 месеца) е основен индикатор за оздравяване, като антителата срещу вируса остават все още във високи титри. Наличието на вирусна РНК за период, по-голям от шест месеца, най-често без клинична симптоматика, показва преминаването към хронична фаза на инфекцията (фиг. 4)^{4, 8}.

Остър HDV (гелта) хепатит. При острата хепатит D вирусна инфекция най-широко приложение има откриването на anti-HDV антитела в серума на инфектираното лице. Използват се ELISA китове. Представлява дефектен вирус, изискващ наличието на HBV. Може да се предава под формата на коинфекция (HDV+HBV) или суперинфекция върху хроничен хепатит В. Детекцията се базира на ELISA методики. Антителата от клас IgM не са строго специфични за острата фаза, затова маркерът за ранна HBV инфекция (anti-HBc-IgM) в случаите на коинфекция или суперинфекция дава информация и за фазата на HDV инфекция. Наличието на anti-HDV от класа IgG се откриват малко по-късно (до две седмици) след маркерите за остра HBV инфекция, като при оздравяване тези антитела намаляват и в някои случаи могат да изчезнат напълно. Хепатит D антигенът (HDAg) също може да бъде открит в серума на болния, като неговото наличие не е задължително. За-



Фиг. 3. Типична серологична характеристика при прогресия към хронична HBV инфекция (протрахиран ход)



Фиг. 4. Серологичен профил при HCV инфекция с хронифициране

разяване с HDV на фона на съществуващ хроничен хепатит тип В (суперинфекция) в почти всички случаи води и до хронична HDV инфекция. HDV инфекция следва да се предполага при всички случаи на внезапно обостряне на хронична HBV инфекция и при тежко протичане на остра HBV инфекция с фулминантен ход^{7, 10}.

Хепатит Е вирусната инфекция е рядко срещана в България, като в основата на нейната лаборатор-

на диагностика стои откриването на индиректните специфични маркери – антитела от класовете IgM, IgG (anti-HEV-IgM и anti-HAV-IgG). Клинически тя е трудно различима от другите остри заболявания, причинени от хепатотропни вируси, и може да помогне да изключим или потвърдим наличието на инфекция.^{9, 14.}

Молекулярни изследвания при вирусните хепатити

Намират приложение при вирусните хепатити В и С. Засега не са рутинна процедура, но напоследък намират широко приложение.

Остър хепатит В. Основното изследване тук е количественото определяне на HBV DNA. Тя се открива в началото на симптоматичната фаза и впоследствие следва изключително бърз спад, като това маркира нормализирането на ALT и негативирането на HBsAg. Напротив, персистирането на HBV DNA в сравнително високи стойности (над 10 000 000 копия) на третия месец от началото на симптоматичната фаза показва тенденция за хронифициране на заболяването^{11, 12, 13.}

В литературата лечението с противовирусни средства на острата HBV инфекция е спорен въпрос. Някои автори твърдят, че тъй като инфекцията е самоограничаваща се, приложението е безсмислено, нещо повече, при приложението на медикаменти с ниска генетична бариера на резистентност (Ламивудин) това може да доведе до селектиране на мутантни варианти на вируса с протрахиране на инфекцията и последваща хронификация. Други автори посочват обаче, че при

определени индикации (затезгнато протичане, заплашваща чернодробна недостатъчност – енцефалопатия и коагулопатия, висока репликация) приложението не само че не е противопоказано, а напротив, е препоръчително, особено при медикаменти с висок праг на генетична резистентност (Entecavir). Приложение – краткосрочно: 3 – 6 месеца. Редица автори посочват, че при приложението стойностите на трансаминазите и билирубина се нормализират бързо (в рамките на 4–8 седмици), HBV DNA спада до неоткриваеми стойности и това обикновено се последва от негативиране на HBsAg. Така това изследване се използва за мониториране на лечението^{12, 13.} Основните методи за определяне на HBV DNA са представени на таблица 2.

Основната използвана методика е Cobas Amplicor Monitor (Roche).

Генотипиране на HBV. При острите хепатити се използва основно с научна цел. Основната използвана методика е INNO LiPA HBV DNA Genotyping Assay^{2, 12.}

Остра HCV инфекция. Определяне на HCV RNA. HCV RNA се открива 2–14 дни след експозицията и дава възможност за поставяне на диагнозата в т.нар. прозоречен период на инфекцията, когато anti-HCV са отрицателни^{5.}

При обмисляне на лечение на заболяването

Лечението се прилага на пациенти със симптоматична форма на ОБХ С (иктерична, аниктерична, субклинична), при които предпологаемото начало на инфекцията е ясно. Обикновено това са хора, които се

Тест	Чувствителност (pg/ml)*	Лимит на детекция (копия/ml)*	Линеарност (копия/ml)	Коефициент на вариация
Versant bDNA v3.0 (Siemens)	2.1	2 x 10 ³	2 x 10 ³ to 1 x 10 ⁸	15–37%
Hybrid Capture II (Digene)	0.02 to 0.5	5 x 10 ³	5 x 10 ³ to 6 x 10 ⁷	10–15%
Liquid Hybridization (Abbott)	1.6	6 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵ to 1 x 10 ¹⁰	12–22%
Cobas Amplicor Monitor (Roche)	0.001	2 x 10 ²	2 x 10 ² to 2 x 10 ⁵	14–44%
Cobas Taqman (Roche)		35 (Мануален) 70 (Автоматичен)	2 x 10 ² to 1 x 10 ¹⁰	16–54%
RealArt HBV PCR (artus/Qiagen)		10	1 to 4 x 10 ⁸	

Табл. 2. Основни методи за определяне на HBV DNA
1 IU/ml = 2.4 копия/ml; bDNA: 1 IU/ml = 5.2 копия/ml

Тест	Метод	Праг на детекция* (IU/ml) ^a	Линеарност (IU/ml)
Versant Qualitative (Siemens)	TMA	5–10	NA
Amplicor Qualitative v2.0 (Roche)	RT-PCR	50	NA
Amplicor Monitor v2.0 (Roche)	RT-PCR	600	600–800 000
Cobas Taqman (Roche)	RT-PCR	15	15–1 x 10 ⁸
Abbott RealTime (Abbott)	RT-PCR	12–30	10–1 x 10 ⁷
Versant Quantitative v3.0 (Siemens)	bDNA	615	615–7 700 000

Табл. 3. Основни методи
1 IU/ml = 2.4 копия/ml, bDNA: 1 IU/ml = 5.2 копия/ml

обръщат към лекар и поставянето на диагнозата е своевременно, лица, които имат единични венозни приложения на наркотик (но не са венозни наркомани) през последните 6–8 месеца от установяването на клинични данни за остър вирусен хепатит, на възраст под 55 години, коинфекция с HBV, здравно осигурени. Лечението започва до осмата седмица от началото на симптоматичната инфекция (след овладяване на масивната некроза с обикновен интерферон-алфа) (Roferon, Intron A). Болните трябва да са със стойности на билирубина в референтни граници, ALT от 2–3 до 5 пъти над горната граница (но не повече от 6 пъти над нормата) и положителна HCV РНК, доказана чрез PCR. Схемата на лечение е обикновен интерферон-алфа (Roferon, Intron A) 3 МЕ s.c. ежедневно за един месец, след което 3 МЕ три пъти седмично три месеца; курс на лечение – 4 месеца (според някои автори 3 МЕ през ден още 5 месеца). Те-

рапията води до относително висок процент на траен вирусологичен отговор (SVR – 64.3%)⁵. Основните методи са показани на таблица 3.

Генотипиране на HCV. Рядко се използва при острата HCV инфекция, основно с научна цел.

Инструментални изследвания при острите хепатити

Използват се в диференциално-диагностичен аспект, основно с цел разграничаване между остър хепатит и механичен иктер. Основното използвано изследване е абдоминалната ехография. Визуализират се размерът и консистенцията на черния дроб и слезката, жлъчният мехур и жлъчните пътища с оглед на наличието на реактивен холецистит или жлъчнокаменна болест, V. Portae – при портална хипертензия, наличие на свободно-подвижна течност^{1, 5, 8, 11}.

Литература

- Bell BP, Kruszon-Moran D, Shapiro CN, et al. Hepatitis A virus infection in the United States: serologic results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Vaccine*. 2005;23:5793-5806.
- Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(1):16-23.
- Li TC, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1958-1960.
- McHutchinson JG, Person JL, Govindarajan S, et al. Improved detection of hepatitis C virus antibodies in high-risk populations. *Hepatology*. 1992;15:19-25.
- Mosley JW, Operskalski EA, Tobler LH, et al. Viral and host factors in early hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2005;42:86-92.
- Nainan OV, Xia G, Vaughan G, et al. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:63-79.
- Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Hepatitis delta virus as a global health problem. *Vaccine*. 1990;8:10-14; discussion 21-23.
- Sulkowski MS, Ray SC, Thomas DL. Needlestick transmission of hepatitis C. *JAMA*. 2002;287:2406-2413.
- Shrestha MP, McNair Scott R, Joshi DM, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*. 2007;356:895-903.
- Taylor J. Replication of human hepatitis delta virus: recent developments. *Trends Microbiol*. 2003;11(4):185-190.
- Tillmann HL, Hadem J, Leifeld L, et al. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. *J Viral Hepat*. 2006;13:256-263.
- Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology*. 2007;133(3):843-852.
- Wai CT, Fontana RJ, Polson J, et al. Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States. *J Viral Hepat*. 2005;12(2):192-198.
- Wang YC, Zhang HY, Xia NS, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol*. 2002;67:516-521.