

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika Nefrologii

Barbara Tabor

**Przeciwciała anti-HCV i anti-HGV a obecność
RNA tych wirusów u chorych dializowanych**

Praca doktorska*

Promotor:

Prof. dr hab. med. Władysław Sułowicz

Kraków 2004 r

**Praca wykonana w ramach grantu promotorskiego KBN 1414/PO5/2000/19*

**Serdecznie dziękuję
Panu Prof. dr hab. med.
Władysławowi Sułowiczowi
za okazaną pomoc i życzliwość
przy realizacji niniejszej pracy.**

Spis treści

1. Wstęp.....	4
---------------	---

1.1	Wprowadzenie.....	4
1.2	Wirusowe zapalenie wątroby typu C (HCV).....	6
1.2.1	Taksonomia i budowa HCV.....	6
1.2.2	Czynniki ryzyka i sposób przenoszenia.....	9
1.2.3	Przebieg zakażenia.....	12
1.2.4	Testy diagnostyczne.....	15
1.2.5	Leczenie zakażeń HCV.....	22
1.2.6	Leczenie zakażeń u chorych dializowanych.....	32
1.2.7	Perspektywy zwalczania HCV.....	33
1.3	Wirusowe zapalenie wątroby typu G (HGV).....	35
2.	Cele pracy.....	39
3.	Materiał i metodyka.....	40
4.	Wyniki.....	49
5.	Dyskusja.....	89
6.	Wnioski.....	104
7.	Piśmiennictwo.....	105
8.	Streszczenie.....	117

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Wirusowe zapalenia wątroby (wzw) wywołane zakażeniami wirusami typu B (HBV) i typu C (HCV) w Polsce są szeroko rozpowszechnione. Można bezsprzecznie stwierdzić, że chorzy leczeni dializami, a szczególnie hemodializami są grupą wysokiego ryzyka zakażeniem wirusami hepatotropowymi. Od 1997 roku, dzięki systematycznym szczepieniom, wśród chorych dializowanych obserwuje się stopniowy spadek liczby nowych zachorowań na wzw typu B oraz liczby osób z antygenem HBs. Obecnie znacznie poważniejszym problemem w stacjach dializ jest zakażenie HCV [11, 24, 36, 47, 126, 127, 128]. Dodatkowym, nieprzebadanym dostatecznie problemem wśród chorych dializowanych jest wykryty kolejny wirus zapalenia wątroby nazwany wirusem G (HGV), którego częstość występowania jak również i następstwa kliniczne zakażenia nie są dostatecznie poznane [8, 42, 46, 49, 51, 52]. Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu A (HAV), które szerzy się głównie drogą fekalno-oralną nie stanowi problemu w ośrodkach dializ. Należy jednak pamiętać, że pacjenci poza czasem leczenia nerkozastępczego prowadzą normalne życie i są tak samo narażeni na zakażenie HAV jak każdy zdrowy człowiek.

Podobnie jak wirus HGV, nowym mało przebadanym problemem w populacji chorych dializowanych jest także wirus TT zapalenia wątroby (TTV) [74, 93, 118].

Uszkodzenie wątroby należy do częstych powikłań u chorych leczonych powtarzanymi dializami i po przeszczepieniu nerki. Może być ono wywołane przez zakażenia wirusami hepatotropowymi jak również przez środki i leki hepatotoksyczne, nadmierne gromadzenie żelaza, nadużywanie alkoholu lub choroby naciekające wątrobę jak pierwotne nowotwory lub przerzuty. Główną przyczyną przewlekłej hepatopatii są jednak zakażenia wirusami wątroby typu B (HBV) i C (HCV). Choroby infekcyjne wątroby są znaczącą przyczyną zachorowalności i śmiertelności u pacjentów leczonych nerkozastępczo [24, 89]. Upośledzenie odpowiedzi immunologicznej zarówno komórkowej jak i humoralnej związane z przewlekłą mocznicą w okresie dializoterapii, a także u chorych

leczonych immunosupresyjnie, po transplantacji nerki zmienia przebieg infekcji wirusowych w porównaniu z populacją ogólną. Często nie dochodzi do eliminacji wirusa z organizmu, a klinicznie skąpoobjawowe zakażenie przechodzi w postać przewlekłą. Nietypowy przebieg infekcji stanowi często trudny problem diagnostyczny jak i terapeutyczny [68, 97].

W ostatnim dziesięcioleciu podjęto wiele działań mających na celu zapobieżenie szerzenia się zakażeń wirusami hepatotropowymi wśród osób przewlekle dializowanych. Najważniejsze z nich to:

- wprowadzenie regularnych szczepień przeciw wzv typu B, (pozwoliło to w dużym stopniu ograniczyć zakażenia wirusem typu B),
- stosowanie erytropoetyny zamiast przetoczeń krwi,
- eliminowanie osób z markerami zakażenia HBV i HCV jako dawców krwi,
- regularne badania serologiczne w kierunku zakażeń HBV i HCV u personelu medycznego oraz pacjentów,
- bezwzględne przestrzeganie szeroko pojętych zasad sanitarno-higienicznych,
- wydzielanie osobnych stanowisk dializacyjnych dla chorych zakażonych HBV i/lub HCV.

Źródłem zakażenia u chorych dializowanych w przeszłości były przede wszystkim przetoczenia krwi i jej preparatów [47, 86]. Zakażeni pacjenci stawali się źródłem infekcji dla innych chorych, personelu medycznego oraz swoich rodzin. Wprowadzenie do leczenia niedokrwistości rekombinowanej erytropoetyny (rHuEpo) znacząco zmniejszyło ilość przetaczanej krwi u pacjentów dializowanych, co zredukowało liczbę nowych zakażeń. W przypadku wirusowego zapalenia typu B olbrzymią rolę odgrywa systematyczne prowadzenie szczepień ochronnych. Dla opanowania problemu zakażeń wirusami hepatotropowymi u osób dializowanych konieczne są działania zmierzające do zmniejszenia liczby nowych infekcji, zwiększenia możliwości i skuteczności terapii

chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby. Ograniczenie możliwości szerzenia się zakażeń to także odpowiednio prowadzona diagnostyka poprzez wykonywanie regularnych badań w kierunku obecności antygeny, przeciwciał jak i badania materiału genetycznego wirusa metodami biologii molekularnej.

1.2. Wirusowe zapalenia wątroby typu C (HCV)

1.2.1 Taksonomia i budowa HCV

Wirusowe zapalenie wątroby typu Non-A Non-B po raz pierwszy zostało opisane w 1975 roku jako potransfuzyjne zapalenie wątroby. Wirus C zapalenia wątroby (HCV) został zidentyfikowany i opisany dopiero w 1989 roku. Autorami tych prac jest zespół badawczy Chiron Corporation z miejscowości Emeryville w Kaliforni. Pierwotnym materiałem zakaźnym była surowica ludzka, którą podano szympansovi, uzyskując w efekcie objawy zapalenia wątroby, następnie metodami biologii molekularnej udało się po długotrwałych i żmudnych badaniach uzyskać materiał genetyczny poszukiwanego wirusa [12, 58, 82].

Takie cechy jak, molekularna organizacja genomu i właściwości fizykochemiczne dają podstawy do zaliczenia tego wirusa do odrębnego rodzaju rodziny *Flaviviridae*.

HCV wykazuje podobieństwo także do innych wirusów z tej rodziny, nazwanych *Pestivirus*. W rodzinie *Flaviviridae* wyróżnia się obecnie 3 odrębne rodzaje: *Pestivirus*, *Flavivirus* i *Hepacivirus*. Trzecia z wymienionych nazw jest proponowana jako określenie dla wirusa C, lecz jak dotąd nie upowszechniła się poza klasyfikacjami taksonomicznymi. Powszechnie używa się określenia *hepatitis C virus* - HCV. Do rodzaju *Flavivirus* należą takie wirusy chorobotwórcze, jak wirus dengi, wirus żółtej gorączki, kompleks wirusów kleszczowego zapalenia mózgu, wirus zapalenia mózgu zachodniego Nilu inne (łącznie 64 gatunki).

HCV ma budowę sferyczną, jest zbudowany z jednoniciowego RNA, złożonego z około 10 000 nukleotydów. RNA wirusa otoczone jest osłonką lipidową o średnicy 45 nm.

Wielkość wirusa ocenia się na około 10 kb, co umożliwia kodowanie około 3000 aminokwasów. Genom HCV dzieli się na część strukturalną (S), kodująca białka budulcowe cząstki (rdzeń, otoczka) oraz na część niestrukturalną (NS) kodującą wszystkie inne białka. Fragment graniczny pomiędzy regionem kodującym białka strukturalne i niestrukturalne oznaczony symbolem E2/NS1-określany także, jako E2HV charakteryzuje się największą zmiennością warunkującą mutagenność wirusa. Wspomniana domena E2HV prawdopodobnie zawiera epitopy o znaczeniu dla powstania i odpowiedzi immunologicznej. Jej zmienność doprowadza do powstania mutantów, co może być przyczyną przewlekłości zakażenia. Zjawisko to jest brane pod uwagę w badaniach nad wytworzeniem szczepionki anty-HCV. W końcu 3' i 5' RNA obecne są regiony nie kodujące translacji (UTR), które odgrywają rolę w kontroli ekspresji poliproteiny HCV. Powstająca w wyniku translacji poliproteina ulega enzymatycznemu rozszczepieniu na dziesięć białek pełniących różne funkcje i mających właściwości immunogenne. Wirus ten występuje w sześciu formach genotypowych zależnych od sekwencji nukleotydów. Typy genetyczne otrzymują numery od 1 do 6, zaś podtypy litery a, b i c [36, 72, 82, 84]. Ostatnie badania wskazują na obecność 12 genotypów wirusa. Sekwencjonowanie klonów wirusów pochodzących z różnych rejonów geograficznych wykazało dość znaczną różnorodność w składzie nukleotydowym genomu, która jednak w małym stopniu odbija się na składzie aminokwasowym powstających na matrycy RNA białek. Od czasu odkrycia wirusa typu C mnożą się publikacje na temat różnorodnych sekwencji nukleotydowych wyizolowanych HCV. W pierwszej kolejności opisano różne typy wirusa w Ameryce i Japonii (HCV-1, HCV-J1). Podgrupy te wykazują różnice w sekwencji w regionach NS3 i NS4. Do końca nie wyjaśniono jeszcze, jak dalece podtypy wirusa mogą być odpowiedzialne za zakażenia wielokrotne. Badania na zwierzętach oraz wstępne badania autorów japońskich wskazują na wzrost liczby przypadków wielokrotnych infekcji. Heterogenność genomu HCV wskazuje na to, że w różnych rejonach świata mogą występować różne podtypy HCV. Niektóre

genotypy są spotykane na całym świecie, np. 1a, 1b, 2a i 3a, natomiast inne takie jak np. 5a czy 6a, występują w ściśle określonych regionach geograficznych [1, 83, 131]. Genotypy 1a, 1b, 2a i 3a najczęściej występują w USA, Japonii i Europie Zachodniej. W Północnej Ameryce i północnej części Europy dominuje genotyp 1a, podczas gdy w Japonii oraz południowej i wschodniej Europie genotyp 1b. Genotypy 3 i 6 przeważają w Indiach i południowo-wschodniej Azji zaś genotyp 4 w Afryce [14, 36]. W Polsce najczęściej identyfikuje się genotyp 1 b.

Wg danych z Hiszpanii, procentowy udział poszczególnych genotypów przedstawia się następująco: genotyp 1b - 82%, genotyp 1a – 8%, genotyp 2a – 3%, genotyp 3a – 5%, inne ok. 2 % [12].

W zależności od danego genotypu mogą częściej występować niektóre powikłania wzw typu C i tak np. marskość i rak pierwotny częściej występuje u zakażonych genotypem 1b, podczas gdy u chorych zakażonych genotypem 2 częściej występuje przewlekłe zapalenie wątroby o łagodnym przebiegu.

Istnieje możliwość, że osoba anty-HCV dodatnia może być zakażona różnymi genotypami wirusa oraz, że wystąpi mutacja tego samego wirusa w czasie trwania zakażenia. W grupach dużego ryzyka takich jak: chorzy leczeni nerkozastępczo, narkomani, biorcy narządów, hemofilicy, itd. stwierdzano ponadto zakażenie dwoma lub trzema różnymi genotypami [20, 24,134].

1.2. 2. Czynniki ryzyka i sposób przenoszenia.

Do zakażenia HCV najczęściej dochodzi poprzez przetaczanie preparatów krwiopochodnych, transplantacje narządów, dożylnie wstrzykiwanie środków odurzających oraz drogą wewnątrzszpitalną [20].

Zakażenie HCV rozprzestrzenia się przede wszystkim poprzez kontakt z krwią i produktami krwiopochodnymi. Transfuzje krwi oraz wielokrotne stosowanie źle wysterylizowanych igieł i strzykawek stało się przyczyną rozprzestrzenienia się zakażenia

HCV w USA. Naruszenie ciągłości tkanek przypadkowe lub w trakcie zabiegów medycznych stanowi parenteralne wrota zakażenia. Dzięki wprowadzeniu w 1991 roku rutynowych testów przesiewowych stwierdzających obecność przeciwciał anty HCV oraz poprawie jakości testów (zastosowanie testów II generacji) w połowie 1992 roku w dużym stopniu zredukowano tę drogę zakażenia, praktycznie do kilku procent. Coraz częściej spotyka się chorych, u których nie wykazano ekspozycji na krew a wywiad nie podaje informacji dotyczących wcześniejszych iniekcji.

HCV może być przenoszone drogą płciową, zwłaszcza przy licznych kontaktach heteroseksualnych. W przypadku osób pozostających w związkach monogamicznych jest rzadkie. Obserwacje prowadzone w grupie osób zakażonych HCV, posiadających jednego, stałego partnera seksualnego wykazały mały odsetek zakażonych partnerów (<5%), przy czym stwierdzano obecność licznych, dodatkowych czynników sprzyjających zakażeniu. Wyniki badań na temat rozprzestrzeniania się wirusa poprzez kontakty seksualne są sprzeczne i niejednoznaczne, podobnie jak również na temat przekazywania wewnątrzrodzinnego [101].

Podejrzewa się też, że przenoszenie może się szerzyć przez owady (typowe dla flawiivirusów), jednak do tej pory drogi tej nie udowodniono.

HCV-RNA wykrywa się w ślinie przewlekle zakażonych szympanów, opisano także zakażenie po ugryzieniu człowieka przez nosiciela wirusa, dowodzi to możliwości występowania HCV w ślinie, co potwierdzono *in vitro*.

Zakażenia noworodków nie są częste. Wyniki badań wskazują na to, że tylko 5% noworodków urodzonych z matek nosicielek HCV także ulega zakażeniu, głównie wtedy, gdy ostre wzv typu C rozwija się w III trymestrze ciąży. Ryzyko zakażenia zwiększa się do ok. 20-50% kiedy matka zakażona jest równocześnie HIV i HCV. Przebieg choroby u noworodków jest zwykle bezobjawowy i łagodny. Ryzyko przeniesienia zakażenia z matki

na dziecko rośnie wraz ze zwiększeniem liczby cząsteczek wirusa we krwi matki [101].
Karmienie piersią nie powoduje zakażenia.

Źródłem zakażenia dla potencjalnego biorcy może być także przeszczepiony narząd.
Badanie przeprowadzone w USA wśród 3078 dawców wykazało obecność przeciwciał anty-HCV testem ELISA II generacji u 4,2 % a obecność HCV RNA u 2,4% badanych [19, 20].

Najbardziej narażone na zakażenie HCV są:

- osoby poddane transfuzji krwi przed czerwcem 1992 roku, przed wprowadzeniem czułych testów przesiewowych w kierunku wykrycia zakażenia HCV,
- osoby narażone na częstą ekspozycję na produkty krwiopochodne; dotyczy to chorych na hemofilię, poddanych przeszczepom narządów, z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych nerkozastępczo, lub pacjentów z nowotworami wymagający chemioterapii,
- pracownicy ochrony zdrowia, u których nastąpiło przypadkowe ukłucie igłą,
- osoby uzależnione od narkotyków (stosowanych dożylnie), również te, które stosowały narkotyki wiele lat temu,
- dzieci urodzone z matek zakażonych HCV [53].

Pozostałe grupy zwiększonego ryzyka zakażenia to:

- osoby z tzw. grupy ryzykownych zachowań seksualnych, posiadający licznych partnerów seksualnych, u których rozpoznaje się choroby przenoszone drogą płciową,
- osoby stosujące kokainę.

Przypadkowe zakażenia stwierdza się w przypadku, kiedy nie można określić źródła zakażenia. Stanowią one około 10 % przypadków ostrego WZW C i około 30 % przypadków przewlekłego WZW C. Określane są one również mianem zakażeń sporadycznych. Zakażenia te mogą być następstwem ekspozycji na wirusa podczas nacięć, zranień, iniekcji lub różnych procedur medycznych czy kosmetycznych.

W przeszłości główną rolę w przenoszeniu zakażenia HCV w grupie chorych dializowanych przypisywano przetoczeniom krwi i środków krwiopochodnych. Po wprowadzeniu w latach 80-tych do leczenia niedokrwistości erytropoetyny znacznie zmniejszyło się zapotrzebowanie na krew w ośrodkach dializ. Badanie krwi dawców na obecność przeciwciał anti-HCV doprowadziła do znaczącego zmniejszenia potransfuzyjnego zapalenia wątroby [24].

Obecnie większą rolę przypisuje się szerzeniu zakażenia drogami wewnątrzszpitalnymi [61,91,120,125]. Technika zabiegu hemodializy sprzyja częstym kontaktom z wynaczynioną krwią, stąd zakażenie HCV w ośrodkach dializ przenoszone jest krzyżowo. HCV może być przenoszone poprzez: zakażone ręce personelu medycznego oraz pacjentów, aparat do hemodializy i inny sprzęt medyczny lub przedmioty wymieniane między pacjentami. Istotną rolę w ograniczeniu szerzenia się zakażeń wirusem C w stacjach dializ odgrywa wydzielanie odrębnych stanowisk dla pacjentów zakażonych tym wirusem [125].

Reutilizacja dializatorów nie jest istotnym czynnikiem ryzyka zakażenia HCV dla chorych dializowanych, pod warunkiem, że jest wykonywana w odrębnych pomieszczeniach dla chorych anti-HCV dodatnich oraz anti-HCV ujemnych. Ze względu na narażenie personelu medycznego, nie powinno się reutilizować dializatorów od chorych anti-HCV dodatnich.

Znaczący wpływ na występowanie zakażeń HCV ma czasokres leczenia nerkozastępczego, ryzyko wzrasta o 10 % z każdym rokiem dializoterapii. W badaniach przeprowadzonych w Szwecji wykazano, iż w pierwszych 3 latach hemodializy zakażeniu ulegało 12 % chorych rocznie. Rodzaj leczenia nerkozastępczego także ma istotny wpływ – ryzyko jest sześciokrotnie wyższe przy leczeniu hemodializami w porównaniu do chorych leczonych dializą otrzewnową.

Narażenie chorych dializowanych jest tym większe, im dłużej są dializowani, ponieważ pacjenci ci mają upośledzoną reaktywność immunologiczną w zakresie

odpowiedzi komórkowej i humoralnej, często stają się rezerwuarem wirusa dla innych chorych, personelu stacji dializ i rodziny. Ponieważ brak jest możliwości immunizacji biernej i czynnej przeciwko HCV, najważniejsze postępowanie w profilaktyce to przestrzeganie ogólnych zasad sanitarno-epidemiologicznych, takich jak mycie rąk przed badaniem pacjenta, zmiana rękawiczek po każdym kontakcie z pacjentem i aparaturą, dezynfekcja aparatury po każdym zabiegu hemodializy, dezynfekcja wszystkich wspólnie używanych przez chorych przedmiotów i pomieszczeń jak: łóżka, stoliki, szafki, podłogi, toalety itp. [55].

1.2.3. Przebieg zakażenia.

Zakażenie wirusem C powoduje ostre zapalenie wątroby, które w większości przypadków charakteryzuje się skąpoobjawowym klinicznie przebiegiem oraz tendencją do przejścia w stan przewlekły. Okres inkubacji wirusa wynosi ok. 2-26 tygodni (przeciętnie około 8 tygodni). Objawy kliniczne mają łagodny, niespecyficzny, przemijający charakter:

- zmęczenie,
- niewielki dyskomfort lub tkliwość w prawym podżebrzu,
- nudności,
- utrata apetytu,
- bóle mięśni i stawów,
- rzadko żółtaczka.

Podobnie badanie fizykalne może nie wykazywać żadnych odchyleń lub jedynie niewielką hepatomegalię oraz tkliwość podczas badania w prawym podżebrzu. Niektórzy chorzy mają pajęczki naczyniowe lub rumienie na dłoniach.

Przebieg wzv typu C u chorych dializowanych cechuje niski poziom wirerii, długie okno serologiczne (do 12 m-cy), miernie podwyższona aktywność AlAT. Przebieg

kliniczny jest skąpoobjawowy, jednak cechy przewlekłego wzv rozwija 18-80% chorych. W przebiegu ostrego wzv typu C u około 15% przypadków w ciągu kilku tygodni lub miesięcy dochodzi do wyzdrowienia, w niewielkim odsetku (poniżej 1%) choroba ma przebieg piorunujący (*hepatitis fulminans*) [3, 12, 52].

Ostre wzv typu C można uznać za wyleczone, jeśli aktywność aminotransferaz w surowicy krwi ulega normalizacji oraz w badaniu nie stwierdza się HCV RNA w surowicy przez kilka miesięcy. Przeciwciała anti-HCV mogą być obecne jeszcze przez wiele lat, choć ich miano z czasem spada [2, 34].

Zakażenie HCV zwiększa ryzyko zgonu pacjentów dializowanych w porównaniu z pacjentami HCV – ujemnymi; po 10-ciu latach śmiertelność chorych anti-HCV dodatnich wynosi 54% w stosunku do 31% chorych anti-HCV ujemnych. Po około 10-ciu latach dializoterapii marskość wątroby rozwija się u 17,5 % chorych zakażonych HCV. Powikłanie to ze względu na bezobjawowy przebieg często zostaje rozpoznane dopiero w zaawansowanym stadium [55].

Wirus HCV może wywoływać także schorzenia immunologiczne, zlokalizowane pozawątrobowo, polegające na stymulacji limfocytów do tworzenia autoprzeciwciał lub powstawaniu kompleksów immunologicznych. Należą do nich: krioglobulinemia mieszana samoistna, kłębuszkowe zapalenie nerek, zespół Sjögrena, liszaj płaski, porfiria późna skórna, zapalenie tarczycy, często stwierdza się krążące autoprzeciwciała [22, 43, 82, 85, 94, 96, 103, 111, 113].

Kliniczne następstwa zakażenia HCV mogą być różne. Około 60 % ma charakter przewlekłego zapalenia wątroby, u około 20 % chorych rozwija się marskość wątroby, a w kilku procentach przypadków pierwotny rak z komórek wątrobowych [64, 65, 106]. Przebieg kliniczny zakażenia jest najczęściej asymptotyczny. Podwyższenie aktywności aminotransferaz, jako wyraz uszkodzenia wątroby obserwuje się u 4,5 do 50 % (średnio 20 %) osób z dodatnimi przeciwciałami anti - HCV i tylko u 30 % chorych z histologicznie

potwierdzonym zapaleniem wątroby. W przypadku chorych, u których aktywność aminotransferaz jest podwyższona najczęściej przebieg choroby kończy się marskością wątroby. U chorych, u których aktywność aminotransferaz pozostaje niezmienną, a w biopsji wątroby stwierdza się zmiany histologiczne (37% przewlekłe przetrwałe zapalenie wątroby, 22% przewlekłe aktywne zapalenie wątroby, 15 % brak zmian histologicznych), rzadko stwierdza się marskość wątroby. Przebieg przewlekłego wzw typu C może być: szybki (15 %) - 5-10 lat, pośredni (35%) - 11-30 lat, wolny (50%) - powyżej 30 lat. Ostateczne rozpoznanie przewlekłego zapalenia wątroby powinno być potwierdzone biopsją wątroby [34, 55, 65].

Bardzo często pomimo słabo nasilonych objawów klinicznych w ostrej fazie choroby, dochodzi do przejścia procesu chorobowego w fazę przewlekłą, która z kolei może prowadzić do rozwoju marskości z rakiem wątroby włącznie, szczególnie u osób z genotypem 1b, spożywających alkohol lub zakażonych równocześnie HBV.

Wykonując rutynowe testy serologiczne, nie rozpoznaje się około 20 % zakażeń HCV u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych hemodializami. Wiarygodne rozpoznanie zakażenia HCV można ustalić jedynie na podstawie badania HCV - RNA metodą PCR, ponieważ zwiększona aktywność aminotransferaz występuje tylko u niewielkiego odsetka chorych zakażonych HCV. Obecność HCV-RNA można już wykryć w trakcie okresu inkubacji, około 2 tygodnie po ekspozycji [48].

1.2. 4. Testy diagnostyczne.

Testy diagnostyczne zakażeń HCV podzielić można na trzy kategorie:

- serologiczne - oznaczanie przeciwciał anti-HCV w surowicy krwi (ELISA i pokrewne),
- testy jakościowe i ilościowe wykonywane metodą biologii molekularnej (HCV-RNA) w osoczu lub surowicy,

- badania, za pomocą których identyfikujemy genom wirusa.

Testy serologiczne:

Testy te służą do wykrywania przeciwciał anty HCV. Obecnie stosowane są testy III generacji, EIA-3, o większej czułości i specyficzności niż uprzednio stosowane. Mimo to, nawet podczas stosowania tych testów zdarzają się przypadki odpowiedzi fałszywych (fałszywie-dodatnich lub fałszywie-ujemnych). Najlepszą metodą potwierdzenia zakażenia jest wykrycie HCV RNA metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Obecność HCV RNA w surowicy wskazuje na czynne zakażenie. Testy HCV RNA są szczególnie pomocne w diagnostyce zakażenia u tych chorych, u których testy EIA w kierunku stwierdzenia obecności przeciwciał anty-HCV budzą wątpliwości. Taka sytuacja zachodzi np. w przypadku chorych z upośledzoną odpornością. U tych osób często nie wykrywa się obecności przeciwciał anty-HCV, pomimo czynnego zakażenia, gdyż produkowana przez nich ilość przeciwciał jest niewystarczająca do wykrycia testami EIA. Także chorzy z objawami ostrego wzw w początkowym okresie rozwoju choroby w pierwszych testach mają często negatywny wynik oznaczenia przeciwciał anty-HCV. W takich przypadkach oznaczenie HCV RNA umożliwia postawienie właściwego rozpoznania [3, 10, 11, 25].

Metoda immunoblottingu

Metodę tę stosuje się jako tzw. test potwierdzenia. Najczęściej wykonywany jest test "Western blot". Surowica jest inkubowana na nitrocelulozowych błonach, na których umieszczone są cztery elektroforetycznie rozdzielone białka wirusowe (HCV). Jeżeli w surowicy znajdują się przeciwciała anty HCV, to reagują one z antygenowymi białkami wirusa znajdującymi się na błonie. Zmiana koloru (reakcja barwna dzięki dodanemu enzymowi) wskazuje na to, że przeciwciała reagują z białkami. Test jest uznawany za

dodatni, gdy reakcja dotyczy, co najmniej dwóch białek wirusa natomiast, gdy dotyczy tylko jednego białka wirusa, traktowany jest jako nieokreślony lub wątpliwy.

Testy immunoblot są pomocne w niektórych sytuacjach klinicznych. Stosuje się je w celu weryfikacji rozpoznania u chorych, u których np. wykryto przeciwciała anty HCV metodą EIA ale, u których nie stwierdza się obecności HCV RNA. Taka sytuacja może wystąpić u osób po przebytych zakażeniu HCV lub w przypadku przewlekłego zakażenia, gdy ilość cząsteczek wirusa jest na tyle mała, że staje się ona niewykrywalna (takie przypadki zdarzają się coraz rzadziej z uwagi na coraz większą czułość badania PCR). Jeżeli test immunoblot anty-HCV jest pozytywny, świadczyć to może o tym, iż pacjent jest ozdowieńcem po przebytych zapaleniu wątroby typu C i ma przetrwałe przeciwciała przeciwko wirusowi. Jeżeli test immunoblot jest negatywny, test EIA najprawdopodobniej był fałszywie dodatni. Testy immunoblot stosuje się rutynowo w przypadkach stwierdzenia metodą EIA przeciwciał anty-HCV w bankach krwi [28, 35, 36, 99].

Amplifikacja PCR.

Amplifikacja, czyli namnożenie materiału genetycznego wirusa umożliwia wykrycie małej ilości cząsteczek wirusa w surowicy. Testy umożliwiające wykrycie HCV RNA są specyficzne i stanowią skuteczną metodę potwierdzającą obecność czynnego zakażenia. Testy te najczęściej wykonuje się u osób, u których aktywność aminotransferaz jest prawidłowa lub jedynie nieznacznie zwiększona, kiedy nie stwierdza się obecności przeciwciał anty-HCV i w niektórych innych przypadkach diagnostyki chorób wątroby [3, 134]. Metoda ta jest szczególnie pomocna w diagnostyce u chorych poddanych leczeniu immunosupresyjnemu, np. po przeszczepie narządów lub w przypadku chorych na przewlekłą niewydolność nerek. Obecnie, jednak, nie ma jeszcze testów PCR akceptowanych przez FDA (Food and Drug Administration) do powszechnego użytku.

Wiele komercyjnych laboratoriów stosuje swoje własne testy. Nie ma standaryzacji czułości i niezawodności testów. Dlatego lekarz, zlecając oznaczenie HCV RNA metodą PCR powinien skierować chorego do sprawdzonej, wiarygodnej pracowni.

Biochemiczne wskaźniki zakażenia wirusem hepatitis C (HCV):

- U przewlekle zakażonych zwiększa się aktywność aminotransferaz: alaninowej i asparaginianowej maksymalnie 20-krotnie, u większości chorych jednak nie mniej niż 5-krotnie.
- Aktywność aminotransferazy alaninowej jest w większości przypadków wyższa niż asparaginianowej jednak te proporcje mogą być odwrotne u chorych na marskość wątroby.
- Aktywności fosfatazy alkalicznej i gammaglutamylotranspeptydazy są zazwyczaj prawidłowe, mogą być jednak zwiększone w przypadku marskości wątroby.
- Obecność czynnika reumatoidalnego, mała liczba płytek krwi i krwinek białych jest częsta u chorych na marskość wątroby i wskazuje na zaawansowanie choroby.
- Stężenia dehydrogenazy mleczanowej i kinazy kreatynowej są zwykle prawidłowe.
- Stężenie albumin i aktywność protrombiny pozostają zazwyczaj prawidłowe do czasu końcowego stadium choroby.
- Stężenia żelaza i ferrytyny mogą być nieznacznie zwiększone.

Ilościowe oznaczanie HCV RNA w surowicy.

Istnieje kilka metod umożliwiających pomiar miana lub stężenia wirusa w surowicy, co pośrednio wskazuje na jego ładunek. Są to metody z zastosowaniem technik hybrydyzacji (PCR i bDNA - *branched DNA signal amplification assay*). Nie ma standaryzacji metod ilościowych i to powoduje, że wyniki badania tej samej próbki w różnych laboratoriach różnią się między sobą. Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, że stężenie HCV RNA w surowicy może się zmieniać samoistnie 3-10 razy.

Pomimo tych niedogodności dobrze wykonane badanie ilościowe dostarcza ważnych informacji o przebiegu zakażenia HCV. Ładunek wirusa nie koreluje ze stopniem ciężkości zapalenia wątroby, ani nie jest wskaźnikiem złego rokowania, jak to ma miejsce w przypadku zakażenia HIV. Koreluje natomiast z wrażliwością na terapię przeciwwirusową. Częstość pozytywnych odpowiedzi na leczenie interferonem i rybawiryną jest większa u chorych z małym stężeniem HCV RNA. Istnieje kilka definicji małego stężenia HCV RNA, lecz najczęściej określa się tym mianem liczbę cząsteczek wirusa mniejszą niż 2 miliony kopii na mililitr (ml). Monitorowanie liczby cząsteczek wirusa na wczesnym etapie leczenia może informować o prawdopodobnej odpowiedzi na leczenie. Jednak z uwagi na wymienione niedogodności testów nie powinny być one stosowane rutynowo. Konieczne jest opracowanie testów czulszych i bardziej wiarygodnych [35, 99, 110, 120, 125].

Genotypowanie i serotypowanie HCV

Znanych jest 6 genotypów i ponad 50 podtypów wirusa hepatitis C. Znajomość genotypu i serotypu (genotypowo specyficzne przeciwciała) jest pomocna w określaniu sposobu leczenia. Pacjenci z genotypem 2 i 3 są około trzy razy bardziej wrażliwi na terapię interferonem oraz leczenie skojarzone interferonem alfa i rybawiryną. W zależności od genotypu określa się czas trwania leczenia skojarzonego. Chorym z genotypami 2 i 3 zaleca się 24-tygodniowy cykl leczenia, podczas gdy pacjentom z genotypem 1 zaleca się cykl 48-

tygodniowy [36]. Z tego powodu genotypowanie jest pomocne w praktyce klinicznej. Raz oznaczony genotyp nie wymaga ponownego określania, genotypy nie zmieniają się w czasie leczenia.

Chorzy wykazujący prawidłowe wartości aktywności aminotransferaz

U niektórych chorych na przewlekłe WZW C stwierdza się prawidłową aktywność aminotransferaz w surowicy (AlAT), w kolejnych oznaczeniach. W takich przypadkach należy potwierdzić zakażenie za pomocą oznaczenia HCV RNA. Stwierdzenie obecności HCV RNA wskazuje na to, że u chorego występuje czynny przewlekły proces zapalny, pomimo prawidłowej aktywności aminotransferaz.

Biopsja wątroby

Biopsja wątroby nie jest warunkiem rozpoznania choroby, jest jednak pomocna w określeniu stopnia ciężkości choroby, zaawansowania procesu włóknienia, oraz trwałości uszkodzenia struktury zrazikowej. Barwienia podstawowe: hematoksylina i eozyna oraz metody trójbarwne np. wg *Massona* są stosowane w celu określenia stopnia martwicy, aktywności zapalnej oraz stopnia włóknienia. Specyficzne immunohistochemiczne barwienie na obecność HCV nie jest badaniem rutynowym. Biopsja wątroby jest także pomocna w diagnozowaniu innych chorób wątroby, jak uszkodzenie alkoholowe czy hemochromatoza [65, 83].

W zapaleniu wątroby typu C mogą występować następujące zmiany w tkance wątrobowej:

- martwica okołowrotna, określana mianem martwicy kęsowej (obecnie *interface hepatitis*)
- martwica hepatocytów i ogniskowe nacieczenie zapalne w parenchymie
- zapalenie okołowrotne

- włóknienie
 - w stopniu początkowym: ograniczone do dróg wrotnych
 - w stopniu pośrednim: ekspansja poza system wrotny i mostki między przestrzeniami wrotnymi i polem centralnym
 - w stadium zaawansowanym: marskość charakteryzująca się zaburzeniami strukturalnymi z włóknieniem i regeneracją.

Aktywność zapalna (*grading*) i włóknienie (*staging*) w zapaleniu wątroby oceniane są za pomocą odpowiednich stopni, co jest pomocne w prowadzeniu chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby. Rozróżnia się następujące stopnie aktywności zapalnej:

0	-	brak	zmian	zapalnych,
1	-	aktywność		minimalna,
2	-			łagodna,
3	-		umiarkowana,	
4				duża.

Stopień włóknienia może być określany podobnie. System punktowy jest pomocny w badaniach klinicznych nad przewlekłym WZW.

Zastosowanie biologii molekularnej w badaniu bioptatu

Immunodiagnostyka z zastosowaniem poliklonalnych i monoklonalnych przeciwciał w celu wykrycia antygeny HCV w bioptacie wątroby jest przedmiotem prac badawczych. Jednak testy te nie są komercyjnie dostępne i nawet podczas badań naukowych wykrywalność antygeny HCV w tkance wątroby wynosi zaledwie około 60-70% w grupie chorych na przewlekłe WZW C, w większości dotyczy to chorych z dużą wiremią w surowicy.

Powszechnie stosowane testy II generacji korelują w 75-96 % z obecnością materiału genetycznego wirusa C zapalenia wątroby. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań sugerują, iż:

- testy wykrywające przeciwciała anti-HCV mogą nie być dostatecznie czułe z powodu zbyt niskiego miana przeciwciał lub gdy użyty antygen w danej metodzie nie wykrywa w surowicy przeciwciała odpowiedniego dla danego genotypu wirusa,
- leczenie immunosupresyjne, choroby autoimmunologiczne mogą modyfikować, a nawet hamować odpowiedź anti-HCV,
- pacjent może być w okresie tzw. okna serologicznego (czas pomiędzy zakażeniem, a serokonwersją),
- istnieje możliwość, że przeciwciała anti-HCV zanikają po określonym czasie, pomimo obecności w surowicy HCV-RNA.

Z powyższych danych wynika, że u części chorych stwierdza się obecność RNA wirusa typu C, bądź to w surowicy krwi lub w komórkach jednojądrzastych mimo braku przeciwciał anti-HCV. Zatem stosowanie w rutynowych badaniach diagnostycznych oznaczania RNA-HCV (met. PCR), byłoby najkorzystniejszym standardem [98, 120, 125].

1.2. 5. Leczenie zakażeń HCV

Obowiązują dwa protokoły leczenia przewlekłego WZW C:

- monoterapia interferonem alfa,
- leczenie skojarzone interferonem alfa i rybawiryną.

Leczenie skojarzone charakteryzuje większa częstość trwałej odpowiedzi (*sustained response* SR) niż ma to miejsce w przypadku monoterapii. Leczenie skojarzone jest jednak droższe i obarczone większą ilością działań niepożądanych. Mimo tego, obecnie preferuje się leczenie skojarzone, monoterapię rezerwując dla grupy chorych, u których występują przeciwwskazania do stosowania rybawiryny.

Na rynku dostępnych jest kilka typów interferonu alfa: alfa-2a, alfa-2b i consensus interferon (IFN con). Te postacie interferonu są podawane podskórnie trzy razy w tygodniu, w dawkach 3 milionów jednostek (MU) (w przypadku IFN con jest to dawka 9 µg). W ostatnich latach prowadzone są obserwacje i badania kliniczne nad skutecznością leczenia wirusowych zapaleń wątroby interferonem pegylowanym (tj. interferonem z dołączoną cząsteczką glikolu polietylenowego), podawanym podskórnie raz w tygodniu. Szczególnie dobry wynik (100%) leczenia pegylowanym interferonem 2a z rybawiryną osiągnięto w zakażeniu wywołanym genotypem HCV2 i HCV3, natomiast 74-84% w genotypie 1 HCV. Niewielka neutropenia, małopłytkowość i objawy pseudogrypowe występowały u 11-17% leczonych. [\[47\]](#)

Rybawiryna w przeciwieństwie do innych doustnych leków przeciwwirusowych jest podawana dwa razy dziennie w 200 mg kapsułkach do pełnej dobowej dawki 1000 mg w przypadku chorego o masie ciała mniejszej niż 75 kg (165 funtów) lub 1200 mg w przypadku chorych powyżej 75 kg.

Leczenie interferonem lub leczenie skojarzone z zastosowaniem rybawiryny prowadzi do szybkiego zmniejszenia aktywności AlAT w surowicy u 50-75% chorych oraz do zmniejszenia stężenia HCV RNA do wartości niewykrywalnych u 30-50% [15, 62, 113, 136]. Jednak długotrwała poprawa występuje tylko u tych, u których HCV RNA "zanika" w czasie terapii i pozostaje niewykrywalne także po zakończeniu leczenia. Odpowiedź jest

określana jako trwała "*sustained response*", jeżeli HCV RNA pozostaje niewykrywalne w surowicy, przez co najmniej 6 miesięcy po zakończeniu terapii.

W przypadku monoterapii interferonem około 30-35% chorych staje się HCV RNA negatywnymi podczas kuracji, ale u prawie połowy z nich efekt ten nie utrzymuje się po zakończeniu leczenia. W tym przypadku częstość trwałej odpowiedzi (SR) wynosi tylko około 15-20%. Leczenie skojarzone z zastosowaniem interferonu i rybawiryny prowadzi do zaniku HCV RNA u około 50-55% chorych, a trwała odpowiedź (SR) występuje u około 35-45%. Wyniki te potwierdzają większą częstość zaniku HCV RNA w trakcie leczenia i mniejszą częstość wznowy replikacji po zakończeniu leczenia skojarzonego. Czas leczenia zależy od tego, czy stosuje się monoterapię czy leczenie skojarzone oraz od rodzaju genotypu. W przypadku monoterapii interferonem zaleca się 48-tygodniowy cykl leczenia niezależnie od rodzaju genotypu.

W przypadku leczenia skojarzonego czas leczenia zależy od rodzaju genotypu. W przypadku chorych z genotypem 2 i 3 częstość pozytywnych odpowiedzi na leczenie jest większa (60-70%) i 24-tygodniowy cykl leczenia skojarzonego przynosi wyniki porównywalne z cyklem 48-tygodniowym [83, 113, 136].

W przeciwieństwie do tej grupy, w przypadku chorych z genotypem 1 częstość pozytywnych odpowiedzi na leczenie jest mniejsza (w przypadku leczenia skojarzonego jest to 25-35%) i 48-tygodniowe cykle zwiększają częstość trwałych odpowiedzi. Z powodu różnic w odpowiedzi na leczenie, celowe wydaje się określenie genotypu przed wdrożeniem terapii [113, 134].

Kto powinien być leczony?

Chorzy, u których stwierdza się obecność przeciwciał anty HCV, obecność HCV RNA w surowicy, zwiększoną aktywność aminotransferaz oraz cechy przewlekłego zapalenia wątroby w bioptacie i u których nie ma przeciwwskazań do leczenia powinni zostać poddani leczeniu skojarzonemu interferonem alfa i rybawiryną. Konsensus *National Institutes of Health* zaleca, aby terapię ograniczyć do chorych, u których stwierdza się histopatologiczne cechy progresji choroby.

Zgodnie z tymi zaleceniami leczeni powinni być wszyscy chorzy, u których występuje: włóknienie, umiarkowane lub ciężkie nacieczenie zapalne i martwica w bioptacie [75, 110].

Chorzy, u których zmiany zapalne są mniej zaawansowane powinni być indywidualnie kwalifikowani do leczenia z uwzględnieniem całego obrazu chorobowego. Kwalifikacja chorych nie powinna się opierać na obecności lub braku objawów chorobowych, sposobie zakażenia, genotypie HCV RNA czy stężeniu HCV RNA w surowicy.

Chorym z marskością wątroby stwierdzoną w badaniu histopatologicznym powinno się zaproponować leczenie, jeżeli nie mają objawów dekompensacji, takich jak: wodobrzusze, utrzymująca się żółtaczka, wyczerpujące krwotoki z żyłaków, czy objawy encefalopatii wątrobowej. Badania nie wykazały jednak korzystnego wpływu monoterapii interferonem ani też leczenia skojarzonego na wydłużenie czasu przeżycia tych chorych [15, 31, 113].

Chorzy powyżej 60 roku życia powinni być indywidualnie kwalifikowani do leczenia, mimo iż korzyści z terapii w tej grupie chorych nie są zbyt dobre

udokumentowane, a działania niepożądane bardziej nasilone aniżeli w grupie młodszych chorych. Korzyści z monoterapii interferonem u dzieci chorych na wzw C nadal nie są jednoznacznie określone. Podobnie, w przypadku stosowania rybawiryny u dzieci nie ustalono jeszcze dokładnie dawek i nie określono profilu bezpieczeństwa tego leku w pediatrii. Obecnie w przypadku dzieci zaleca się monoterapię interferonem, natomiast rybawiryny nie powinno się stosować poza akceptowanymi programami badań klinicznych.

U chorych zakażonych równocześnie HCV i HIV, korzyści leczenia w kierunku zakażenia HCV także nie zostały dostatecznie dowiedzione. Decyzję o leczeniu zakażenia HCV w przypadku chorego zakażonego jednocześnie HIV należy podjąć z rozwagą, biorąc pod uwagę stosowane aktualnie przez zakażonego leki i jego stan ogólny. Jeżeli liczba CD4 jest prawidłowa lub nieznacznie odbiega od normy ($>400/\text{ml}$), uzyskuje się odpowiedź na leczenie zbliżoną do odpowiedzi jaka występuje w przypadku pacjentów nie zakażonych HIV. Korzyści z terapii skojarzonej nie zostały udokumentowane w przypadku chorych zakażonych HIV, a rybawiryna może wchodzić w interakcje z innymi lekami antyretrowirusowymi.

W wielu takich niejasnych przypadkach wskazania do terapii powinny być co jakiś czas ponownie rozważane. W dobie intensywnych badań nad zakażeniem HCV, istnieje nadzieja na opracowanie skuteczniejszych terapii już w ciągu kilku lat i wtedy być może wskazania do leczenia będą rozszerzone. U chorych wykazujących klinicznie znamienne objawy pozawątrobowe, takie jak krioglobulinemia czy kłębuszkowe zapalenie nerek, terapia interferonem alfa może spowodować remisję objawów chorobowych. Niestety, w tej grupie dość często występuje nawrót objawów po zakończeniu leczenia. U niektórych chorych długotrwała, przewlekła terapia interferonem alfa może być prowadzona niezależnie od stwierdzenia obecności HCV RNA w surowicy, jeżeli objawy kliniczne pod wpływem tego leczenia ustępują [47, 113].

Terapii nie zaleca się poza kontrolowanymi programami badań klinicznych w następujących przypadkach:

- obecność klinicznych objawów zdekompensowanej marskości wątroby w następstwie zakażenia HCV,
- prawidłowa aktywność aminotransferaz,
- chorzy po przeszczepach: nerek, wątroby, serca i innych organów miękkich,
- chorzy z przeciwwskazaniami do leczenia.

Przeciwwskazania do leczenia interferonem alfa obejmują: ciężką depresję lub inne zaburzenia neuropsychiatryczne, uzależnienie od alkoholu lub innych substancji, choroby autoimmunologiczne (takie jak reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń, łuszczyca), choroby szpiku kostnego, możliwa ciąża (chora nie jest w stanie przestrzegać kontroli urodzin) [2, 75].

Przeciwwskazania do stosowania rybawiryny (tj. do leczenia skojarzonego z zastosowaniem rybawiryny) obejmują: niedokrwistość, dysfunkcję nerek, chorobę niedokrwienną serca, choroby naczyń mózgowych, a także, jak wyżej, niemożność kontroli urodzin.

Interferon alfa wywołuje szereg objawów neuropsychicznych. Długotrwałe leczenie może powodować: nadwrażliwość, niepokój, zmiany osobowości, depresję, a nawet ostrą psychozę i myśli samobójcze. Chorzy, u których wcześniej występowały zaburzenia psychiczne i choroby neurologiczne są szczególnie podatni na wystąpienie takich objawów.

Podczas stosowania interferonu zaleca się całkowite odstawienie alkoholu. Leczenie interferonem może być nieefektywne u chorych wcześniej uzależnionych od alkoholu lub środków odurzających. Dlatego w przypadku chorych, którzy mają krótki wywiad

odstawienia alkoholu, czy narkotyków należy dokładnie rozważyć podjęcie leczenia interferonem. Zaleca się około 6-miesięczną przerwę od momentu odstawienia alkoholu lub narkotyków do chwili wdrożenia leczenia. Pacjenci pozostający nadal w uzależnieniu od alkoholu czy narkotyków w niektórych przypadkach mogą być leczeni, ale powinni wtedy pozostawać pod stałą kontrolą lekarza, który prowadzi terapię przeciw uzależnieniu. Można leczyć chorych, którzy jednocześnie otrzymują metadon.

Leczenie interferonem alfa może indukować powstawanie przeciwciał. Przeciwciała pojawiają się po 6- i 12-miesięcznym leczeniu u około 2% chorych, szczególnie w przypadku, gdy już wcześniej występowały u nich tego rodzaju zaburzenia (np. zwiększone miano przeciwciał przeciwjądrowych lub przeciwtarczycowych). Podczas leczenia obserwuje się zaostrzenie występujących już wcześniej chorób autoimmunologicznych, jak np. reumatoidalnego zapalenia stawów, czy łuszczycy. Interferon alfa ma wpływ supresyjny na szpik kostny, dlatego chorzy wykazujący trombocytopenię $<75000/\text{mm}^3$ lub neutropenię $<1000/\text{mm}^3$, powinni być dokładnie monitorowani z częstą kontrolą morfologii [53, 58].

Rybawiryna wywołuje hemolizę krwinek czerwonych. Dlatego pacjenci z wcześniej występującą hemolizą lub niedokrwistością ($\text{Hb} < 11\text{g/dl}$, lub $\text{Ht} < 33\%$) nie powinni otrzymywać tego preparatu. Podobnie chorzy na chorobę niedokrwinną serca lub choroby naczyń mózgowych nie powinni stosować tego leku, gdyż niedokrwistość może nasilić objawy z niedokrwienia. Opisywane są przypadki zawału mięśnia sercowego i udaru występujące podczas leczenia skojarzonego interferonem alfa i rybawiryną. Rybawiryna jest w większości wydalana przez nerki. U chorych z niewydolnością nerek może wystąpić hemoliza o ciężkim przebiegu, nawet zagrażająca życiu. Nie powinno się stosować rybawiryny u pacjentów wykazujących poziom kreatyniny w surowicy $>2,0\text{ mg/dl}$ [60].

Działania niepożądane

Działania niepożądane najczęściej występujące (u ponad 10% chorych) podczas leczenia interferonem alfa to:

- zmęczenie,
- bóle mięśniowe,
- bóle głowy,
- nudności i wymioty,
- zaczerwienienia skóry w miejscu wkłucia,
- stany podgorączkowe i gorączka,
- zmniejszenie masy ciała,
- rozdrażnienie,
- depresja,
- łagodne uszkodzenie szpiku kostnego,
- utrata włosów (odwracalna).

Większość z tych objawów ma charakter łagodny lub umiarkowany. Największe nasilenie objawów występuje na początku leczenia, szczególnie po pierwszych iniekcjach. Później objawy te ulegają zmniejszeniu. Paracetamol może być pomocny w łagodzeniu bólów mięśniowych i gorączki. Działania niepożądane mogą być mniej nasilone, gdy interferon jest podawany wieczorem. Zmęczenie i depresja rzadko są na tyle uciążliwe by wymagały zmniejszenia dawki interferonu czy nawet zakończenia terapii. Depresja i zaburzenia osobowości, które występują w trakcie leczenia interferonem mogą być na tyle słabo wyrażone, że pozostają niezauważone przez samego chorego, dlatego każdy taki objaw wymaga dalszej wnikliwej obserwacji.

Rybawiryna także wywołuje działania niepożądane, a leczenie skojarzone jest na ogół gorzej tolerowane niż monoterapia [2].

Działania niepożądane najczęściej towarzyszące stosowaniu rybawiryny to:

- niedokrwistość,
- zmęczenie i rozdrażnienie,
- świąd,
- wysypki skórne,
- uczucie zatkania nosa, zapalenie zatok i kaszel.

Rybawiryna w zależności od stosowanej dawki powoduje hemolizę krwinek czerwonych. Podczas leczenia skojarzonego stężenie hemoglobiny zmniejsza się zwykle o około 2-3 g/dl, a hematokryt o 5-10%. Zmniejszenie stężenia hemoglobiny jest bardzo zróżnicowane. Zaczyna się zwykle pomiędzy 1 a 4 tygodniem leczenia i może się dalej pogłębiać. U niektórych chorych występują objawy niedokrwistości, jak: zmęczenie, duszność, kołatanie serca i bóle głowy.

Niektóre publikacje donoszą, że nagłe zmniejszenie stężenia hemoglobiny może wywołać objawy duszniczy bolesnej u osób predysponowanych oraz dalsze następstwa, takie jak zawał mięśnia serca czy udar mózgu. Z tego względu rybawiryny nie powinno się podawać chorym z wcześniej występującą niedokrwistością oraz chorym na objawową chorobę niedokrwienną serca i naczyń mózgowych. Jeśli u takiego chorego występują wskazania do leczenia, powinno się raczej zastosować monoterapię interferonem. Rybawiryna wywołuje także inne objawy, jak świąd czy uczucie zatkania nosa. Są to efekty histaminopodobne, które występują u około 10-20% pacjentów i są zwykle łagodne, najwyżej umiarkowane. U niektórych chorych objawy astmy, zapalenie zatok, czy nawracające zapalenia oskrzeli mogą być wyraźniej zaznaczone. Ważne jest, by zostały one

właściwie zinterpretowane, ponieważ w niektórych przypadkach konieczne może być zmniejszenie dawki rybawiryny (o 200 mg/dobę), a nawet odstawienie leku [60].

Rzadziej występujące działania niepożądane podczas stosowania interferonu alfa w monoterapii lub w trakcie leczenia skojarzonego (u mniej niż 2% chorych) to:

- choroby autoimmunologiczne (szczególnie tarczycy),
- ciężkie zakażenia bakteryjne,
- znaczna trombocytopenia,
- napady padaczkowe,
- depresja, myśli i próby samobójcze,
- retinopatia (mikrokrwotoki),
- utrata włosów i szумы w uszach.

Rzadkie objawy niepożądane to: niewydolność krążenia, niewydolność nerek, utrata wzroku, zwłóknienie płuc i posocznica. Opisywane wypadki zgonu nastąpiły w wyniku niewydolności krążenia, udaru, samobójstwa i posocznicy. Wyjątkowo rzadkim objawem jest pogorszenie przebiegu choroby. Tłumaczy się to indukowaniem autoimmunologicznego zapalenia wątroby, ale w rzeczywistości przyczyna nie została dokładnie określona. Z tego powodu w trakcie leczenia należy monitorować aktywność aminotransferaz. Jeżeli aktywność AlAT zwiększa się dwukrotnie w porównaniu z wartością wyjściową, terapię należy wstrzymać, a chorego poddać obserwacji. Niektórzy z tych chorych wymagają podania kortykosteroidów [2, 15, 56].

1.2.6. Leczenie zakażeń HCV u chorych dializowanych

W tej grupie chorych, w pierwszym rzędzie do leczenia powinni być zakwalifikowani chorzy zgłoszeni jako biorcy przeszczepu nerki, w następnej kolejności wszyscy pacjenci leczeni nerkozastępczo z uwzględnieniem przeciwwskazań. W leczeniu stosuje się interferon alfa- w dawce 3 mln IU 3 razy w tygodniu przez 6-12-18 miesięcy. Skuteczność takiego schematu leczenia, w tej grupie chorych wynosi od 20 do 30 %. U chorych dializowanych odsetek wyleczeń jest wyższy a objawy uboczne podczas stosowania leczenia interferonem są zwykle nasilone w większym stopniu niż w ogólnej populacji. Nasilenie działań ubocznych w tej grupie chorych jest najprawdopodobniej związane z kumulacją i odrębną farmakokinetyką leku. Poprawę efektywności leczenia zakażeń HCV wiąże się także z wprowadzeniem do leczenia pegylowanych postaci interferonu o korzystniejszej farmakokinetyce. Stosowanie rybawiryny w grupie chorych dializowanych wiąże się z ryzykiem wystąpienia hemolizy (ok. 40 % chorych) na skutek nagromadzenia jej metabolitów w erytrocytach. Niektórzy proponują zmniejszenie dawki leku (200-600 mg) u chorych, którzy nie odpowiadają na leczenie interferonem lub, u których występują nawroty WZW typu C [69, 113]. W trakcie terapii leczenia HCV wykonujemy następujące badania:

- co 4 tygodnie aktywność aminotransferaz w surowicy,
- minimum co 2 tygodnie kontrola liczby neutrofilów i trombocytów we krwi,
- co 2 m-ce wskaźnik protrombinowy,
- po 6 miesiącach leczenia oznaczenie HCV-RNA w surowicy,
- po 12 miesiącach leczenia ponownie oznaczenie HCV-RNA w surowicy,
- po roku od zakończenia leczenia wskazana kontrolna biopsja wątroby.

1.2.7. Perspektywy zwalczania HCV

Badania

Prowadzone są badania na hodowlach tkankowych, które umożliwiają prześledzenie przebiegu zakażenia poza organizmem ludzkim. Modele zwierzęce i komórkowe są bardzo ważne dla zrozumienia sposobu replikacji wirusa i sposobu uszkodzania komórki, co pomaga w rozwijaniu metod umożliwiających kontrolę i hamowanie namnażania wirusa.

Testy diagnostyczne

Prowadzone są badania mające na celu stworzenie czulszych i jednocześnie tańszych testów umożliwiających pomiar HCV RNA oraz stwierdzenie obecności antygeny w surowicy i w tkance wątrobowej. Pomimo niezłej jakości ogólnie dostępnych testów, nadal zdarzają się choroby, u których pomimo zakażenia testy są fałszywie negatywne oraz, odwrotnie, osoby nie zakażone, u których testy są fałszywie dodatnie.

Nowe terapie

Prowadzone są badania mające na celu wytworzenie nowych leków hamujących rozwój wirusa. Interesujące są prace z zastosowaniem inhibitorów enzymów: proteaz, helikaz i polimeraz. Pomocne mogą być leki blokujące wejście wirusa HCV do komórki (blokujące receptor), blokujące syntezę białek wirusa, inhibitory glikozylacji oraz leki hamujące produkcję antygeny HCV (IRES inhibitory). Także inne, niespecyficzne cytoprotekcyjne środki mogą być pomocne poprzez np. hamowanie uszkodzenia komórki przez wirusa. Prowadzone są badania mające na celu wykorzystanie rybozymów, oraz

oligonukleotydów w procesie zahamowania replikacji wirusa. Wszystkie te badania pozostają w fazie eksperymentalnej i nie zostały jeszcze wdrożone do prób klinicznych.

Zapobieganie zakażeniu

W chwili obecnej jedyną metodą prewencji zakażenia HCV jest badanie dawców krwi, poprawa warunków przechowywania i otrzymywania preparatów krwiopochodnych oraz informowanie chorych o zagrożeniu wynikającym z ryzykownych zachowań. Programy mające na celu propagowanie stosowania igieł jednorazowego użytku przez osoby uzależnione od narkotyków zmniejszyły rozprzestrzenianie się wirusa w tej grupie. Nie ma szczepionek i immunoglobulin zabezpieczających przed zakażeniem i w chwili obecnej nie podejmuje się prób ich wyprodukowania, ze względu na to, że takie produkty wymagałyby zastosowania przeciwciał przeciwko wszystkim genotypom wirusa. Niemniej jednak, postępy w immunologii, nowe metody immunizacji być może umożliwią w niedalekiej przyszłości opracowaniu szczepionki przeciwko WZW C [55].

1.3. Wirus G zapalenia wątroby (HGV)

Dodatkowym, nieprzebadanym dostatecznie problemem wśród chorych dializowanych jest wykryty kolejny wirus zapalenia wątroby, należący także do rodziny *Flaviviridae* - nazwany wirusem G (HGV), którego częstość występowania jak również i następstwa kliniczne zakażenia nie są dostatecznie poznane. Podobnie jak wirus C zbudowany jest on z pojedynczej nici RNA. Homologia organizacji genomu w zakresie sekwencji aminokwasów pomiędzy wirusami typu C i G wynosi 25-28% [13, 90, 139]. Genom HGV zawiera pojedynczą nic RNA, zbudowaną z ponad 9000 (w zależności od klonu ok. 9100-9400) nukleotydów i zawiera informację o sekwencji ok. 2900

aminokwasów. Pierwsze informacje o nowym wirusie uznanym za możliwy czynnik sprawczy wzw przedstawiono w sierpniu 1995 roku [16]. Jedni badacze nazwali go ze względu na podobieństwo do wirusów GBV-A i GBV-B, wyizolowanych wcześniej z krwi małp, wirusem GBV-C, drudzy – wirusem zapalenia wątroby typu G (HGV). Na podstawie homologii (ponad 90%) genomu uznano następnie, że są to izolaty tego samego wirusa i zaczęto określać je zamiennie jako GBV-C i HGV. Sądzono, że wykrycie HGV wyjaśni etiologię większości wirusowych zapaleń wątroby nienależących do typów A-E. Okazało się jednak, że listy wirusów zapalenia wątroby nie można jeszcze uznać za zamkniętą, ponieważ jedynie w kilku do kilkunastu procent wzw nie A-E znajduje się w surowicy wirus typu G [23]. Wirus HGV stanowi obecnie bardzo popularny temat badawczy. Świadczą o tym bardzo liczne publikacje z całego świata. Z piśmiennictwa amerykańskiego wynika, iż zakażenia HGV dotyczą ok. 1,5 % dawców krwi i są odpowiedzialne za 0,3% ostrych wzw w USA [63].

RNA wirusa G zawiera sekwencje kodujące i niekodujące. Sekwencje kodujące zawierają informacje o białkach strukturalnych i niestrukturalnych wirusa. Otwarta ramka odczytu koduje pojedynczy, duży peptyd strukturalny. Ten polipeptyd dzięki działaniu proteaz wirusa i komórki gospodarza zostaje podzielony na ok. 10 białek, z których najlepiej poznane jest białko kapsydu wirusa (jego obecność pozawala zaliczyć HGV do tzw. wirusów kopertowych, których wspólna cecha jest kodowanie białka kapsydu) oraz białka otoczki, tzw. glikoproteiny E1 i E2. Regiony kodujące białka otoczki należą do konserwatywnych, z czym wiążą się nadzieje naukowców na stosunkowo nietrudne wynalezienie szczepionki przeciw HGV, gdyby zaistniała taka potrzeba [74, 140].

Jeśli chodzi o właściwości fizykochemiczne, to odkryto, że HGV jest inaktywowany przez ogrzewanie w parze, pasteryzację oraz różne detergenty i rozpuszczalniki.

Wstępnie podzielono HGV na typy i podtypy, analogicznie do HCV. Uznano jednak, że taki podział jest niewystarczający, ponieważ uwzględnia tylko zmienność aminokwasów, a ta w przypadku HGV jest niewielka (3,7-4%). Późniejsza klasyfikacja uwzględnia, oprócz budowy, zależności geograficzne i związane z nimi związki filogenetyczne. Według tych kryteriów podzielono HGV na grupy. Do pierwszej zaliczono przede wszystkim odmiany afrykańskie, zwłaszcza pochodzące z Afryki zachodniej (ich prototypem jest GBV-C). Grupa druga, to izolaty z Ameryki Północnej, Europy, części Indii i pojedyncze z Japonii i Afryki Wschodniej. Grupa trzecia to głównie izolaty azjatyckie. Tymczasowo utworzono jeszcze grupę czwartą dla pojedynczych odmian chińskich. Aby jednak ostatecznie sklasyfikować wirus, konieczne jest przeprowadzenie kolejnych badań [3, 80, 88].

HGV jest wirusem o udokumentowanej zakaźności i zdolności powodowania przetrwałej wirerii. Możliwe jest zakażenie tym wirusem nie tylko człowieka, ale i niektórych zwierząt naczelnych.

Wyniki badań epidemiologicznych sugerują przenoszenie tego wirusa drogą krwi i preparatów krwiopochodnych, dożylnego przyjmowania narkotyków, zakażeniu sprzyjają też inne zachowania połączone z ryzykiem kontaktu z krwią. Wysoki odsetek koinfekcji HGV, HBV i/lub HCV sugeruje istnienie podobnej drogi przenoszenia wirusa. Obecnie wiadomo, że wirus G zapalenia wątroby wykrywany jest u chorych z niewydolnością nerek leczonych powtarzanymi hemodializami (odsetek chorych hemodializowanych z infekcją HGV jest różny w różnych krajach: np. Belgia 16%, Włochy 19%, Japonia 3%, Francja 55%, u osób z hemofilią, narkomanów (15-24%), a nawet w zdrowej populacji dawców krwi (1-2% przypadków) [18, 21, 26, 29]. Na wiele nasuwających się pytań brakuje odpowiedzi, HGV jest poznawany zaledwie od 8 lat, wskutek czego niedostatecznie wyświetlono jego cechy molekularne, epidemiologię zakażeń i ich klinikę. Nie ułatwia tego częste współistnienie HGV z klasycznymi zakażeniami wirusami hepatotropowymi jak HBV czy HCV [9, 57, 67, 70, 92, 109, 123, 137]. Zwykle koinfekcja niczym nie różni się od

izolowanej infekcji HBV i HCV. Uznano, że objawy kliniczne oraz zmiany biochemiczne i histologiczne wątroby odzwierciedlają raczej poziom wiremii HCV lub HBV niż HGV. Wiremia HGV, nawet wieloletnia, może pozostawać bezobjawowa, albo też może spowodować ostre lub przewlekłe zapalenie wątroby. Ostre zapalenie wątroby obserwuje się u ok. 50 % zainfekowanych HGV (częściej niż HCV). Zwykle ma łagodny przebieg albo jest bezobjawowe i rzadko przechodzi w postać przewlekłą. Klinicznie takiego wzw nie można odróżnić od innych typów zapalenia. Zmiany histologiczne w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu G to niespecyficzne zmiany zapalne, stłuszczenie, uszkodzenia komórek dróg żółciowych i cechy cholestazy. Mało prawdopodobne jest, że izolowane zakażenie prowadzi do rozwoju marskości wątroby [45, 62, 63, 66].

Nieznany jest tropizm HGV w stosunku do innych tkanek. Opublikowano doniesienie o kłębuszkowym zapaleniu nerek u osób z HGV - zatem, być może, HGV replikuje się w nerkach? Badano komórki jednojądrzaste krwi obwodowej i większość autorów stwierdziła, że replikacja wirusa nie ma w nich miejsca. Szukano HGV-RNA również w szpiku i śledzionie. Istnieją doniesienia o anemii aplastycznej, za której przyczynę uważa się HGV. Ostatecznie nie stwierdzono jednak gdzie wirus się replikuje.

Wykrywanie wirusa G opiera się na oznaczaniu obecności RNA wirusa w surowicy przy zastosowaniu metody odwrotnej transkrypcji z łańcuchową reakcją polimerazy (metoda RT-PCR). Przeciwciała zaś, skierowane przeciwko jednemu z białek osłonki wirusa (E2), oznaczane są metodą immunoenzymatyczną (ELISA) lub radioimmunoprecypitacji (RIPA) [5, 115, 121, 135].

2. CELE PRACY:

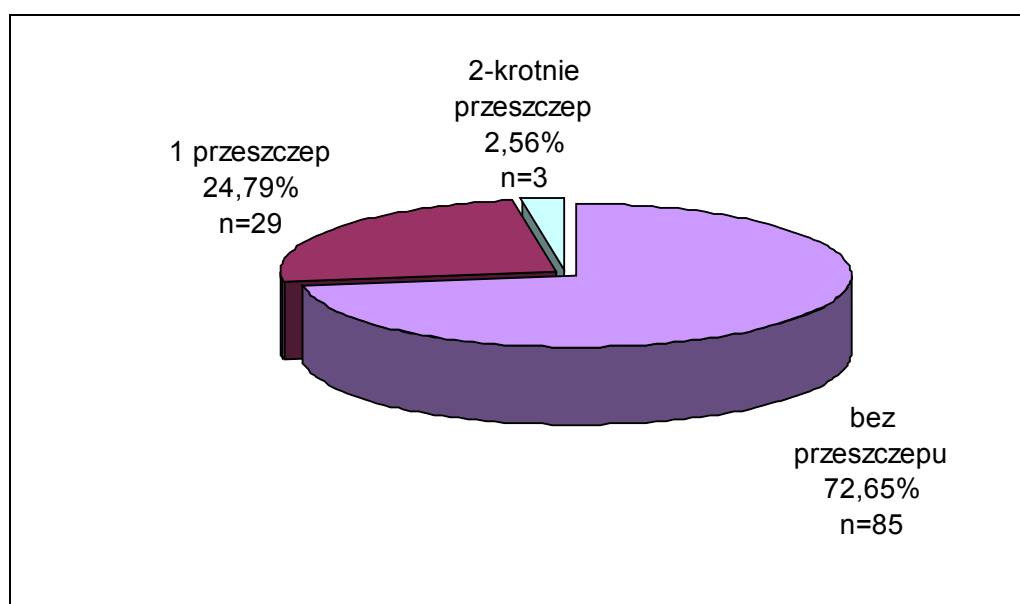
1. Określenie częstości występowania przeciwciał przeciw wirusom C i G zapalenia wątroby (anty-HCV i anty-HGV) w grupie chorych hemodializowanych i obecności RNA tych wirusów (HCV RNA i HGV RNA).
2. Obserwacja zależności pomiędzy przebytym i obecnym zakażeniem HCV oraz HGV, a wskaźnikami uszkodzenia mięszu wątroby.
3. Koinfekcje wirusem zapalenia wątroby typu C i typu G oraz wpływ zakażenia mieszanego HCV i HGV na wybrane parametry biochemiczne oraz na obraz kliniczny choroby u pacjentów hemodializowanych.

3. MATERIAŁ i METODYKA:

Badaniami objęto grupę 215 chorych, ze schyłkową niewydolnością nerek, hemodializowanych w Oddziale Klinicznym Kliniki Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

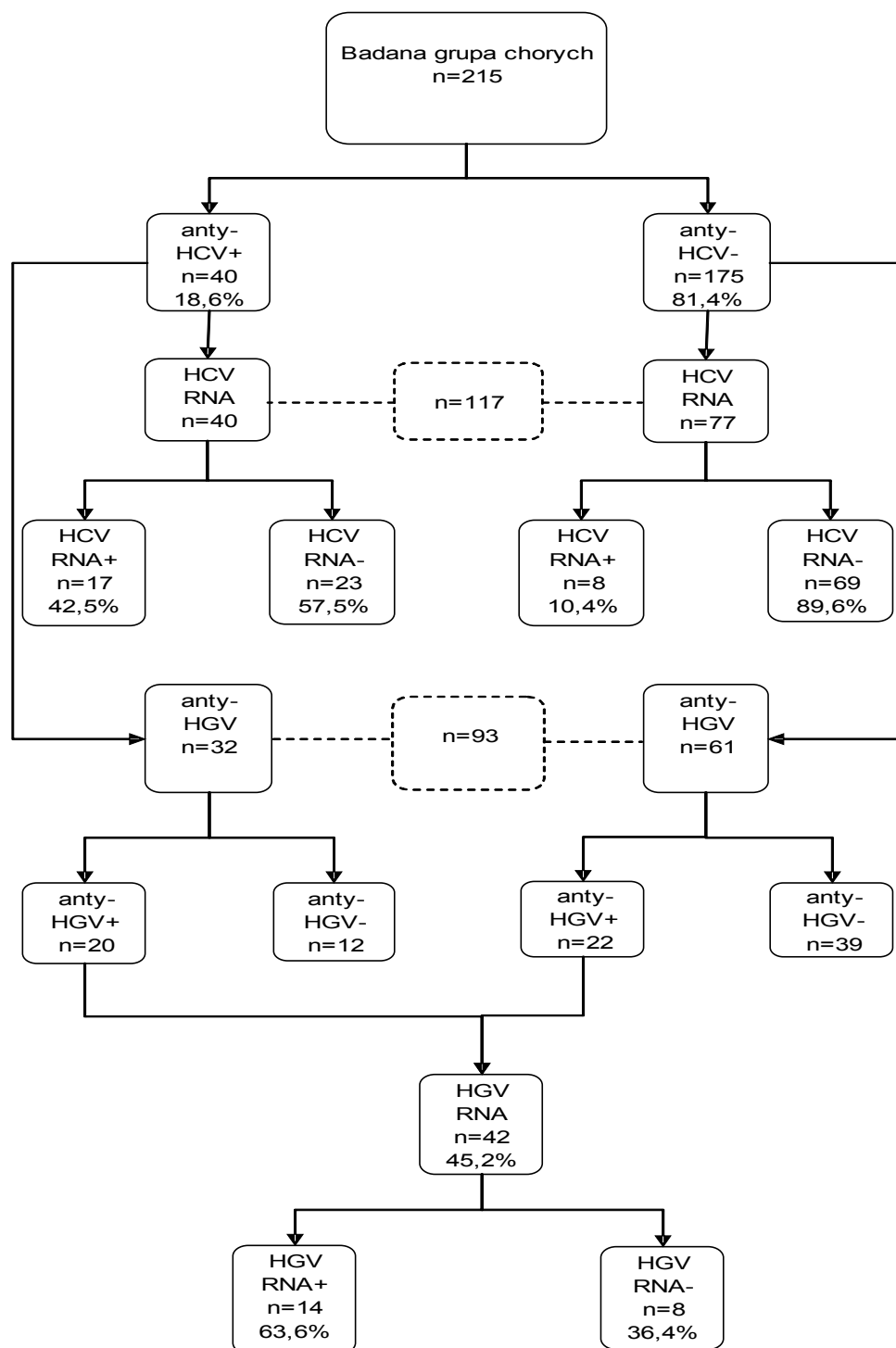
U 40 chorych hemodializowanych spośród 215 stwierdzono obecność przeciwciał przeciw wirusowi C (anty-HCV) tj. u 18,6%. Do oceny częstości występowania HCV RNA wybrano szczegółowo opisaną poniżej grupę 117 pacjentów. Obejmowała ona wszystkich (40) pacjentów, u których stwierdzono obecność przeciwciał anty-HCV oraz 77 pacjentów wolnych od zakażenia HCV. Powodem pomniejszenia w kolejnych etapach badania grupy ocenianych chorych, były względy ekonomiczne. Dobór pacjentów w kolejnych etapach badania przedstawia załączony algorytm (Ryc. 2).

Chorzy byli dializowani 3 razy w tygodniu po 4 - 5 godzin, a czasokres ich dializoterapii wynosił od 33 do 301 miesięcy, średnio 101,75 miesięcy. U 29 spośród nich, w przeszłości wykonano 1 przeszczep nerki, w u 3 po 2 zabiegi (Ryc. 1).



Rycina 1.

Liczba dokonanych w przeszłości przeszczepów nerek w badanej grupie chorych.



Rycina 2.

Algorytm przeprowadzonych badań wirusologicznych w ocenianej grupie chorych

Badaną grupę stanowiło 48 kobiet [41%] oraz 69 mężczyzn [59%] wieku od 26 do 80 lat – średnio 54 lata (Tabela I).

Tabela I. Charakterystyka badanego materiału pod względem wieku i płci

<i>Płeć</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>Wiek (lata)</i>	
			<i>x ± SD</i>	<i>min – max</i>
Mężczyźni	69	58,97	53,2 ± 12,9	29 – 80
Kobiety	48	41,03	54,4 ± 13,9	26 – 79
Razem	117	100	53,7 ± 13,3	26 – 80

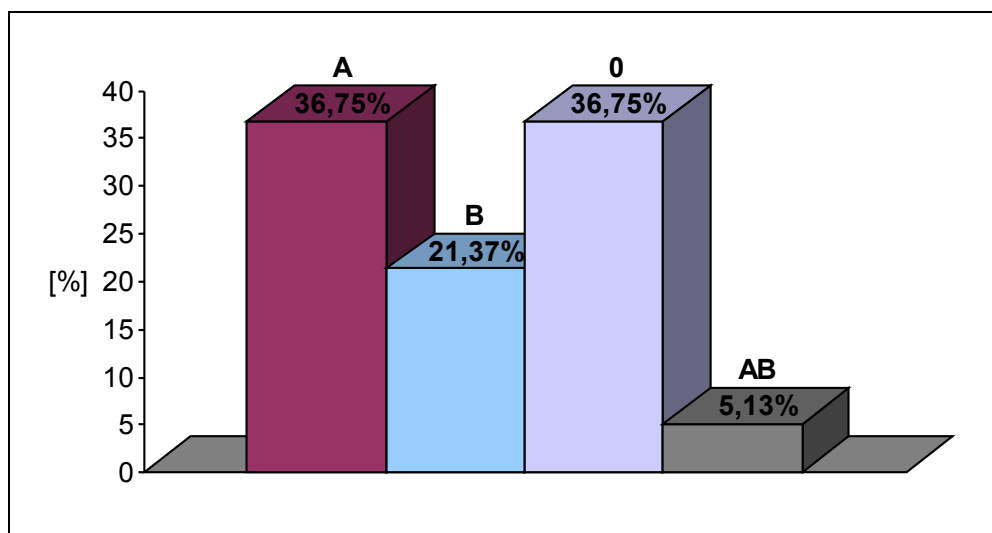
Przyczyny niewydolności nerek w badanej grupie chorych zestawiono w tabeli II. Dominowały wśród nich: przewlekłe kłębuszkowe zapalenia nerek – 44 osoby, (37,61%) i marskość nerek o nieustalonej przyczynie – 38 osób (32,48%).

Tabela II. Przyczyna niewydolności nerek w badanej grupie pacjentów.

<i>Rozpoznanie</i>	<i>Nazwa skrócona</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Glomerulonephritis	GN	44	37,61
Nephrocirrhosis	NC	38	32,48
Pyelonephritis	PN	13	11,11
Degeneratio polycystica renum	Deg.	10	8,55
Nephropathia diabetica	Diab.	7	5,98
Przyczyna nieustalona	nieust.	3	2,56
Lupus nephritis	Lupus	2	1,71

Diagnostyką w kierunku wirusa G zapalenia wątroby (przeciwciała anty-HGV) objęto grupę 93 pacjentów (ilość oznaczeń limitowana przez możliwość użytego zestawu), z czego u 22 chorych wykazujących przeciwciała anty-HGV wykonano badanie PCR na obecność RNA wirusa HGV.

Wśród badanych 117 chorych dominowali pacjenci z grupami krwi A i 0 (Ryc.3).



Rycina 3.

Grupa krwi w układzie A,B,0 w badanym materiale.

W ocenianej grupie chorych wykonano następujące badania:

1. Badania serologiczne: mające na celu identyfikację przeciwciał przeciw wirusowi C oraz wirusowi G (anty-HCV i anty-HGV). Badania te wykonano metodą immunoenzymatyczną (testy III generacji) przy użyciu aparatu COBAS CORE II firmy Roche.

Badania serologiczne wykonano w Zakładzie Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej CM UJ (Kier. Prof. Dr hab. Jerzy Naskalski).

2. Badania RT-PCR mające na celu identyfikację w surowicy pacjentów wirusa C (HCV-RNA) oraz wirusa G (HGV-RNA). Identyfikację wirusa C w badanym materiale klinicznym prowadzono za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej, która pozwalała na wykrycie nawet pojedynczych cząstek wirusa w badanej próbce materiału.

Test ten składa się z kilku etapów:

- Izolacja RNA: RNA wirusa - izolowany jest głównie w surowicy, czasami w biopłatach za pomocą ekstrakcji fenolowo-chloroformowej, w oparciu o metodę

Chomczyńskiego i Sacchi. RNA po wyizolowaniu przechowywany jest w temp. – 70 stopni C.

- Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) – podczas tego etapu na matrycy RNA-HCV syntetyzowany jest komplementarny DNA (cDNA). Reakcja zachodzi w temperaturze 70 st. C przy udziale odwrotnej transkryptazy.
- Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) – zewnętrzna - w tym etapie najpierw do jednoniciowej cząsteczki cDNA dobudowywana jest nić komplementarna (powstaje DNA), następnie wielokrotnie powielana jest dwuniciowa cząsteczka DNA. Reakcja przebiega z reguły w trzech temperaturach.

a/ denaturacja DNA - 94 st. C,

b/ przyłączenie primerów -55 st. C,

c/ wydłużenie nici DNA przy udziale polimerazy termostabilnej – 72 st. C.

- Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) - wewnętrzna – matrycą DNA jest w tej reakcji produkt reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) zewnętrznej amplifikowany przy udziale innej pary primerów niż w reakcji zewnętrznej. Składa się również z powtarzanych kilkadziesiąt razy trójtemperaturowych cykli.

Oznaczanie materiału genetycznego wirusa G prowadzono również metodą PCR.

Do oznaczania wirerii HGV wykorzystano fakt, że genomowe RNA występuję w surowicy w trakcie zakażenia. RNA z surowic pacjentów izolowano przy pomocy zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego. Opracowano równocześnie dwie metody amplifikacji. W pierwszej metodzie po kroku odwrotnej transkrypcji, w którym następuje synteza cDNA, w osobnej próbówce następuje amplifikacja przy pomocy techniki PCR. Równocześnie prowadzono próby z użyciem systemów RT-PCR w jednej próbówce. Reakcje odwrotnej transkrypcji i amplifikacji następują w jednej próbówce z użyciem mieszaniny odwrotnej transkryptazy i termofilnej polimerazy DNA w zoptymalizowanym buforze. Wykorzystano dwa systemy: Akces (Promesa) oraz Titan

(Roche Molecular Biochemicals). Wykorzystano primery specyficzne dla sekwencji 5' - niekodującego regionu genomowego RNA oraz primery Hepatitis G wirus Primer and Probe Set, 2nd generation.

Badania wykonywano w Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Biochemii Klinicznej CMUJ (Kier. Prof. Dr hab. Aldona Dembińska-Kieć) przy użyciu aparatu COBAS AMPLICOR HCV, v2.0 TEST – Software Version 9727.

3. Dodatkowo, u wszystkich chorych wykonano badania biochemiczne oceniające stopień uszkodzenia wątroby:

- stężenie bilirubiny, białka całkowitego, albuminy w surowicy krwi,
- aktywność enzymów wątrobowych: aminotransferaz: asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (ALAT), gammaglutamylotranspeptydazy (GGTP), fosfatazy alkalicznej (AP), cholinesterazy (ChE),
- cholesterol, triglicerydy,
- morfologia oraz wskaźnik protrombiny,
- elektroforeza białek w surowicy.

Badania biochemiczne wykonano metodami standardowymi w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej Katedry Biochemii Klinicznej CM UJ w Krakowie. Wyniki uzyskane w trakcie badań odnoszono do norm Pracowni.

Wykorzystano aparaty- Hitachi 917 Analyzer oraz Cobas Argos 5, firmy Roche.

4. Ocena ultrasonograficzna miąższu wątroby, śledziony oraz cech nadciśnienia wrotnego.

Badania USG zostało wykonane w Pracowni USG Katedry i Kliniki Nefrologii CM UJ wykorzystując aparat ultrasonograficzny Acuson 128 XP. Używano głowicy V4 oraz L5-7.

Oceniano miąższ wątroby oraz śledziony, żyłę wrotną oraz żyłę śledzionową. Badanie wykonywano u pacjentów w pozycji leżącej na wznak, lub z uniesionym prawym bokiem przy obrazowaniu z dojścia podżebrowego oraz międzyżebrowego.

Tabela III. Wartości referencyjne Pracowni Biochemicznej Katedry Biochemii Klinicznej CM UJ dla oznaczanych parametrów.

Parametr	Metoda	Aparat	Wiek	Płeć	Jednostki	Wartości referencyjne.
AspAT	Metoda kinetyczna pirogronian – mleczan, temp. 37° C	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	U/L	<37,0
AlAT	Metoda kinetyczna	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	U/L	<40,0

	pirogonian – mleczan, temp. 37° C					
GGTP	Metoda Szasz wg IGCC, temp. 37° C	Hitachi 917	Dorośli	♀ ♂	U/L	11-49 do 30 do 49
ChE	Metoda kinetyczna z butyrylotiocholina, temp. 37° C	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	U/L	
Cholesterol	Metoda enzymatyczna CHOD – PAP	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	mmol/L	<5,2
Triglicerydy (TG)	Metoda enzymatyczna CHOD – PAP	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	mmol/L	<2,0
Bilirubina	DPD	Hitach 917	Dorośli	♀/♂	µmol/L	0,0 – 17,1
Żelazo (FE)	Metoda z ferrozyną bez odbialczania	Hitach 917	Dorośli	♀/♂	µmol/L	10,6 – 28,3
RBC (erytrocyty)		SYSMEX XE - 2100	Dorośli	♀ ♂	10 ⁶ /mm ³	3,5 – 5,0 4,5 – 6,5
HGB (hemoglobina)		SYSMEX XE - 2100	Dorośli	♀ ♂	g/dL	11,0 – 15,0 12,0 – 17,0
HCT (hematokryt)		SYSMEX XE - 2100	Dorośli	♀ ♂	%	37 – 47 40 – 54
PLT (płytki)		SYSMEX XE - 2100	Dorośli	♀/♂	10 ³ /mm ³	125 – 340
WBC (leukocyty)		SYSMEX XE - 2100	Dorośli	♀/♂	10 ³ /mm ³	4,0 – 10,0
Białko	Metoda biuretowa	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	g/L	60,0 – 80,0
Albumina	Metoda kolorymetryczna z zelenią bromokrezolową	Hitachi 917	Dorośli	♀/♂	g/L	35,0 – 50,0
α ₁ globulina			Dorośli	♀/♂	%	1,4-2,9
α ₂ globulina			Dorośli	♀/♂	%	7,0-11,0
β globulina			Dorośli	♀/♂	%	8,0-13,0
γ globulina			Dorośli	♀/♂	%	9,0-16,0

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały opracowane przy pomocy podstawowych metod statystyki opisowej w zależności od rozkładu danych.

Zebrany materiał badawczy dzielono na grupy w zależności od występowania infekcji wirusem C i/lub G z uwzględnieniem HCV RNA(+), anty-HCV(+), HCV RNA(+)

anty-HGV(+). Zawsze porównywano grupy pacjentów opisane kompletem badań laboratoryjnych i ultrasonograficznych.

W analizie statystycznej zastosowano następujący schemat przeprowadzania porównań:

Grupa pacjentów bez infekcji vs grupa pacjentów, u których wykryto wyłącznie infekcje „C”

Grupa pacjentów bez infekcji vs grupa pacjentów, u których wykryto wyłącznie infekcje „G”

Grupa pacjentów bez infekcji vs grupa pacjentów o infekcji mieszanej „C”+”G”

Grupa pacjentów z infekcją „C” vs grupa pacjentów z infekcją „G”

Wyniki badań laboratoryjnych porównywano testem nieparametrycznym *Manna-Whitney'a*.

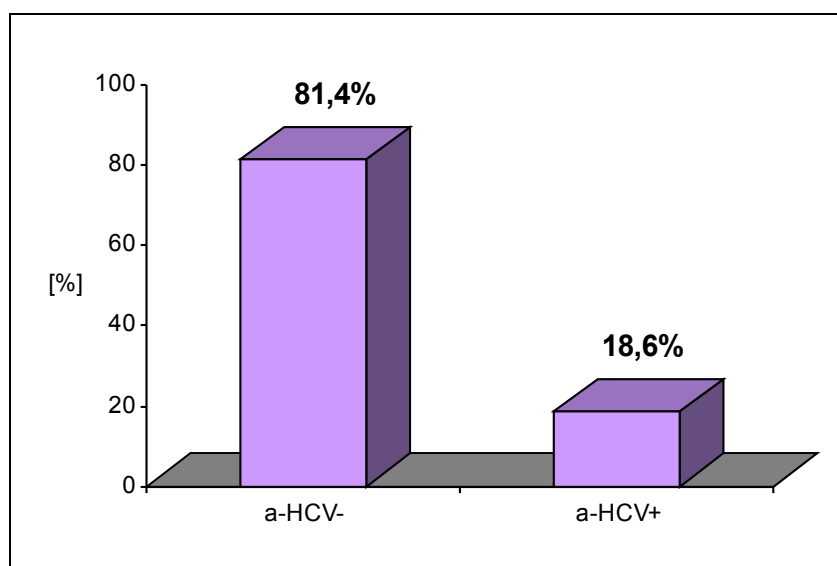
Wyniki badania ultrasonograficznego porównywano testem, niezależności χ^2 . Częstości występowania poszczególnych zmian w badanych grupach porównywano testem frakcji.

Statystyczną znamienność różnic przyjmowano dla poziomu istotności $p \leq 0,05$.

Uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabel i rycin.

4. WYNIKI

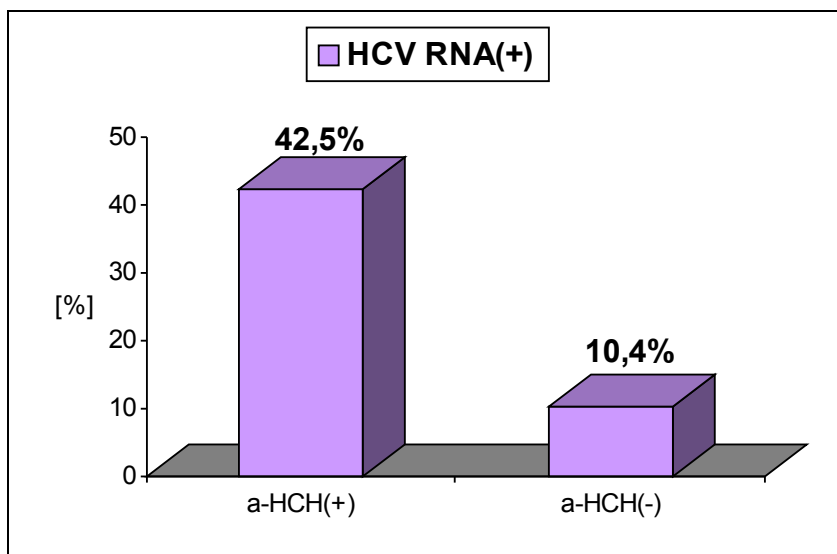
W badanej grupie pacjentów, obejmujących 215 chorych, u których oceniono występowanie zakażenia wirusem C obecność przeciwciał anti-HCV stwierdzono u 40 tj. 18,6 %. W grupie chorych wykazujących obecność anti-HCV u 17 (42,5%) stwierdzono dodatni wynik HCV-RNA natomiast w grupie 77 chorych nie wykazujących obecności przeciwciał przeciw wirusowi C obecność wirusa (HCV RNA) stwierdzono u 8 tj. (10,4%).



Rycina 4.

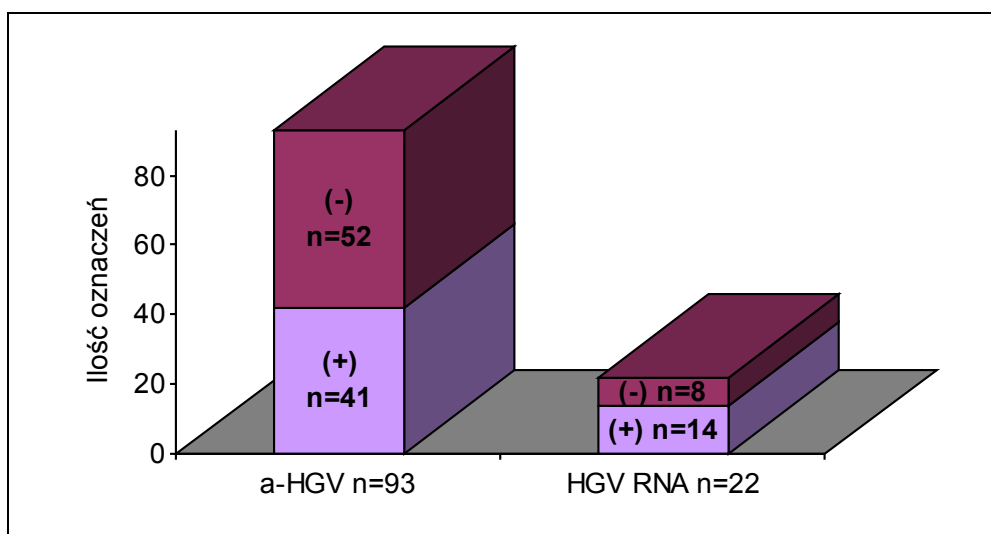
Obecność przeciwciał anti-HCV w badanej grupie chorych.

Diagnostykę w kierunku zakażenia wirusem G zapalenia wątroby (przeciwciała anti-HGV) wykonano u 93 pacjentów. Przeciwciała anti-HGV stwierdzono u 42 badanych (45,2%). W grupie chorych z dodatnimi przeciwciałami anti-HGV, u 22 oznaczano materiał genetyczny wirusa stwierdzając u 14 badanych tj. 63,6% obecność HGV RNA (Rycina 6).



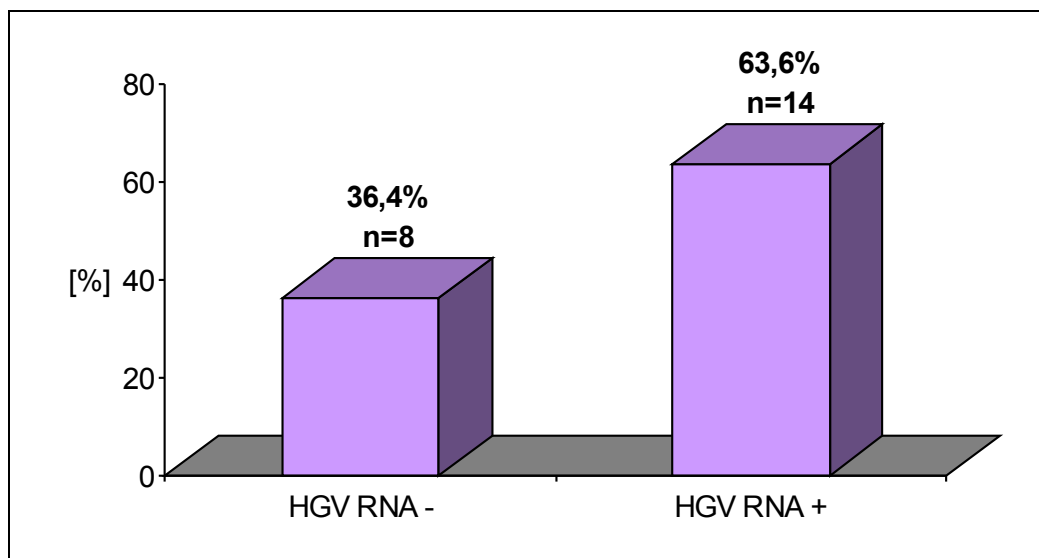
Rycina 5.

Obecność HCV RNA w grupach chorych anti-HCV+ i anti-HCV-



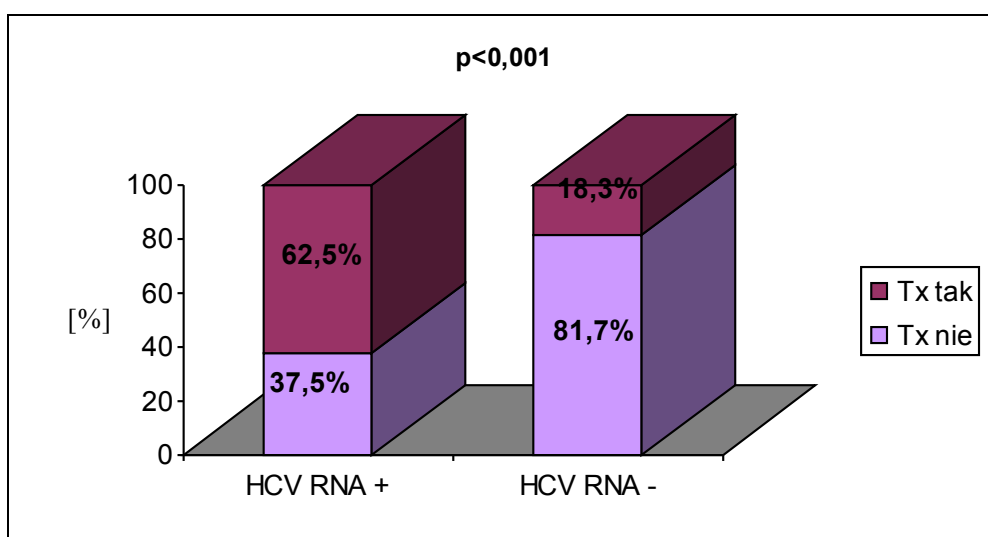
Rycina 6.

Zakażenia wirusem G stwierdzone w badanym materiale w oparciu o obecność RNA wirusa oraz na podstawie przeciwciał.



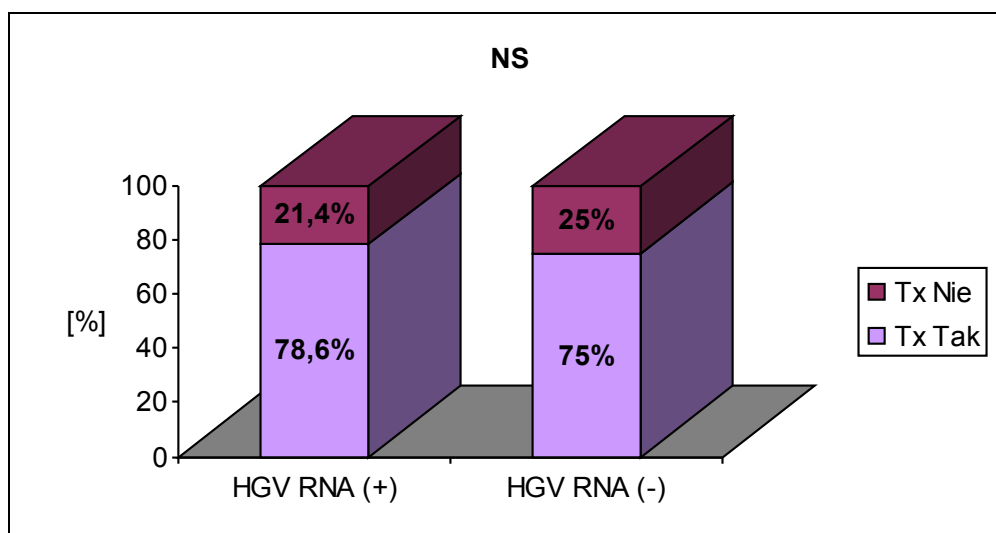
Rycina 7.

Ocena występowania materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu G w grupie 22 pacjentów z dodatnim wynikiem anti-HGV.



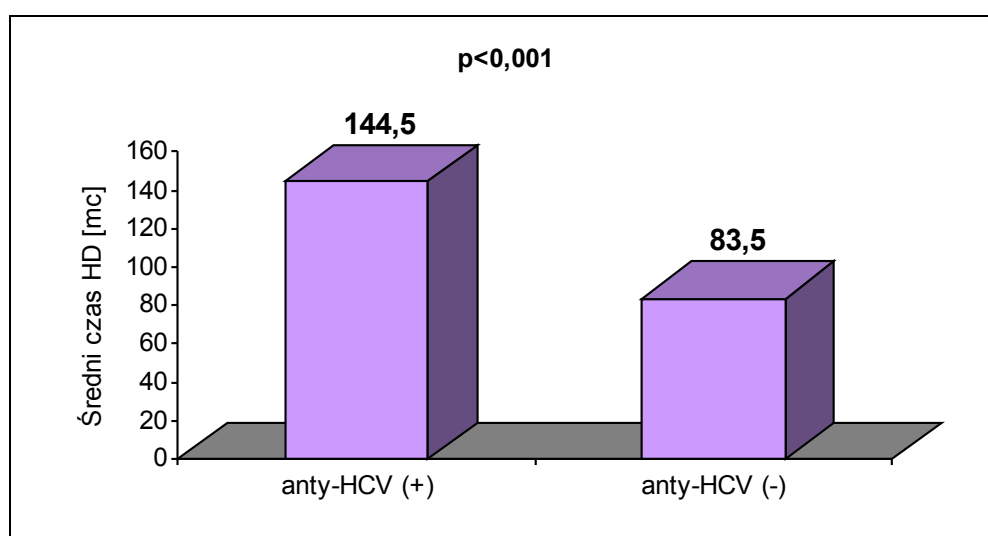
Rycina 8.

Obecność wirusa typu C stwierdzonego w surowicy metodą RT PCR a współistnienie zabiegu przeszczepienia nerki w wywiadzie, w badanej grupie chorych.



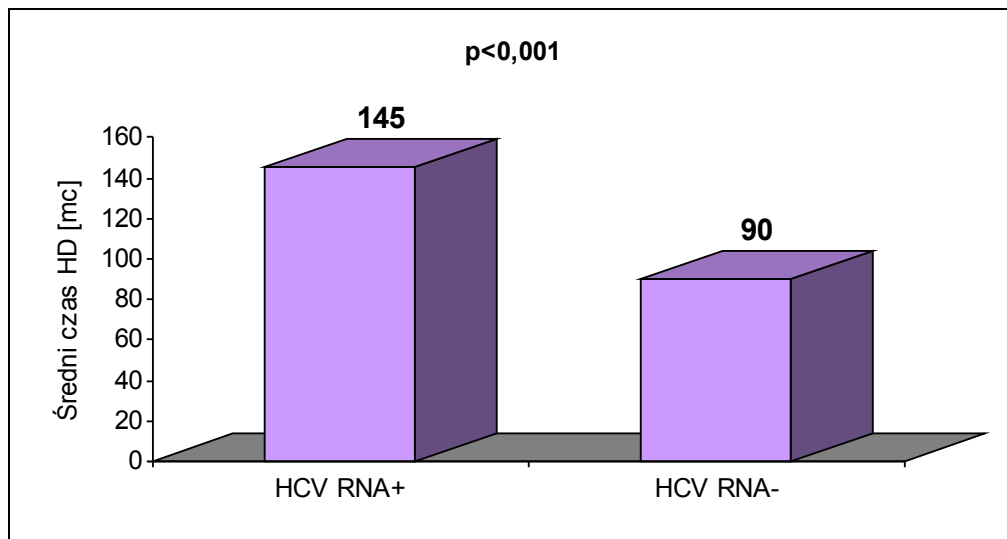
Rycina 9.

Obecność wirusa typu G stwierdzonego w surowicy metodą RT PCR a współistnienie zabiegu przeszczepienia nerki w wywiadzie, w badanej grupie chorych.



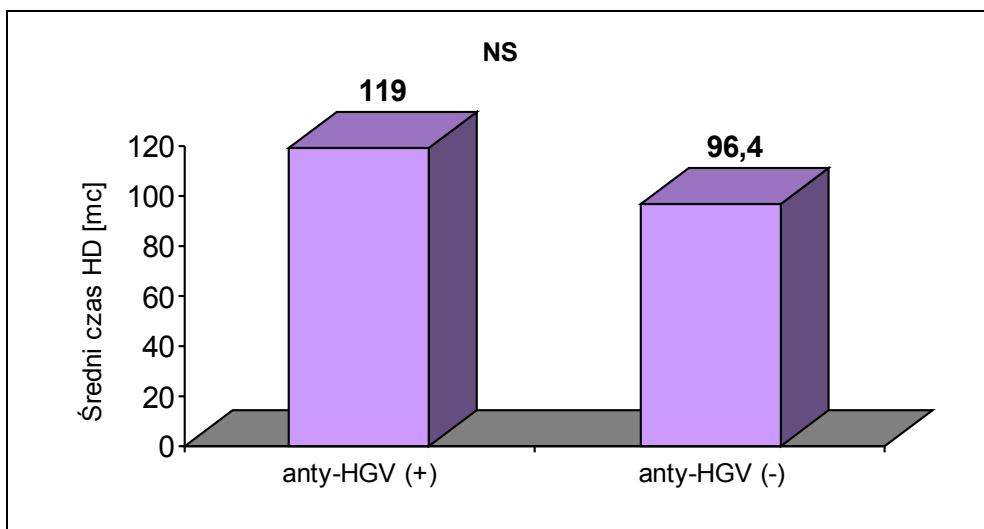
Rycina 10.

Czas dializoterapii a obecność przeciwciał anti-HCV w surowicy krwi, w badanej grupie chorych.



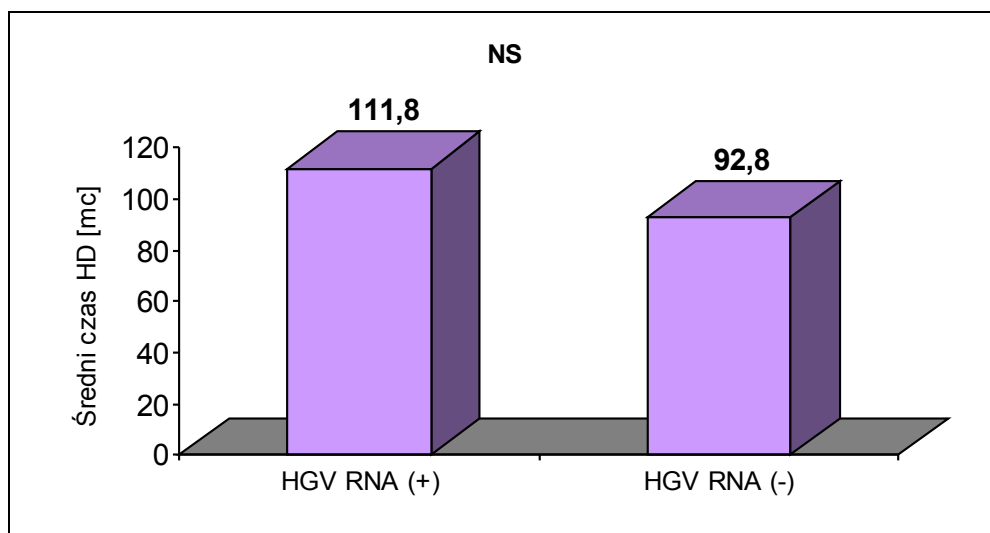
Rycina 11.

Czas dializoterapii a obecność materiału genetycznego wirusa C w surowicy krwi, w badanej grupie chorych.



Rycina 12.

Czas dializoterapii a obecność przeciwciał anti-HGV w surowicy krwi, w badanej grupie chorych.



Rycina 13.

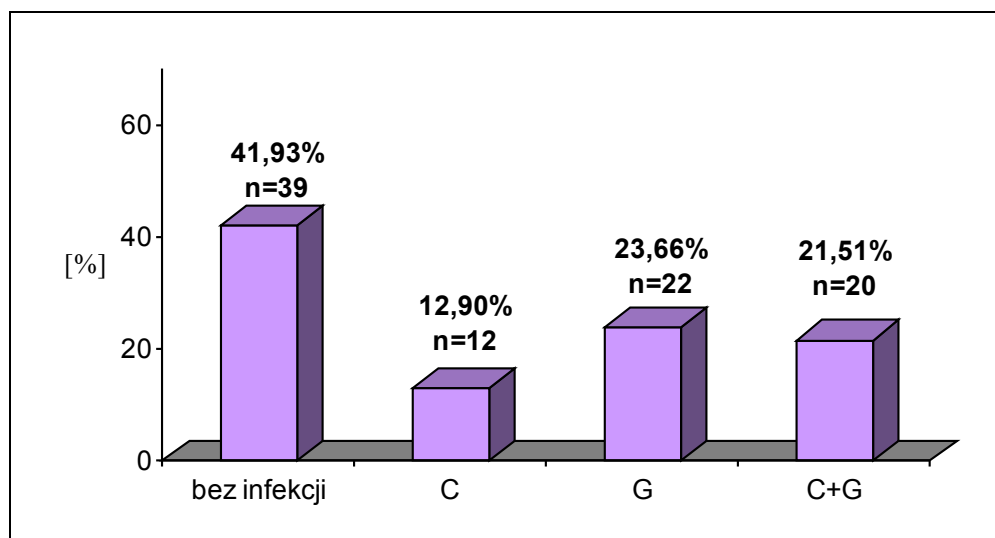
Czas dializoterapii a obecność materiału genetycznego wirusa G w surowicy krwi, w badanej grupie chorych.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy czasem dializoterapii, oraz wykonanym w przeszłości zabiegiem przeszczepienia nerki, a występowaniem zarówno anty-HCV jak również HCV RNA (+) ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano takich zależności przy infekcji wirusem typu G (Ryc. 10 – 13).

W dalszej analizie statystycznej wyodrębniono cztery grupy pacjentów w zależności od obecności w surowicy krwi przeciwciał oraz materiału genetycznego wirusów C i G (Tabela IV).

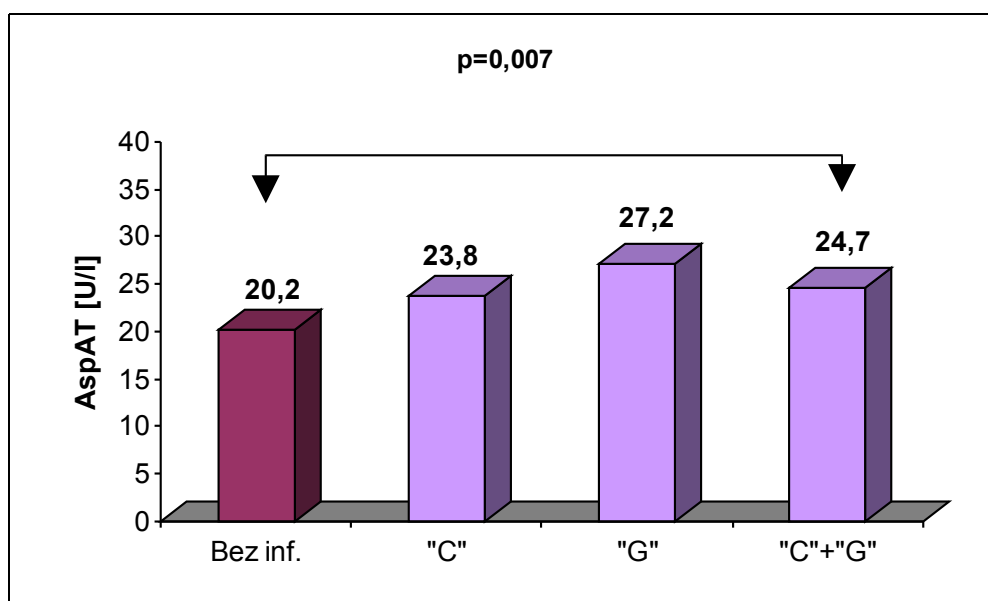
Tabela IV. Oceniane grupy pacjentów.

Grupy chorych		
I	"Bez infekcji"	bez materiału genetycznego wirusów C, G oraz bez przeciwciał anty-HCV, anty-HGV
II	"C"	z obecnością materiału genetycznego wirusa C lub przeciwciał anty-HCV
III	"G"	z obecnością materiału genetycznego wirusa G lub przeciwciał anty-HGV
IV	"C+G"	z obecnością materiału genetycznego wirusów C, G oraz z obecnością przeciwciał anty-HCV, anty-HGV



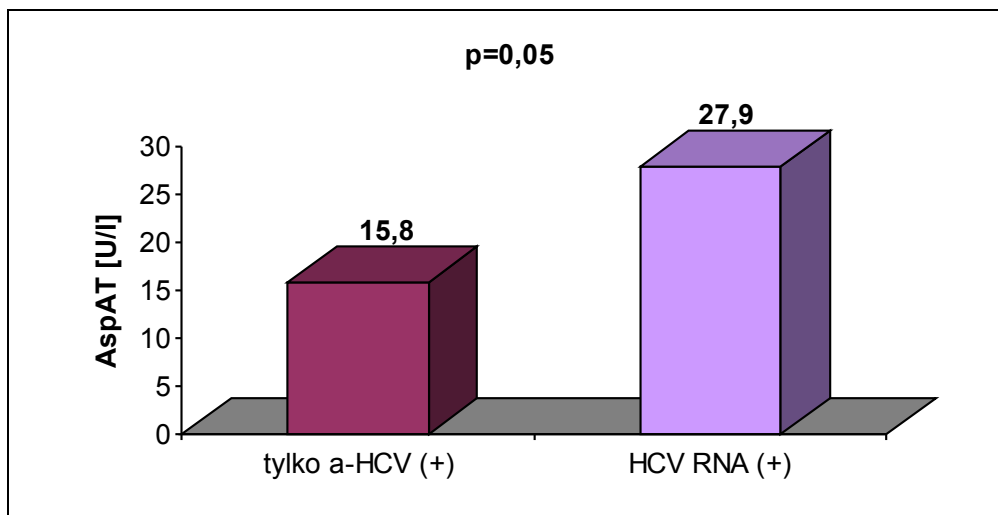
Rycina 14.

Ocena koinfekcji wirusem C i G w badanym materiale 93 pacjentów, u których wykonano oznaczenia w kierunku obecności przeciwciał anti-HCV i anti-HGV oraz oznaczenie HCV RNA i HGV RNA.



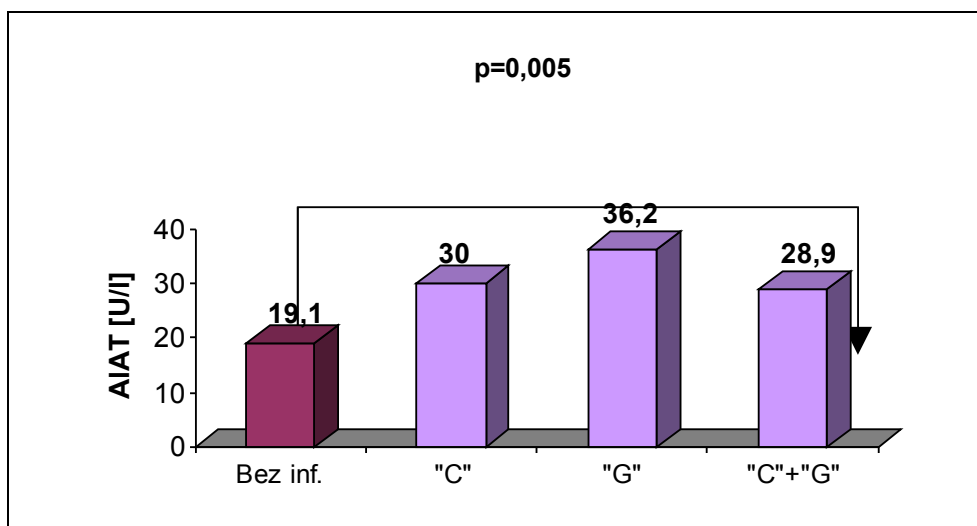
Rycina 15.

Aktywność AspAT w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 16.

Aktywność AspAT u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C ($p=0,05$).



Rycina

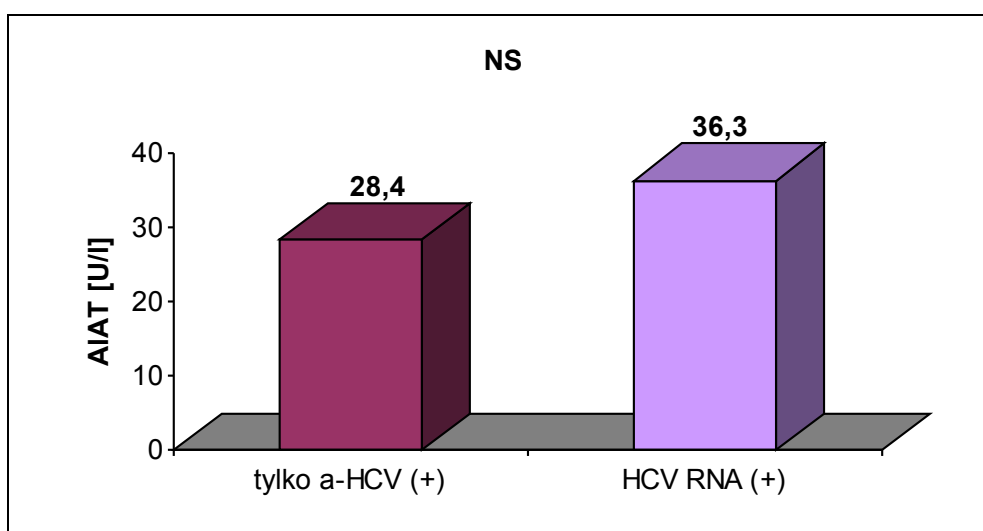
17.

Aktywność AIAT w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).

Średnia aktywność transaminaz (AspAT, AlAT) w surowicy krwi u chorych dodatnimi markerami w kierunku infekcji wzv typu C i typu G była istotnie wyższa od aktywności tych enzymów w grupie chorych dializowanych bez cech infekcji (Ryc. 15-18).

Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy aktywnością AspAT grupie chorych bez markerów infekcji a grupą pacjentów mających przeciwciała i/lub materiał genetyczny wirusów C i G ($p=0,007$).

Nie zaobserwowano takiej zależności pomiędzy chorymi z grup „C” i „G”.

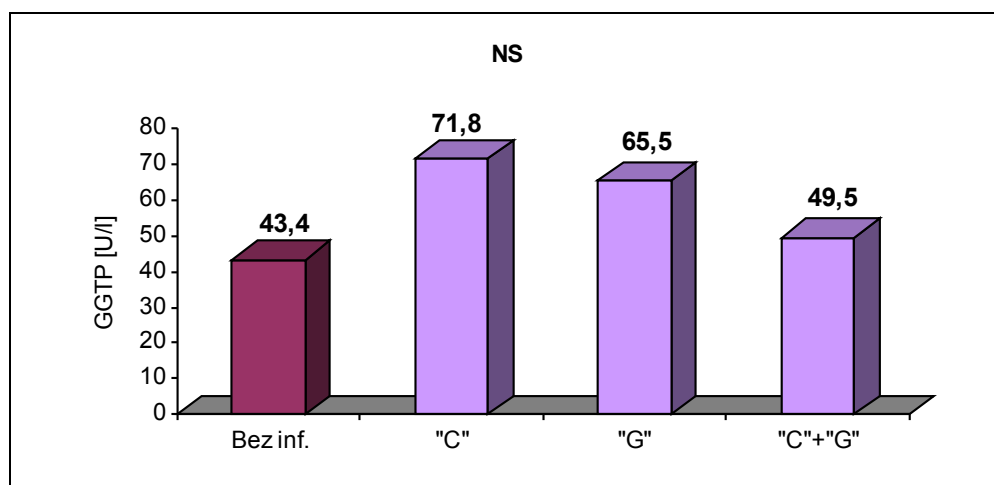


Rycina 18.

Aktywność AlAT u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C (NS).

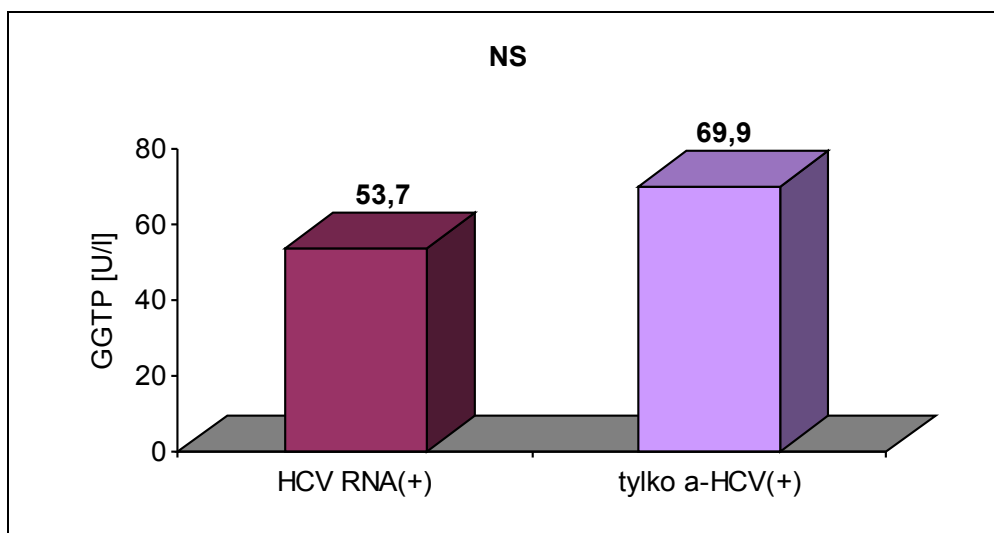
Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w badanych grupach chorych analizując aktywność GGTP (Ryc. 19, Ryc. 20).

Badając aktywność fosfatazy alkalicznej stwierdzono statystyczną zależność pomiędzy chorymi z grupy bez infekcji i z grupy „C+G” jak również pomiędzy chorymi bez infekcji i z grupy „C”. ($p=0,021$; $p=0,019$) (Ryc. 21).



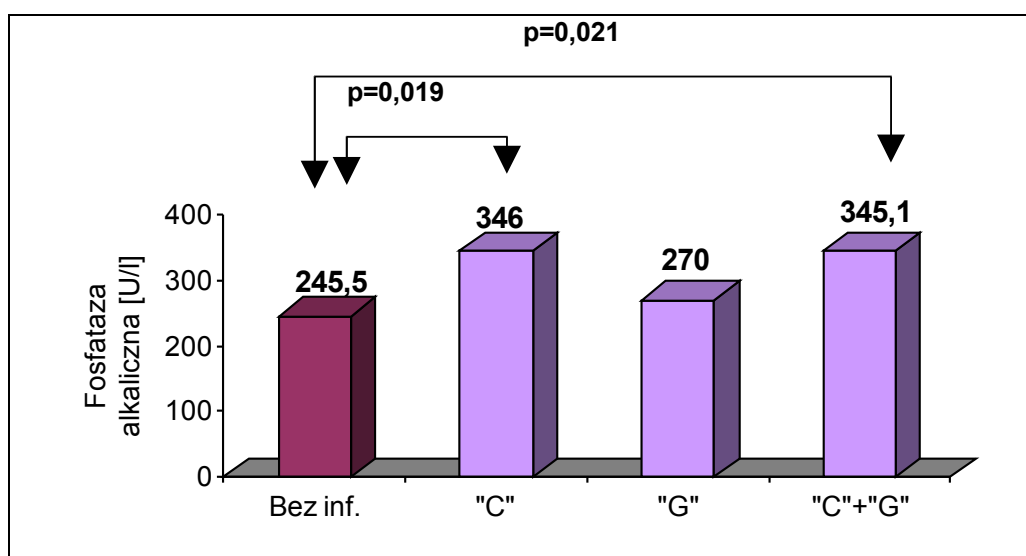
Rycina 19.

Aktywność GGTP w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anty-HCV i anty-HGV).



Rycina 20.

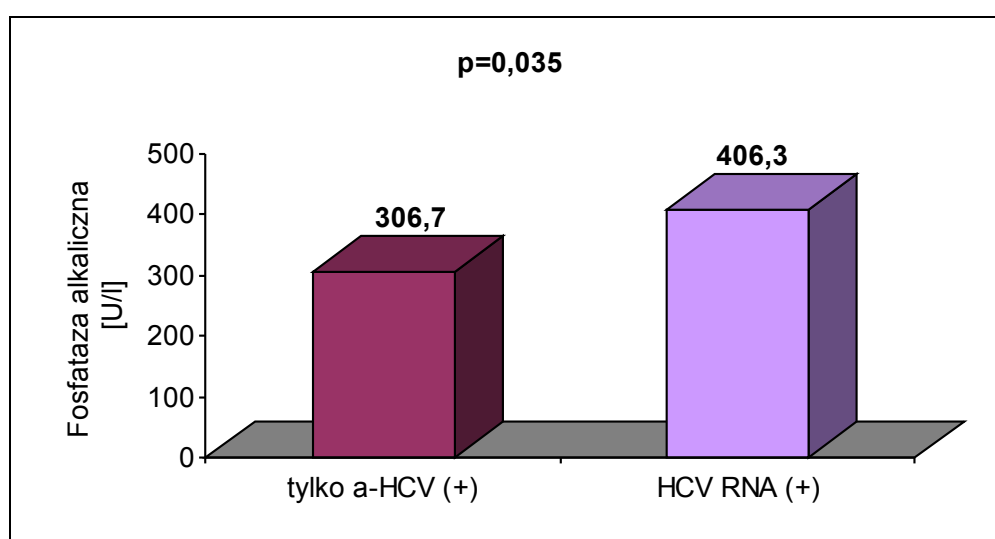
Aktywność GGTP u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C (NS).



Rycina 21.

Aktywność fosfatazy alkalicznej w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).

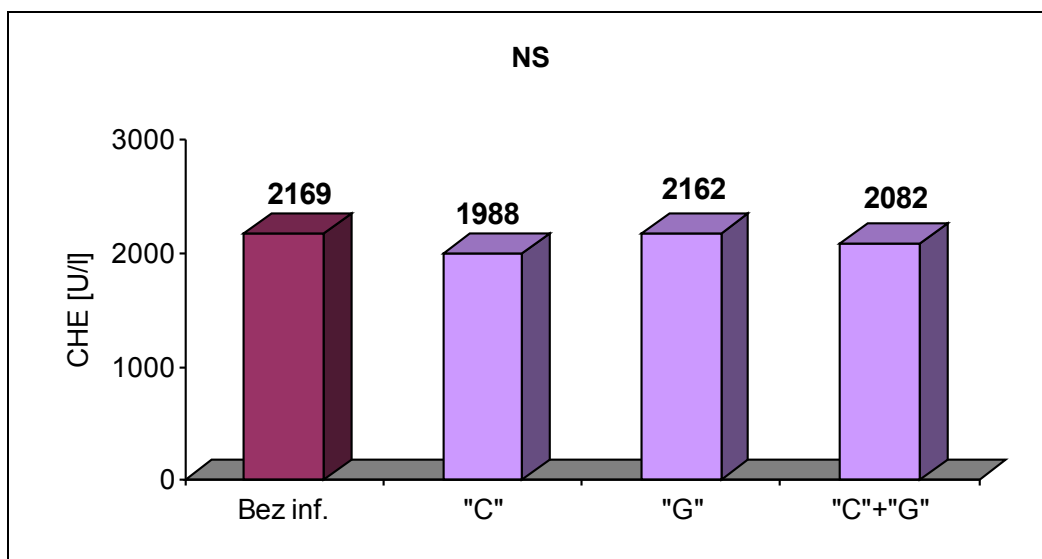
Zwraca uwagę brak zależności statystycznej pomiędzy aktywnością badanych enzymów u pacjentów, którzy nie posiadają markerów świadczących o infekcji, a chorymi z obecnością markerów w kierunku infekcji HGV.



Rycina 22.

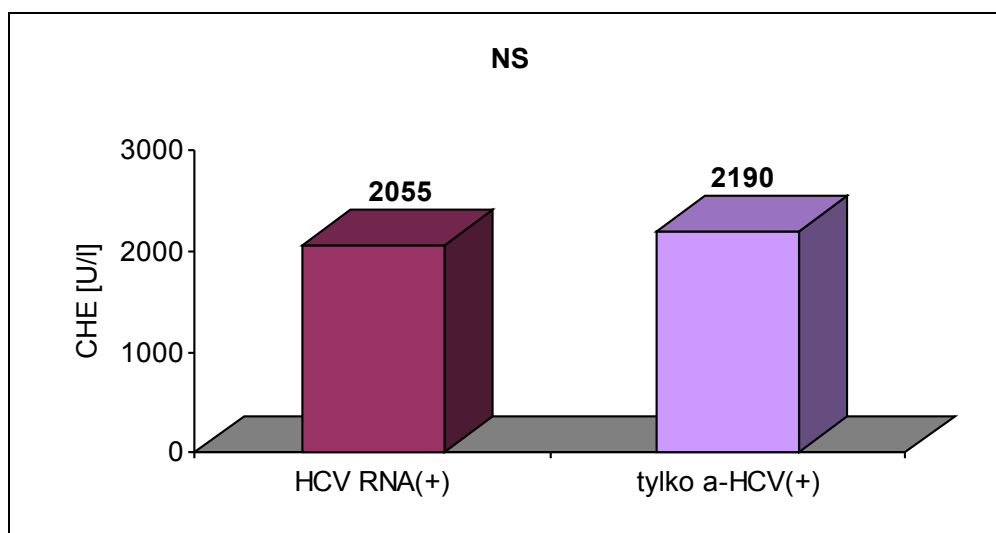
Aktywność fosfatazy alkalicznej u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C ($p=0,035$).

Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w badanych grupach chorych analizując aktywność cholinesterazy, przy czym obserwuje się niższą aktywność u chorych z grupy „C” oraz „C+G” (Ryc. 23).



Rycina 23.

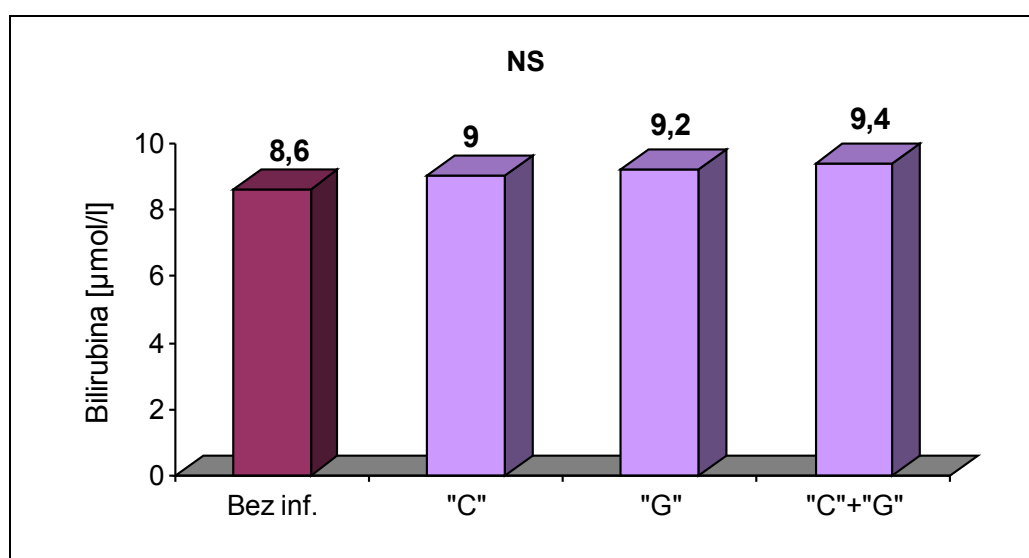
Aktywność cholinesterazy w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anty-HCV i anty-HGV).



Rycina 24.

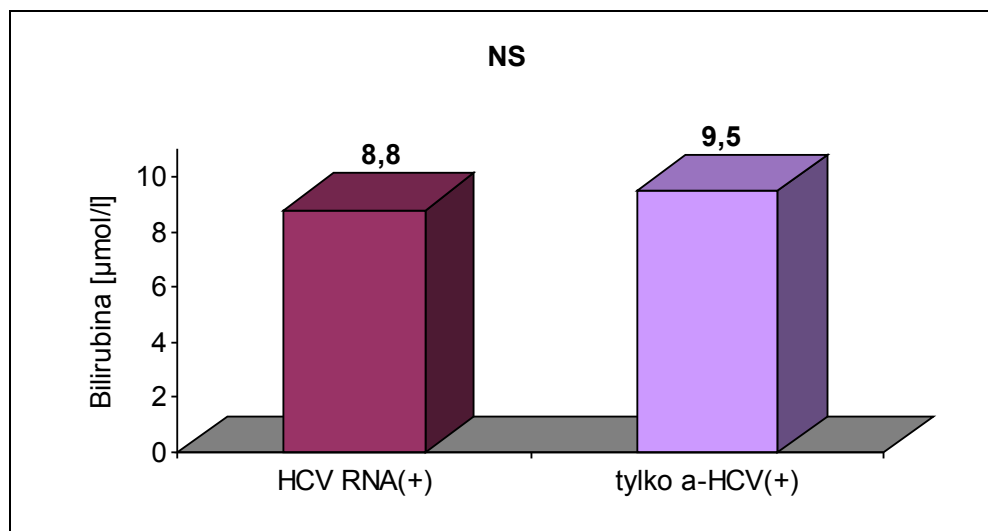
Aktywność cholinesterazy u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa (NS).

Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy w badanych grupach chorych analizując poziom bilirubiny (Ryc. 25).



Rycina 25.

Poziom bilirubiny w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 26.

Poziom bilirubiny u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

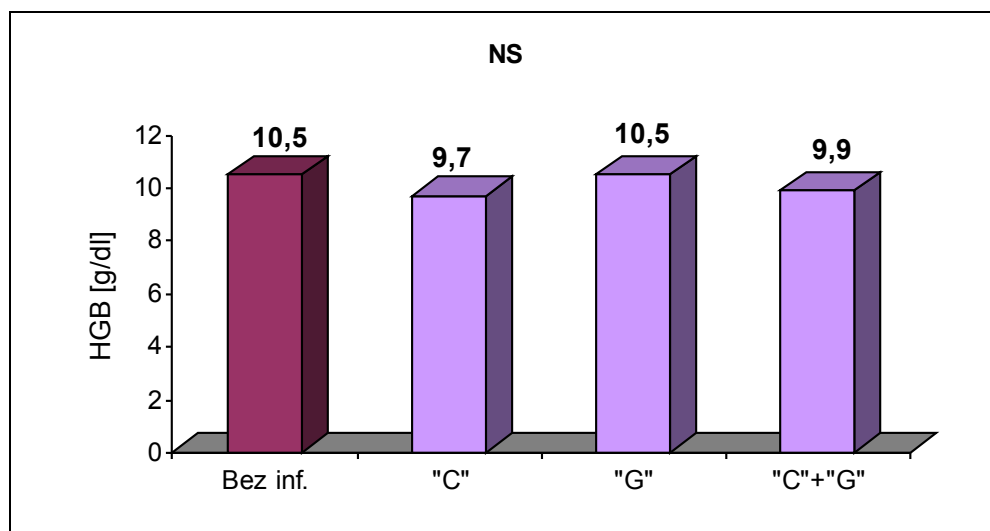
Tabela V. Średnie wartości aktywności wybranych enzymów i stężenie bilirubiny w badanych grupach.

Badanie	Bez inf (n=39)	„C” (n=12)	„G” (n=22)	„C”+”G” (n=20)
	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)
AspAT (U/l)	20,2 ± 14,2 (6,3 – 75,1)	23,8 ± 15,9 (7,8 – 57,3)	27,2 ± 37,2 (7,9 – 172)	24,7 ± 9,7 (11,9 – 54)
AlAT (U/l)	19,1 ± 16,7 (2,1 – 103,1)	30,0 ± 30,8 (3,8 – 105,5)	36,2 ± 63,9 (6,6 – 291)	28,9 ± 17,5 (11,1 – 81,5)
GGPT (U/L)	43,4 ± 61,1 (9,7 – 238)	71,8 ± 88,8 (6,8 – 318,3)	65,5 ± 81,2 (8,9 – 313,8)	49,5 ± 67,7 (12,9 – 297)
Fosfataza alkaliczna (U/l)	245,4 ± 98,4 (104 – 511)	346 ± 207,3 (102 – 706)	270,0 ± 125,2 (103 – 507)	345,1 ± 181,8 (116 – 855)
CHE (U/l)	2169 ± 397 (1587– 2185)	1988 ± 463 (1195– 2537)	2162 ± 417 (1435– 3200)	2082 ± 556 (1000– 3186)
Bilirubina (µmol/l)	8,6 ± 2,3 (4,4 – 14,7)	9,0 ± 2,2 (6,4 – 14,6)	9,2 ± 4,4 (4,6 – 25,6)	9,4 ± 1,9 (6,3 – 13,8)

Tabela VI. Analiza istotności różnic obserwowana w zakresie aktywności wybranych enzymów i stężenia bilirubiny w badanych grupach chorych.

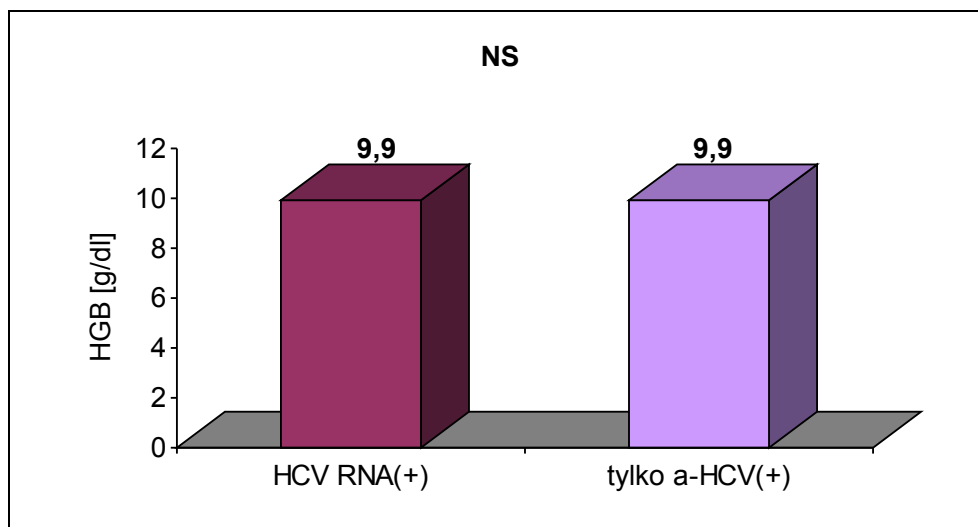
Badanie	Istotność różnic pomiędzy grupami			
	Bez inf. vs „C”	Bez inf. vs „G”	Bez inf. vs „C”+„G”	„C” vs „G”
AspAT (U/l)	NS	NS	p=0,007	NS
AlAT (U/l)	NS	NS	p=0,005	NS
GGPT (U/l)	NS	NS	NS	NS
Fosfataza alkaliczna (U/l)	p=0,019	NS	p=0,021	NS
CHE (U/l)	NS	NS	NS	NS
Bilirubina (μmol/l)	NS	NS	NS	NS

Analizując poziom hemoglobiny, wartość hematokrytu oraz liczbę erytrocytów nie znaleziono statystycznie znamienych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami chorych, natomiast obserwuje się statystycznie znamienne różnice porównując liczbę płytek krwi pomiędzy pacjentami bez infekcji, a chorymi z markerami wskazującymi na infekcję HCV (p=0,045) (Ryc. 33).



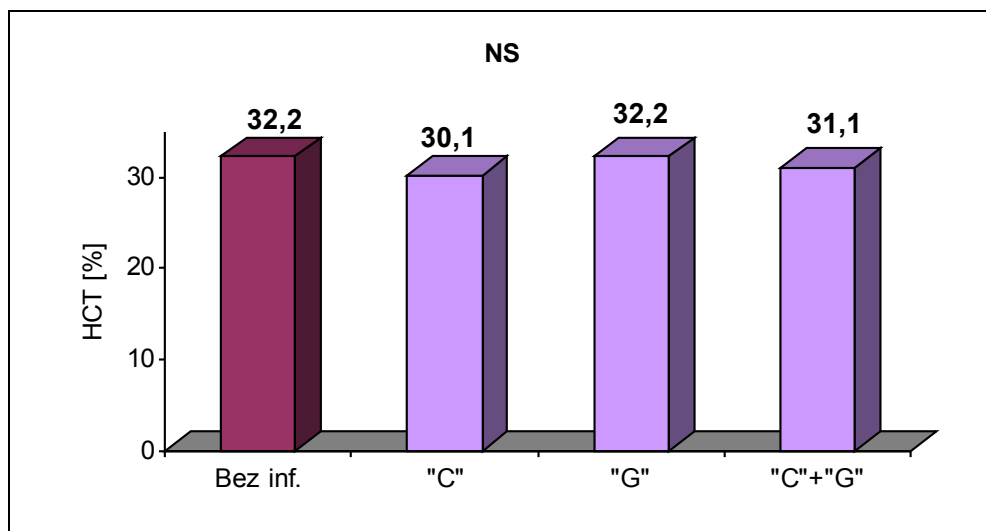
Rycina 27.

Poziom hemoglobiny w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



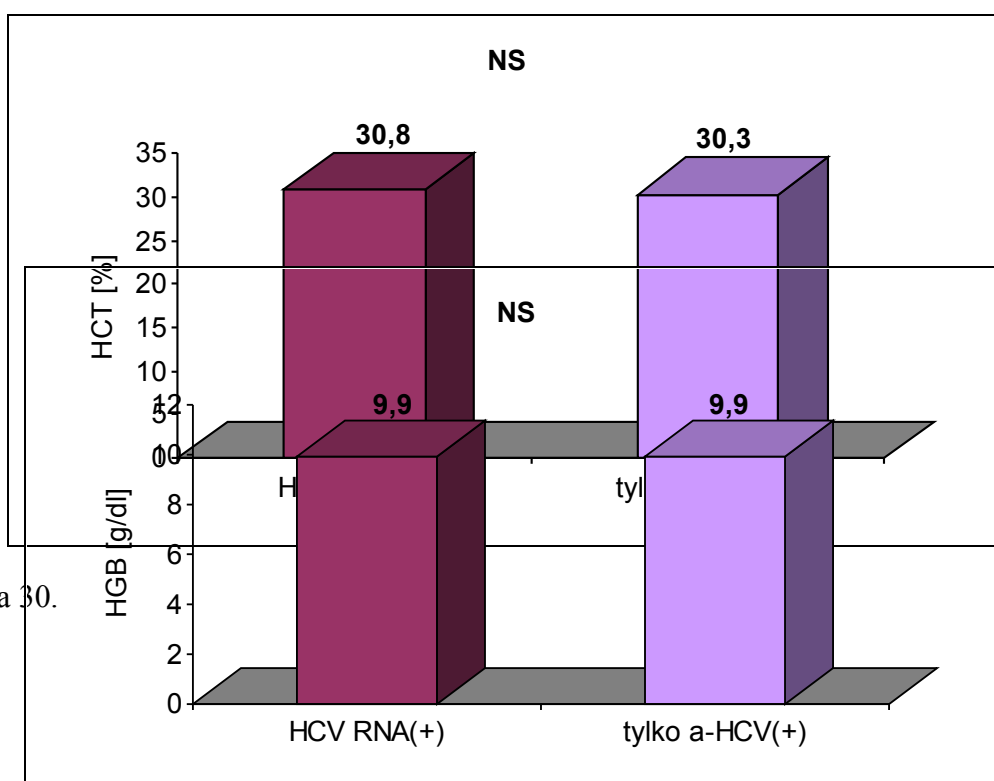
Rycina 28.

Poziom hemoglobiny u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV, lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



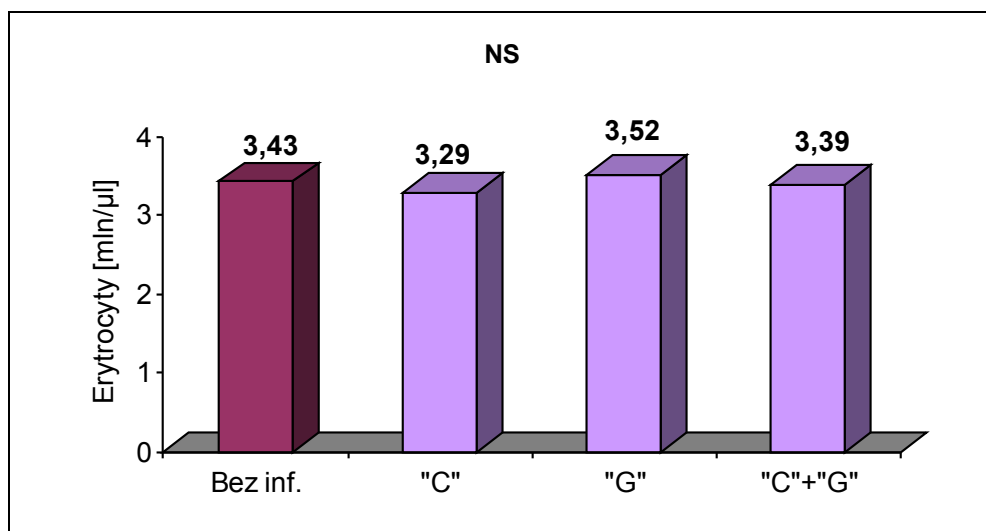
Rycina 29.

Wartości hematokrytu w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



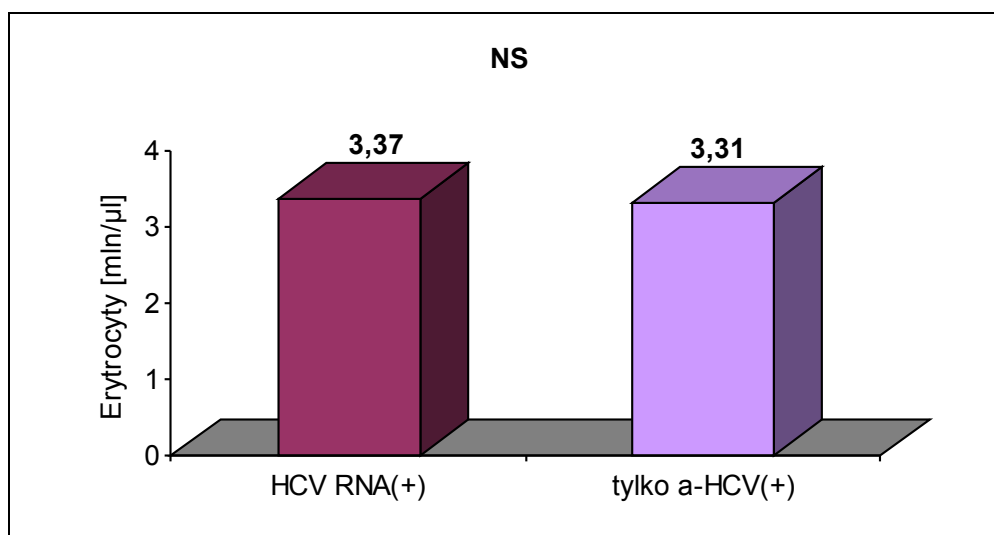
Rycina 30.

Wartość hematokrytu u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



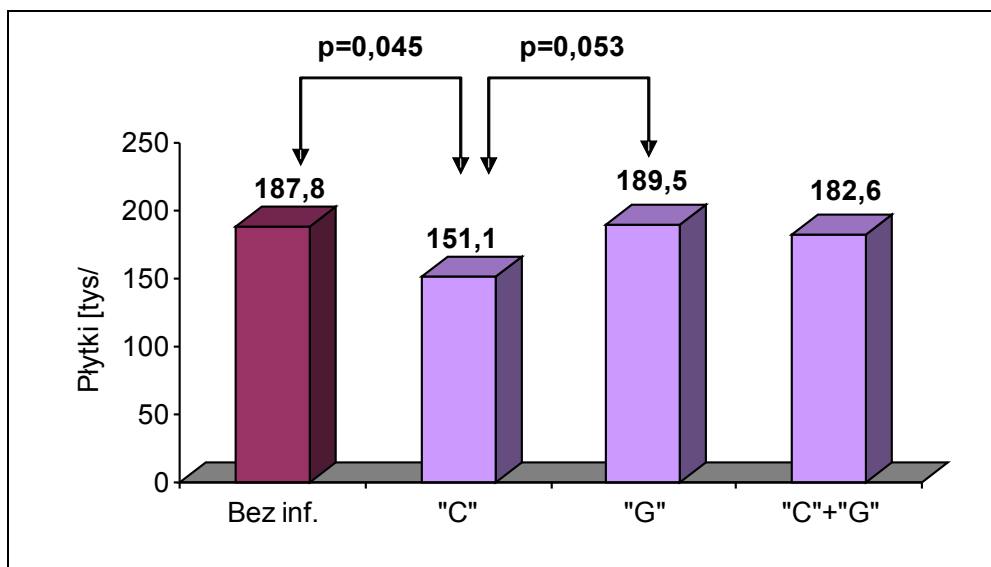
Rycina 31.

Liczba erytrocytów w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 32.

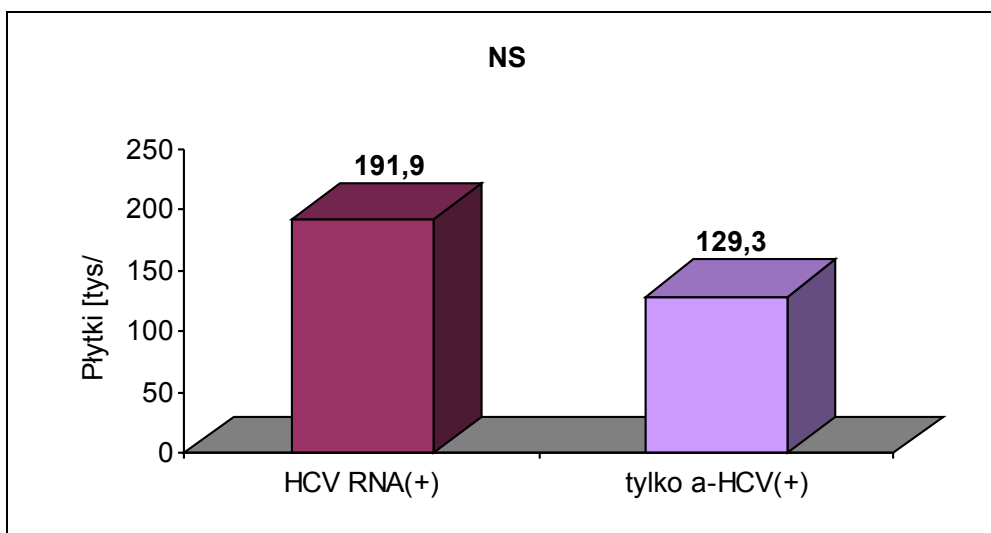
Liczba erytrocytów u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



Rycina 33.

Liczba płytek krwi w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).

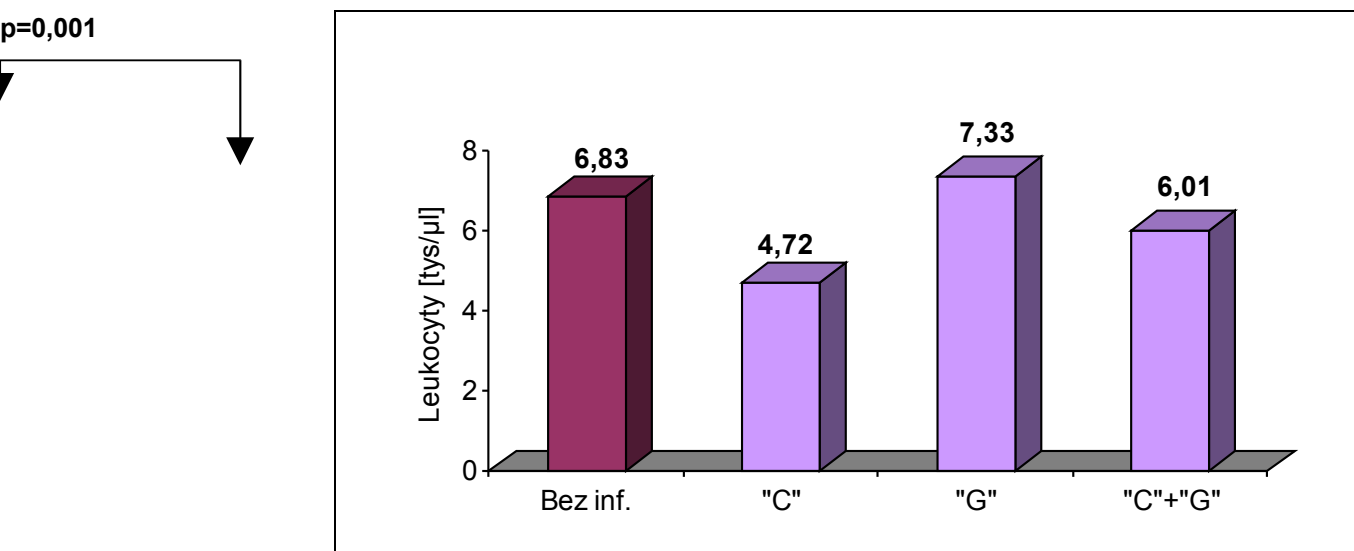
Nie znaleziono istotnych różnic porównując pacjentów, u których stwierdzono materiał genetyczny wirusa HCV z pacjentami, u których obserwowano jedynie obecność przeciwciał anti-HCV (Ryc. 34).



Rycina 34.

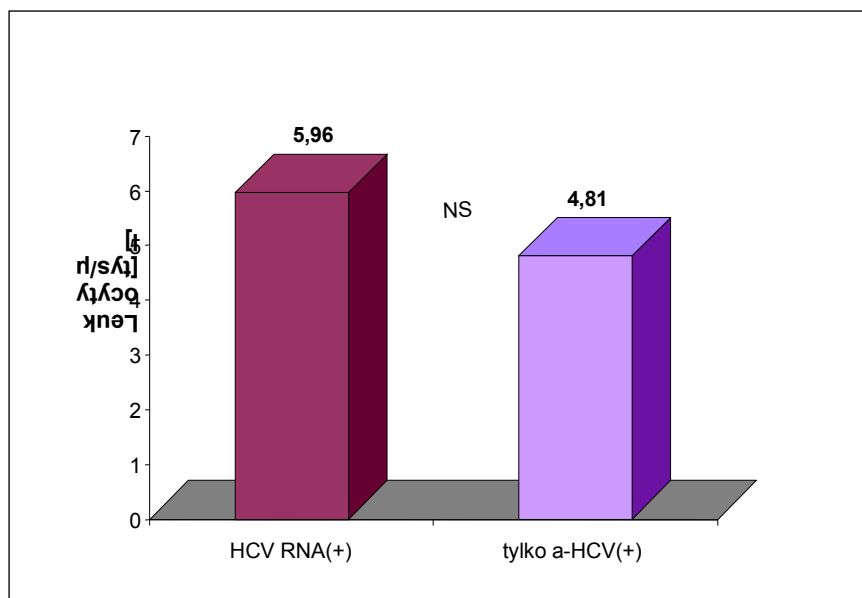
Liczba płytek krwi u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

Analizując liczbę leukocytów w poszczególnych grupach, zaobserwowano zależność statystyczną pomiędzy grupą chorych bez infekcji, a grupą pacjentów zakażonych wirusem C (Ryc. 35).



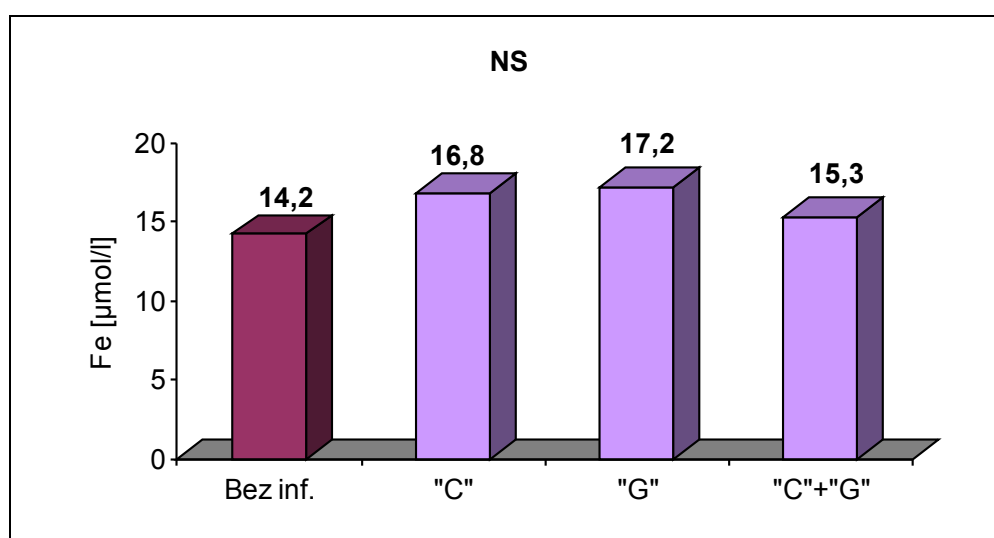
Rycina 35.

Liczba leukocytów w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).

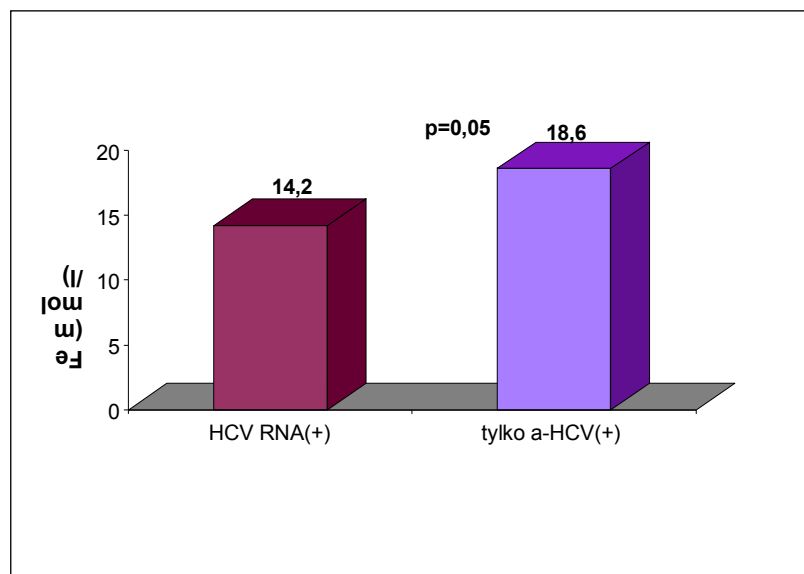


Rycina 36.

Liczba leukocytów u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



Rycina 37. Poziom żelaza w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 38.

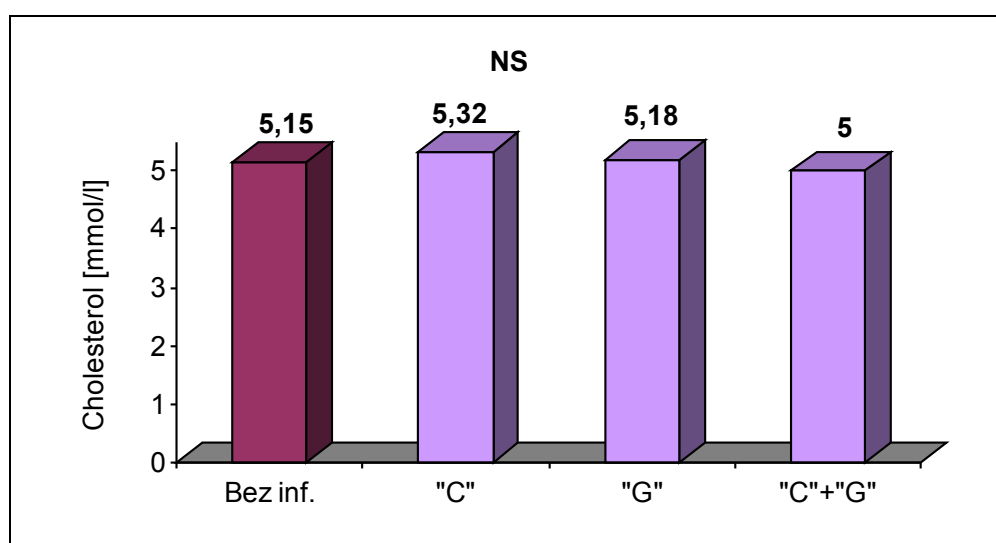
Poziom żelaza u chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

Tabela VII. Wartości średnie wybranych parametrów morfologii i poziomu żelaza w badanych grupach.

Badanie	I Bez inf. (n=39)	II „C” (n=12)	III „G” (n=22)	IV „C”+”G” (n=20)
	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)
HGB (g/dl)	10,5 ± 1,5 (7,9 – 13,9)	9,7 ± 1,2 (8 – 11,9)	10,5 ± 1,2 (8,1 – 13,1)	9,9 ± 1,3 (7,6 – 13,5)
HCT (%)	32,2 ± 4,5 (24,1 – 42,5)	30,1 ± 3,6 (24,5 – 36,5)	32,2 ± 3,7 (25,3 – 40,6)	31,1 ± 4,3 (23,6 – 42,7)
Erytrocyty (mln/μl)	3,43 ± 0,48 (2,32 – 4,65)	3,29 ± 0,49 (2,55 – 4,08)	3,52 ± 0,47 (2,6 – 4,69)	3,39 ± 0,47 (2,52 – 4,50)
Płytki krwi (tys./μl)	187,8 ± 61,3 (82 – 419)	151,1 ± 73,8 (72 – 299)	189,5 ± 64,0 (75 – 280)	182,6 ± 88,2 (59 – 465)
Leukocyty (tys./μl)	6,83 ± 1,99 (2,03 – 12,17)	4,72 ± 1,49 (2,75 – 7,40)	7,33 ± 4,92 (2,35 – 26,1)	6,01 ± 2,13 (2,75 – 12,1)
Fe (μmol/l)	14,2 ± 5,4 (5,4 – 29,2)	16,8 ± 6,9 (8,5 – 32)	17,2 ± 7,7 (8,9 – 42,7)	15,3 ± 5,8 (7,9 – 30,9)

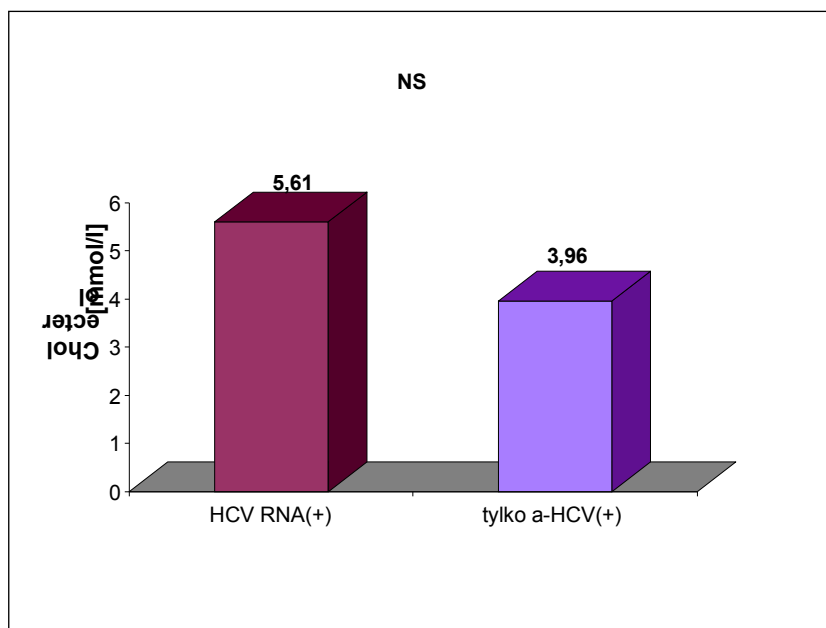
Tabela VIII. Analiza istotności różnic w zakresie parametrów morfologii i poziomu żelaza w badanych grupach.

Badanie	Istotność różnic pomiędzy grupami			
	Bez inf. vs „C”	Bez inf. vs „G”	Bez inf. vs „C”+„G”	„C” vs „G”
HGB (g/dl)	NS	NS	NS	NS
HCT (%)	NS	NS	NS	NS
Erytrocyty (mln/ μ l)	NS	NS	NS	NS
Płytki krwi (tys./ μ l)	p=0,045	NS	NS	p=0,053
Leukocyty (tys./ μ l)	p<0,001	NS	NS	NS
Fe (μ mol/l)	NS	NS	NS	NS



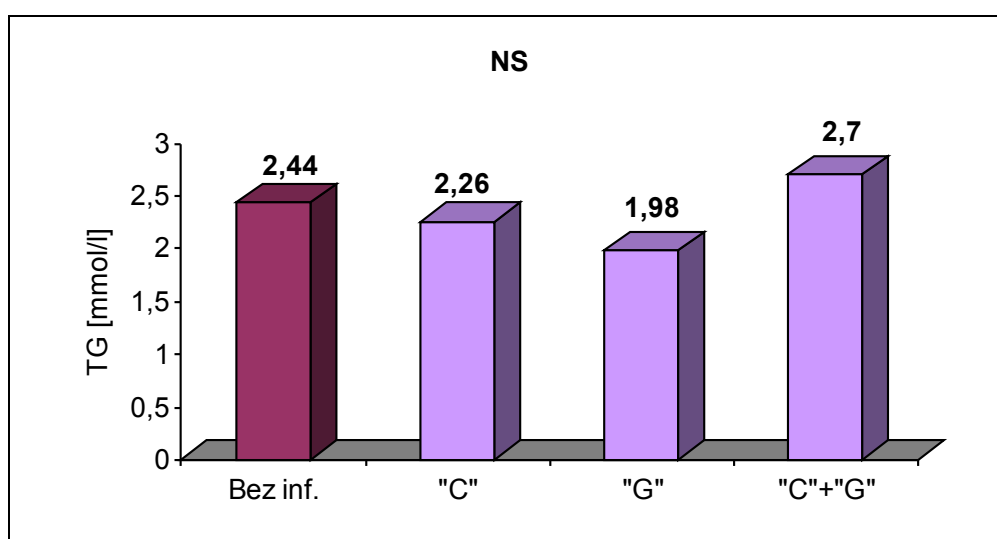
Rycina 39.

Poziom cholesterolu całkowitego w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i Glub przeciwciał anty-HCV i anty-HGV).



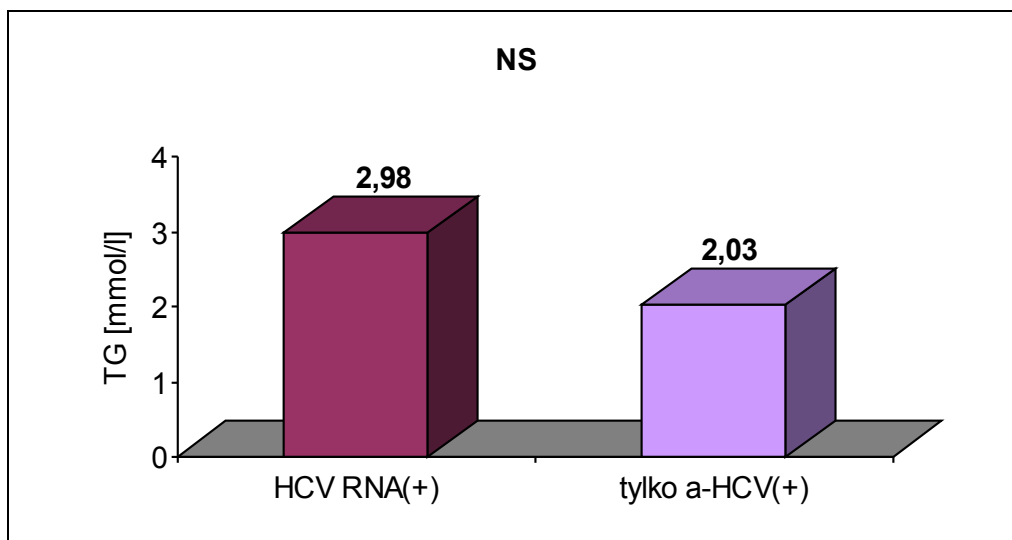
Rycina 40.

Poziom cholesterolu całkowitego w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



Rycina 41.

Poziom triglicerydów w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 42.

Poziom triglicerydów w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

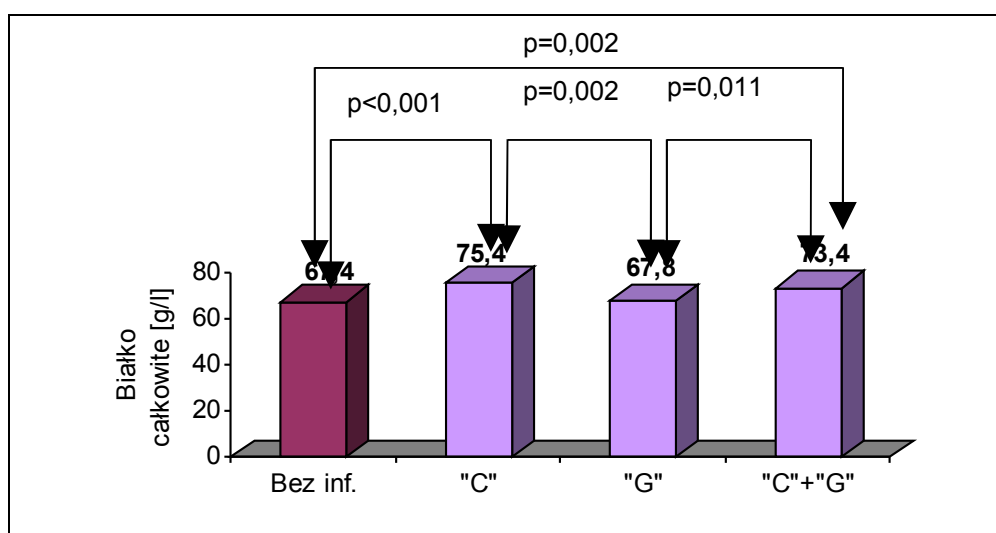
Tabela IX. Wartości średnie cholesterolu i triglicerydów w badanych grupach.

Badanie	I	II	III	IV
	Bez inf. (n=39)	„C” (n=12)	„G” (n=22)	„C”+„G” (n=20)
	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)
Cholesterol (mmol/l)	5,15 ± 0,93 (3,65 – 7,68)	5,32 ± 2,24 (3,2 – 7,5)	5,18 ± 1,44 (2,80 – 8,50)	5,00 ± 1,29 (3,3 – 6,8)
TG (mmol/l)	2,44 ± 1,10 (0,98 – 6,39)	2,26 ± 1,20 (1,16 – 3,90)	1,98 ± 0,75 (0,71 – 3,21)	2,70 ± 1,22 (1,22 – 5,20)

Tabela X. Analiza istotności różnic w zakresie cholesterolu i triglicerydów obserwowana w badanych grupach.

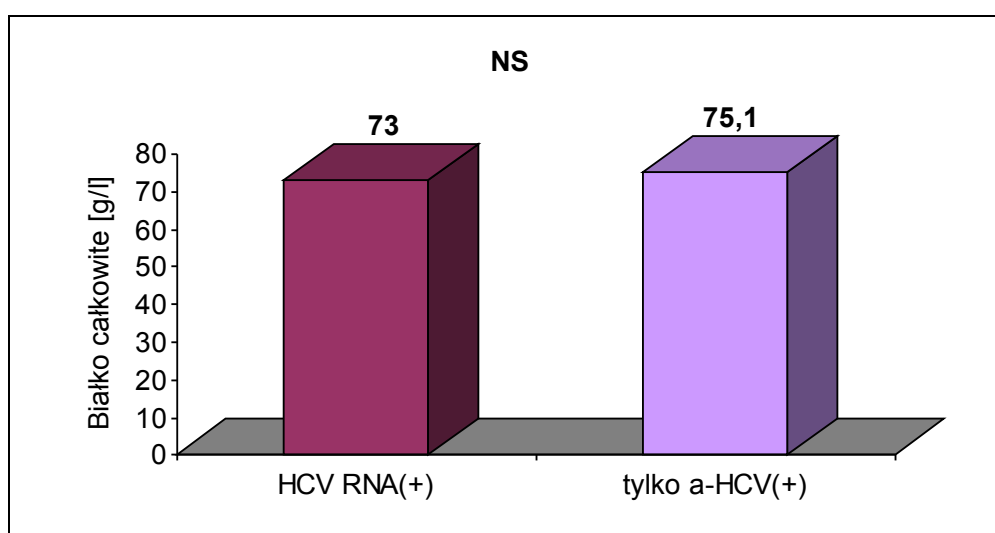
Badanie	Istotność różnic pomiędzy grupami			
	Bez inf. vs „C”	Bez inf. vs „G”	Bez inf. vs „C”+„G”	„C” vs „G”
Cholesterol (mmol/l)	NS	NS	NS	NS
TG (mmol/l)	NS	NS	NS	NS

Analizując poziom białka całkowitego wykazano statystycznie znamiennej różnicę pomiędzy grupą „bez infekcji”, a grupami chorych zakażonych wirusem C oraz wirusami C i G. Istnieje statystycznie znamiennej różnica pomiędzy grupą „G” oraz grupą o infekcji mieszanej „C+G” (Ryc. 43).



Rycina 43.

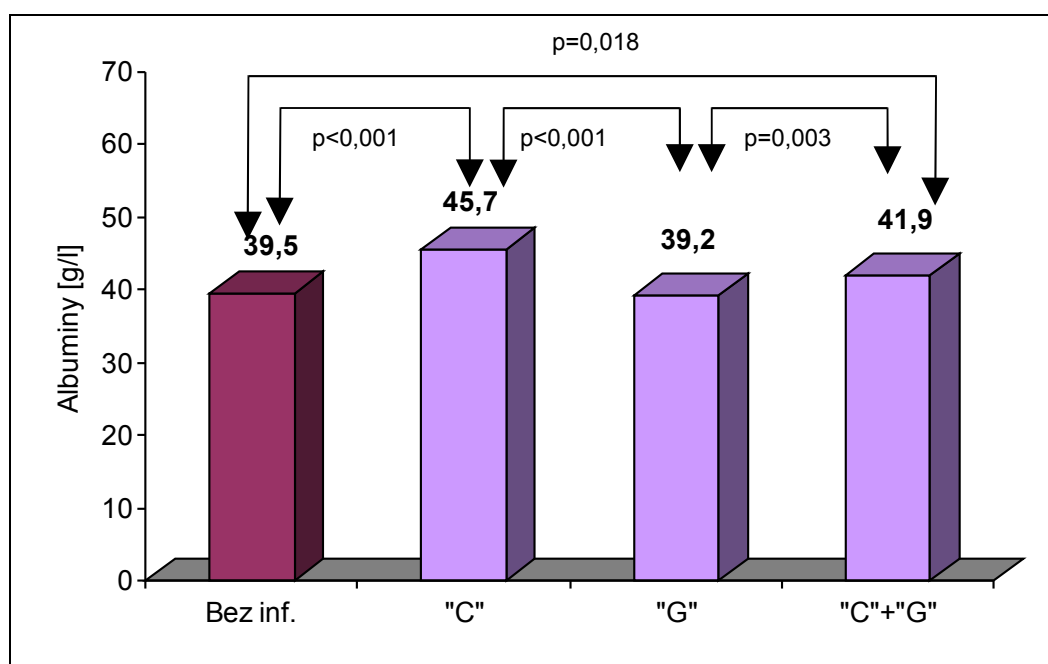
Poziom białka całkowitego w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 44.

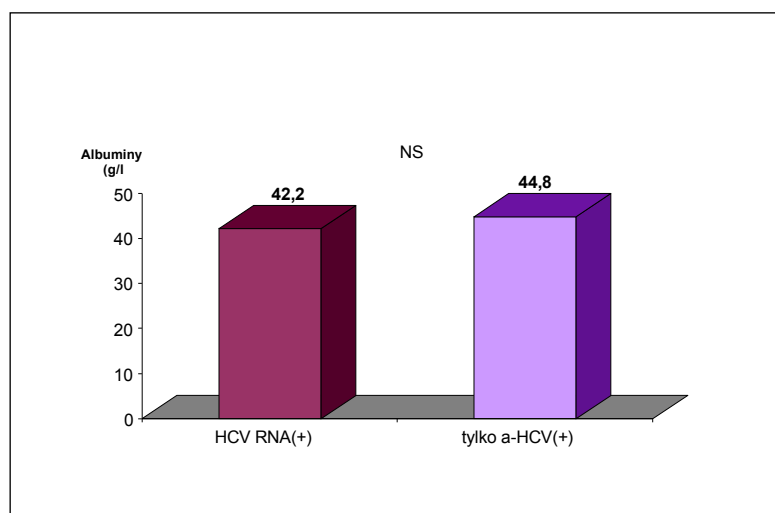
Poziom białka całkowitego w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

Podobne zależności jak w przypadku białka całkowitego stwierdzono w zakresie poziomu albumin (Ryc. 45).



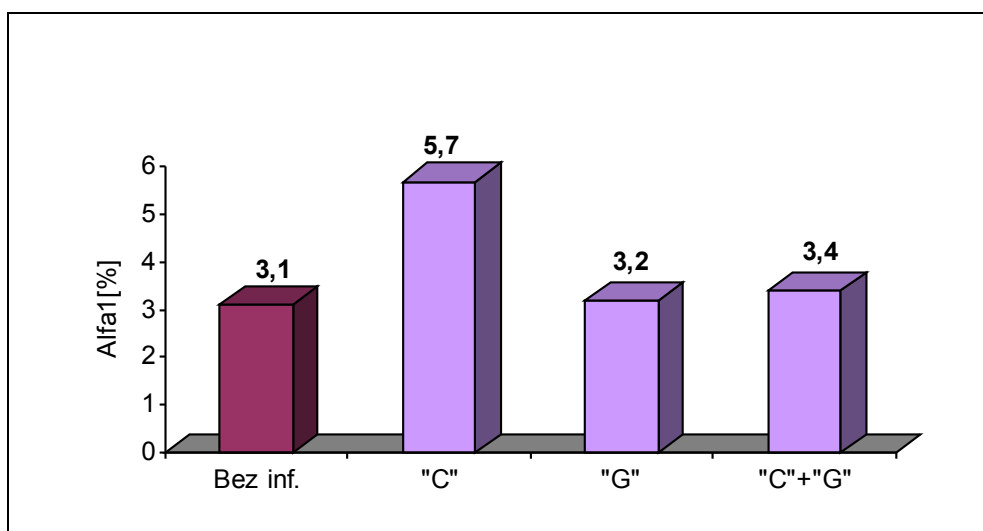
Rycina 45.

Poziom albumin w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 46.

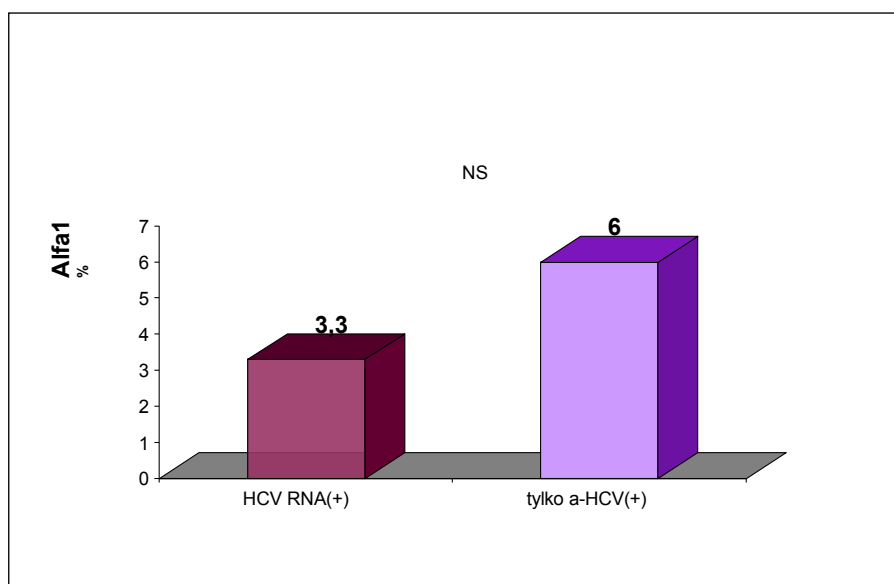
Poziom albumin w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



Rycina 47.

Procentowa zawartość alfa 1 globulin w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).

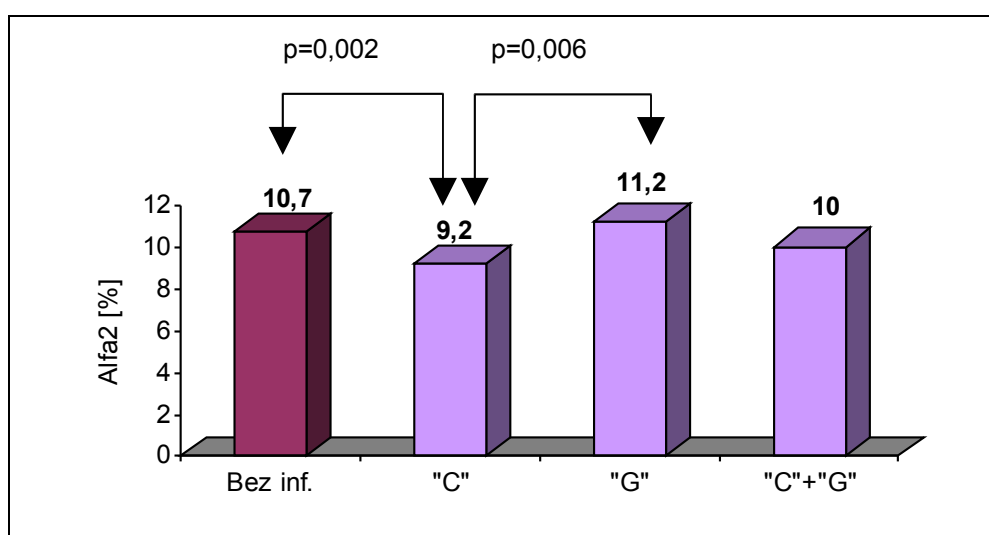
Procentowa zawartość alfa 1 globulin w grupie chorych z infekcją wirusem typu C była istotnie wyższa od zawartości w grupie chorych bez stwierdzonej infekcji.



Rycina 48.

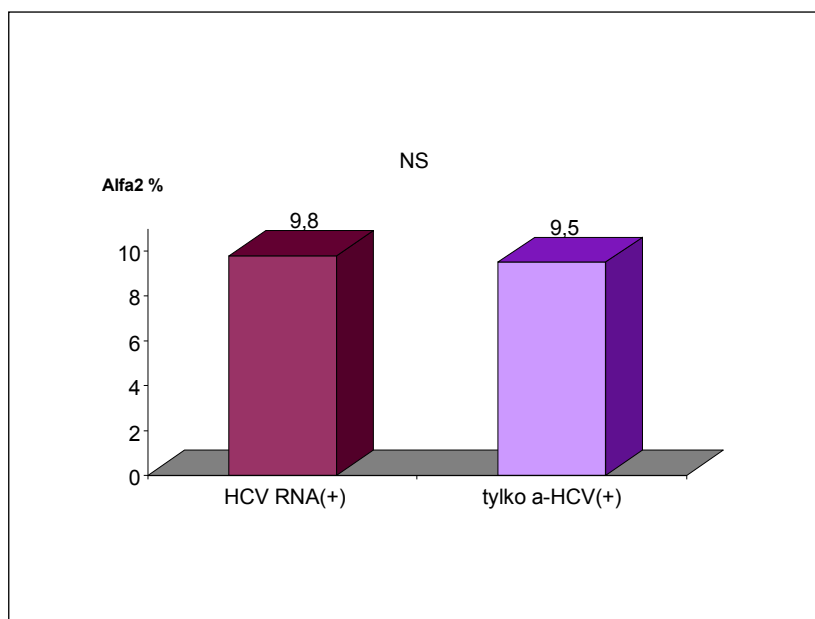
Procentowa zawartość alfa 1 globulin w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa.

Chorzy zakażeni wirusem C zapalenia wątroby wykazywali istotnie niższy odsetek alfa 2 globulin w porównaniu z chorymi zakażonymi wirusem G oraz wolnymi od infekcji (Ryc. 49).



Rycina 49.

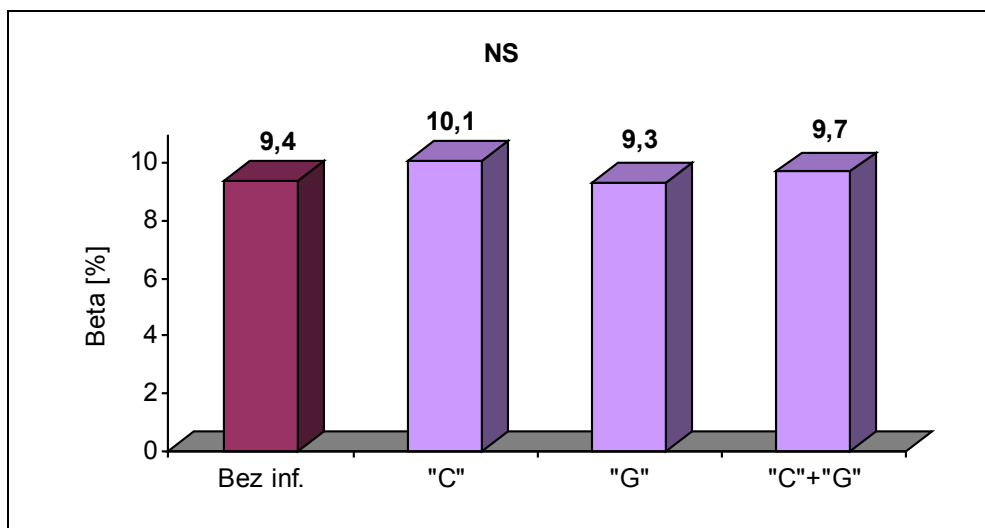
Procentowa zawartość alfa 2 globulin w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 50.

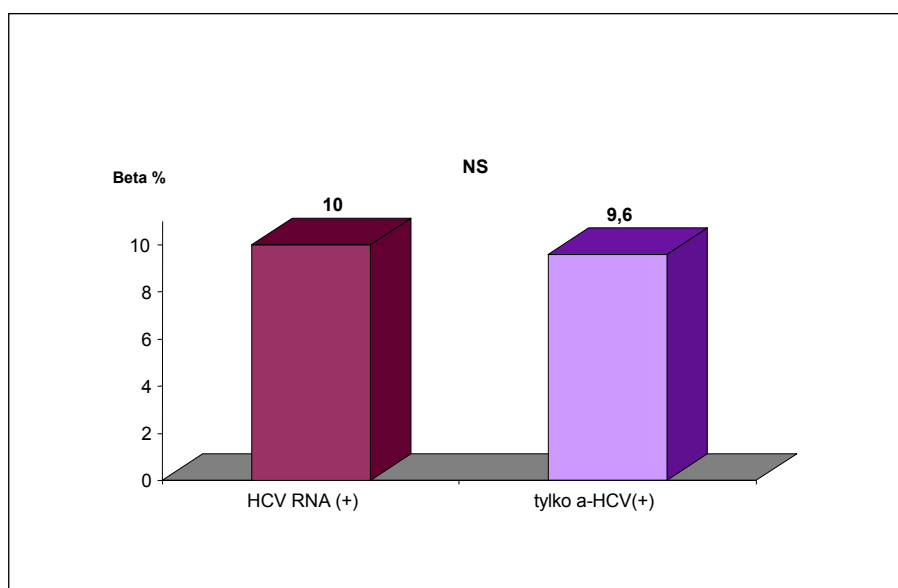
Procentowa zawartość alfa 2 globulin w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

Zawartość betaglobulin (Ryc. 51) i wskaźnik protrombiny (Ryc. 55) nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami chorych. Chorzy zakażeni wirusem G wykazywali istotnie niższy odsetek gammaglobulin w stosunku do grupy zakażonych wirusem C (Ryc. 53).

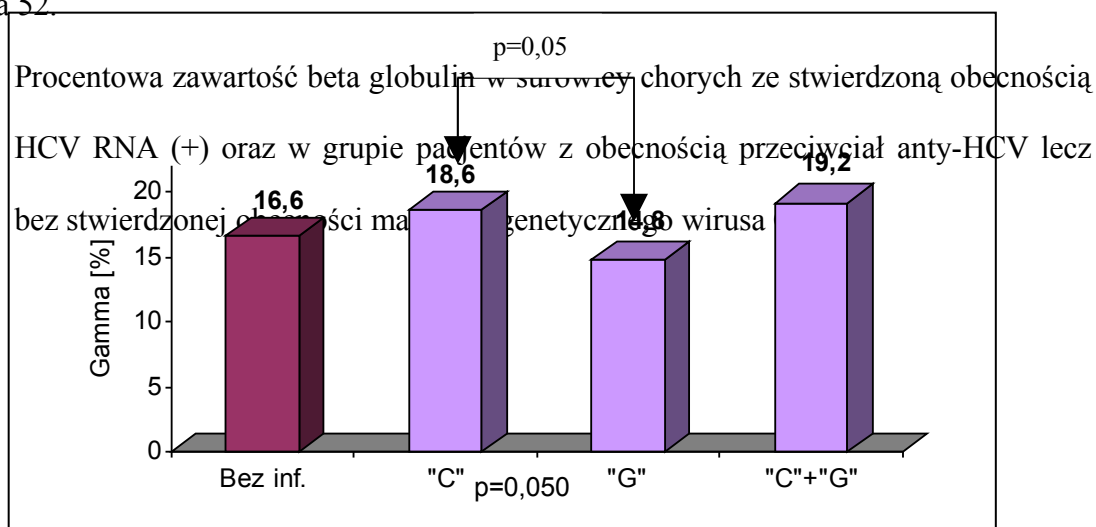


Rycina 51.

Procentowa zawartość globulin beta w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).

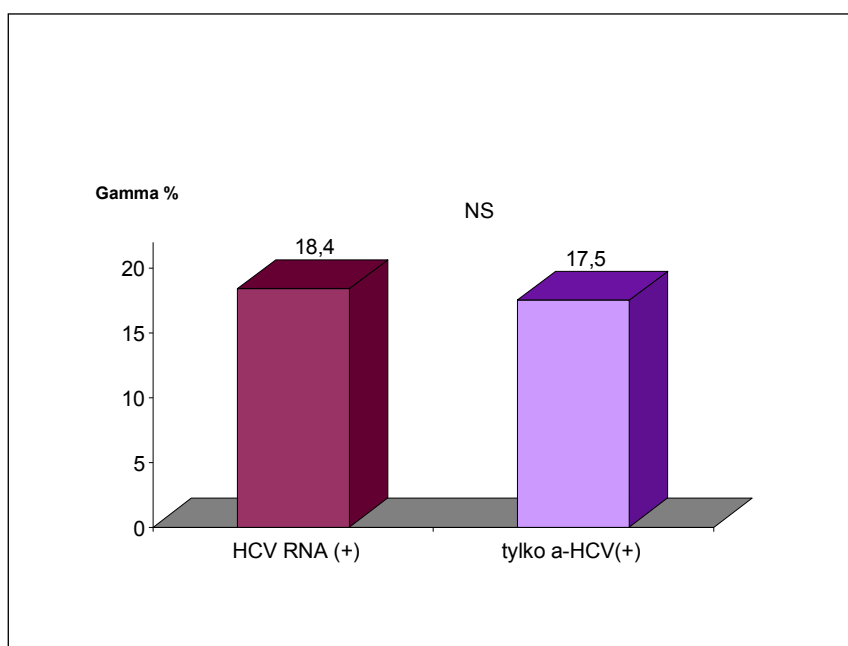


Rycina 52.



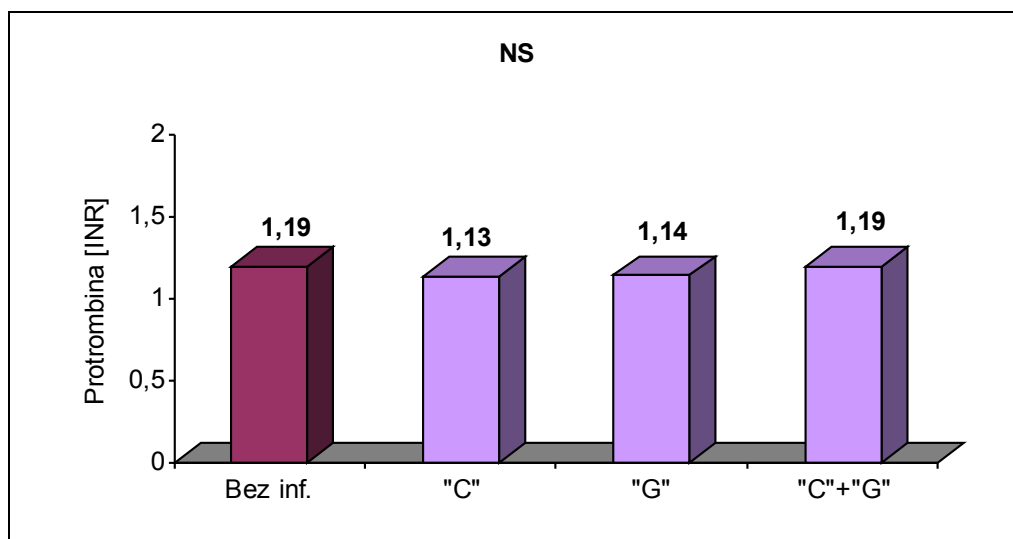
Rycina 53.

Procentowa zawartość globulin gamma w surowicy krwi, w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



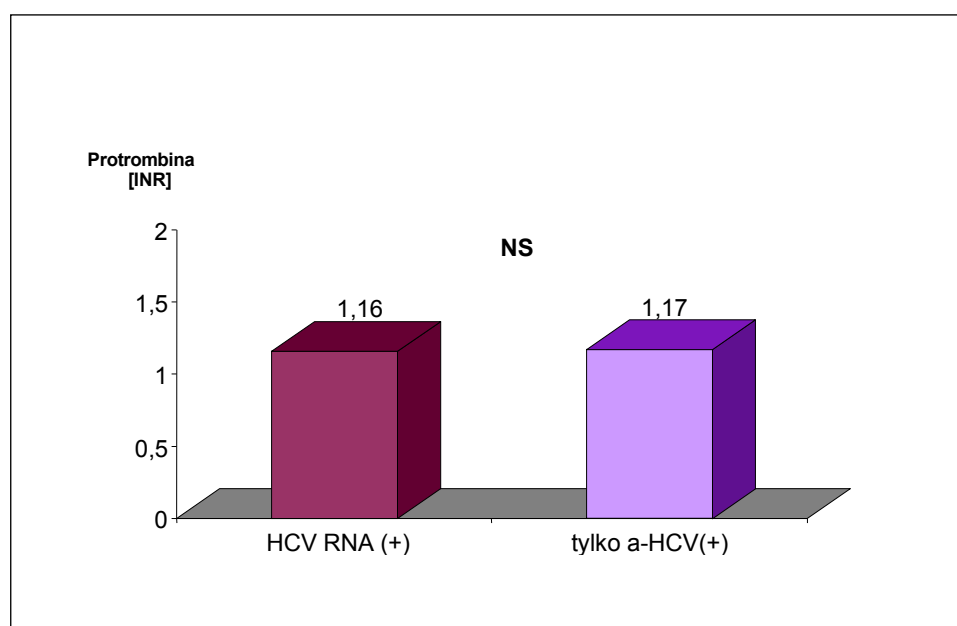
Rycina 54.

Procentowa zawartość gamma globulin w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.



Rycina 55.

Wskaźnik protrombiny w badanych grupach chorych dializowanych z uwzględnieniem podziału na markery (obecność materiału genetycznego wirusa C i G lub przeciwciał anti-HCV i anti-HGV).



Rycina 56.

Wskaźnik protrombiny w surowicy chorych ze stwierdzoną obecnością HCV RNA (+) oraz w grupie pacjentów z obecnością przeciwciał anti-HCV lecz bez stwierdzonej obecności materiału genetycznego wirusa C.

Tabela XI. Wartości średnie wybranych parametrów w badanych grupach.

Badanie	I Bez inf. (n=39)	II „C” (n=12)	III „G” (n=22)	IV „C”+„G” (n=20)
	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)	x ± SD (min-max)
Białko całkowite (g/l)	67,4 ± 6,8 (48 – 83)	75,4 ± 4,6 (66 – 83)	67,8 ± 6,4 (59 – 79)	73,4 ± 6,2 (62 – 84)
Albuminy (g/l)	39,5 ± 4,7 (26,9 – 48,9)	45,7 ± 2,5 (40,3 – 48,9)	39,2 ± 3,3 (33 – 47,3)	41,9 ± 4,1 (31,5 – 47,9)
Alfa1 (%)	3,1 ± 0,9 (1,6 – 6,6)	5,7 ± 8,3 (1,6 – 32)	3,2 ± 0,6 (2,4 – 4,1)	3,4 ± 1,0 (1,8 – 5,6)
Alfa2 (%)	10,7 ± 1,8 (7,5 – 16,0)	9,2 ± 1,1 (7,7 – 11,2)	11,2 ± 1,9 (7,2 – 13,8)	10,0 ± 1,5 (7,5 – 13,4)
Beta (%)	9,4 ± 1,5 (6,8 – 13,7)	10,1 ± 1,7 (7,2 – 13,4)	9,3 ± 1,0 (7,7 – 11,2)	9,7 ± 2,0 (7,0 – 13,4)
Gamma (%)	16,6 ± 6,1 (7,8 – 40,2)	18,6 ± 2,1 (14,4 – 21,8)	14,8 ± 4,5 (8,5 – 25,4)	19,2 ± 5,7 (10,9 – 32,2)
Protrombina (INR)	1,19 ± 0,19 (0,93 – 1,8)	1,13 ± 0,10 (1,0 – 1,35)	1,14 ± 0,12 (0,9 – 1,40)	1,19 ± 0,24 (0,9 – 1,93)

Tabela XII. Analiza istotności różnic obserwowana w badanych grupach chorych.

Badanie	Istotność różnic pomiędzy grupami			
	Bez inf. vs „C”	Bez inf. vs „G”	Bez inf. vs „C”+„G”	„C” vs „G”
Białko całkowite (g/l)	P<0,001	NS	p=0,002	p=0,002
Albuminy (g/l)	P<0,001	NS	p=0,018	p<0,001
Alfa1 (%)	P=0,024	NS	NS	NS
Alfa2 (%)	p=0,002	NS	NS	p=0,006
Beta (%)	NS	NS	NS	NS
Gamma (%)	NS	NS	NS	p=0,050
Protrombina (INR)	NS	NS	NS	NS

Tabela XIII. Obraz ultrasonograficzny wątroby w wybranych grupach chorych.

USG Wątroby	I Bez inf (n=37)	II „C” (n=12)	III „G” (n=20)	IV „C”+”G” (n=20)
W normie	20 (54,1%)	2 (16,7%)	8 (40,0%)	2 (10,0%)
powiększona	13 (35,1%)	8 (6,7%)	7 (35,0%)	14 (70,0%)
hiperechogeniczna	6 (16,2%)	7 (5,8%)	5 (25,0%)	9 (45,0%)
nieregularny obrys	1 (2,7%)	0	0	1 (5,0%)
niejednorodna	4 (10,8%)	2 (16,7%)	0	4 (20,0%)
torbiele, powiększona	2 (5,4%)	0	3 (15,0%)	0
hiperechogeniczna, niepowiększona	2 (5,4%)	1 (8,3%)	2 (10,0%)	4 (20,0%)

Tabela XIV. Obraz ultrasonograficzny śledziony w badanych grupach chorych (ocena wielkości).

USG śledziony	I Bez inf (n=37)	II „C” (n=12)	III „G” (n=20)	IV „C”+”G” (n=20)
w normie	71 (78,4%)	5 (41,7%)	16 (80,0%)	3 (15,0%)
usunięta	1 (2,7%)	0	1 (5,0%)	1 (5,0%)
powiększona	29 (18,9%)	7 (58,3%)	3 (15,0%)	16 (80,0%)
RAZEM	37 (100%)	12 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

Chi²=29,005 p<0,001

Tabela XV. Obraz ultrasonograficzny żyły wrotnej w badanych grupach chorych (ocena średnicy).

USG żyły wrotnej	Bez inf.	„C”	„G”	„C”+”G”
w normie	28 (75,7%)	4 (33,3%)	16 (80,0%)	4 (20,0%)
Średnica graniczna (11-12 mm)	8 (21,6%)	6 (50,0%)	2 (10,0%)	11 (55,0%)
Średnica >12 mm	1 (2,7%)	2 (16,7%)	2 (10,0%)	5 (25,0%)
RAZEM	37 (100%)	12 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

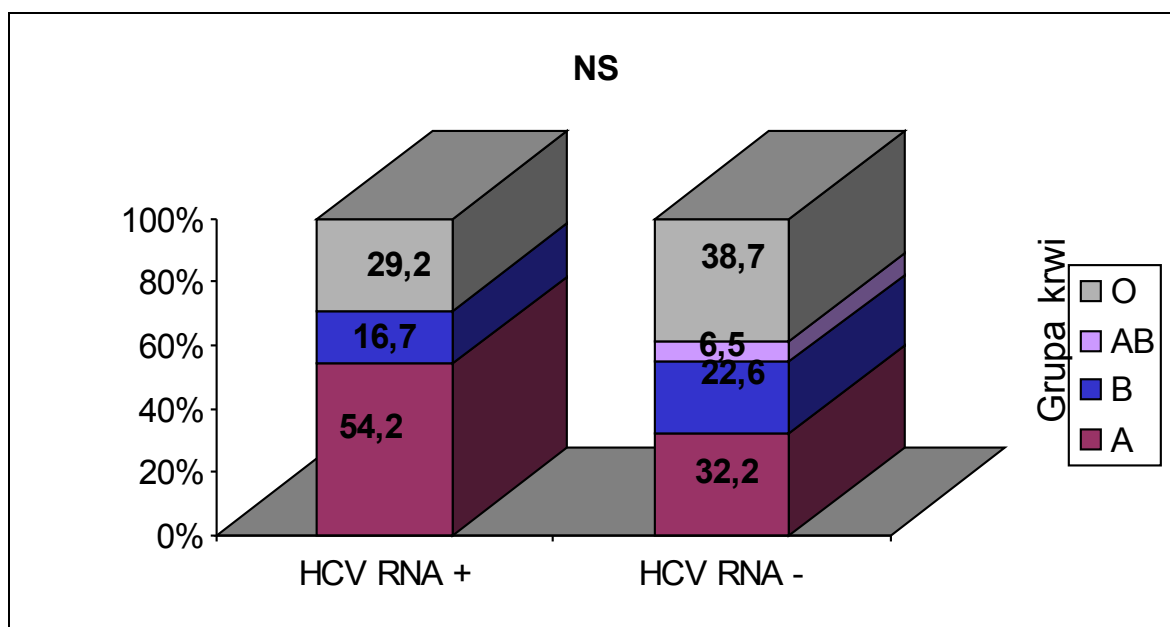
Tabela XVI. Obraz ultrasonograficzny żyły śledzionowej w badanych grupach chorych (ocena średnicy).

USG żyły śledzionowej	Bez inf.	„C”	„G”	„C”+”G”
w normie	31 (86,1%)	4 (33,3%)	17 (89,5%)	3 (15,8%)
Średnica graniczna (8-9 mm)	3 (8,3%)	6 (50,0%)	1 (5,3%)	10 (52,6%)
Średnica >9 mm	2 (5,6%)	2 (16,7%)	1 (5,3%)	6 (31,6%)
RAZEM	36 (100%)	12 (100%)	19 (100%)	19 (100%)

Tabela XVII. Analiza istotności różnic obserwowana w badanych grupach chorych.

Badanie	Istotność różnic pomiędzy grupami			
	Bez inf. vs „C”	Bez inf. vs „G”	Bez inf. vs „C”+„G”	„C” vs „G”
USG śledziony	p=0,031	NS	p<0,001	p=0,034
USG żyły wrotnej	p=0,020	NS	p<0,001	p=0,022
USG żyły śledzionowej	p=0,002	NS	p<0,001	p=0,004

Analizując zależność pomiędzy występowaniem HCV RNA a grupami krwi wykazano częstsze występowanie obecności wirusa HCV w grupie A (Ryc. 57).



Rycina 57.

Grupy krwi w układzie A,B,0 a obecność materiału genetycznego wirusa C w badanej grupie chorych.

5. DYSKUSJA

Wirus zapalenia wątroby typu C jest rozpowszechniony na całym świecie, jednakże zaznacza się wyraźny rozkład geograficzny w populacji. Największy odsetek występowania przeciwciał anti-HCV występuje w krajach północnej i centralnej Afryki (Afryka Środkowa 24%), a w rejonie Pacyfiku nawet 75%. Najniższy odsetek chorych zakażonych wirusem C opisuje się w Europie Północnej i zwiększa się im dalej na południe (Francja-1,5%, Włochy- 2-3%, Hiszpania 2-3% [4, 12, 40, 53]. W Polsce badania przesiewowe na obecność przeciwciał anti-HCV sugerują, że liczba osób przewlekle zakażonych wynosi około 500 000 [69]. W innych publikacjach, dotyczących populacji polskiej występowanie przeciwciał anti-HCV szacuje się na około 1,9% (2,3% u mężczyzn, 1,7% u kobiet) [16, 55].

Zakażenie HCV jest przenoszone w następstwie ekspozycji na krew i produkty krwiopochodne. W związku z tym do grup wysokiego ryzyka należą: pacjenci wielokrotnie hospitalizowani, poddawani częstym zabiegom chirurgicznym, chorzy, u których często przetaczano krew lub jej pochodne, pracownicy szpitali, chorzy na hemofilię, osoby uzależnione od dożylnych środków odurzających oraz pacjenci hemodializowani z powodu schyłkowej niewydolności nerek. Przed wprowadzeniem rutynowej diagnostyki dawców krwi na obecność wirusa typu C u około 10-20% biorców stwierdzano przeciwciała anti-HCV. Po wprowadzeniu w latach 1990 rutynowych testów anti-HCV częstość poprzetoczeniowych zapaleń wątroby typu C zmalała znacząco do 2% [11, 76, 81]. Obecnie większą rolę przypisuje się szerzeniu zakażenia drogami wewnątrzszpitalnymi [120, 125]. Technika zabiegu hemodializy sprzyja częstym kontaktom z wynaczynioną krwią, stąd zakażenie HCV w ośrodkach dializ przenoszone jest krzyżowo. HCV może być przenoszone poprzez: zakażone ręce personelu medycznego oraz pacjentów, aparat do hemodializy i inny sprzęt medyczny lub przedmioty wymieniane między pacjentami.

Istotną rolę w ograniczeniu szerzenia się zakażeń wirusem C w stacjach dializ odgrywa wydzielenie odrębnych stanowisk dla pacjentów zakażonych tym wirusem [116,125, 129].

Reutilizacja dializatorów nie jest istotnym czynnikiem ryzyka zakażenia HCV dla chorych dializowanych, pod warunkiem, że jest wykonywana w odrębnych pomieszczeniach dla chorych anty-HCV dodatnich oraz anty-HCV ujemnych. Ze względu na narażenie personelu medycznego, w grupie chorych anty-HCV dodatnich nie powinno się wykonywać tej procedury.

Częstość występowania zakażeń HCV u chorych hemodializowanych wynosi średnio w Europie 17,7%, w Anglii 2%, Szwecji 8,8%, Niemczech 7,5%, Hiszpanii 25%, Turcji 30%, w Polsce 18,5% (na podstawie oznaczeń przeciwciał anty-HCV) [37, 102]. W stosunku do badań prowadzonych w roku 1993, kiedy to odsetek chorych z dodatnimi przeciwciałami anty-HCV w ośrodkach Dializ Polski południowo-zachodniej wynosił 45 %, w roku 1992 w Polsce południowo-wschodniej wynosił 44,1% zaznacza się wyraźny spadek zakażonych chorych. Badania przeprowadzone w 1991 i 1997 roku w Klinice Nefrologii w Krakowie wykazały obecność przeciwciał anty-HCV odpowiednio u 39% i 25,6% chorych leczonych dializami [126, 127].

Obecnie, mimo, że liczba nowych zakażeń jest wciąż znaczna, to obserwuje się jej wyraźny spadek. Wiąże się pomiędzy innymi z wprowadzeniem u tych chorych rutynowych badań w kierunku przeciwciał anty-HCV, zastrzeżeniem reżimu sanitarnego w stacjach dializ, w tym z wydzieleniem osobnych stanowisk dializacyjnych dla tych chorych. W roku 1998 około 40 stacji dializ nie miało osobnych stanowisk dla pacjentów anty-HCV dodatnich, a w roku 2000 liczba ta zmniejszyła się do 16. Znaczący wpływ na zmniejszenie odsetka chorych zakażonych ma także spadek ilości przetaczanej krwi w związku z powszechnym stosowaniem do leczenia niedokrwistości erytropoetyny (rHuEPO) [4, 8, 124].

Wpływ na różnice odsetka chorych zakażonych ma także rodzaj leczenia nerkozastępczego. Największy odsetek notuje się u chorych hemodializowanych, mniejszy u chorych dializowanych otrzewnowo, najmniejszy u chorych leczonych metodą hemodializy domowej. Skumulowane ryzyko zakażenia u chorych leczonych CAPD w porównaniu z chorymi leczonymi hemodializami wynosi 1 : 6 [4].

Występowanie zakażeń w Klinice Nefrologii (na podstawie obecności przeciwciał anti-HCV) w latach 2000-2002 przedstawiało się odpowiednio: w 2000 roku-20,9%, w 2001 roku-16,5% a w 2002 roku- 21,2%. Wzrost odsetka zakażonych w 2002 r. wynika z faktu, że znaczną grupę chorych wolnych od zakażenia HCV przekazano do leczenia w innych ośrodkach posiadających wolne stanowiska dializacyjne. Warto zaznaczyć, że odsetek chorych zakażonych wirusem typu C w grupie dializowanych otrzewnowo był w tym okresie znamienne niższy i wahał się od 4,5-8%.

W 2003 r. w wybranej grupie chorych, których poddano analizie stwierdzono obecność anti-HCV u 18,6%. Do badania używano testów wykorzystujących metodę immunoenzymatyczną (ELISA), III generacji. Czułość tych testów oceniana jest w piśmiennictwie na około 98%, a swoistość na około 95% [28, 73]. Od momentu zidentyfikowania i opisanego wirusa C zapalenia wątroby w szybkim tempie rozwijają się metody diagnostyczne mające na celu skuteczne i pozbawiane wątpliwości rozpoznanie infekcji tym wirusem oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia.

Stwierdzenie obecności przeciwciał anti-HCV nie pozwala jednoznacznie określić czy chory jest aktualnie zakażony wirusem, do tego konieczne jest wykonanie badania stwierdzające obecność materiału genetycznego wirusa [25, 56 78, 127]. Najważniejszym testem wykrywającym zakażenie HCV jest stwierdzenie obecności w surowicy, wątrobie lub ewentualnie także w mononuklearach krwi obwodowej materiału genetycznego wirusa. W pracy badano obecność materiału genetycznego wirusa C w surowicy krwi, przy wykorzystaniu polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) z odwrotną transkrypcją (RT-

PCR). W badanej grupie pacjentów wykazujących obecność przeciwciał anti-HCV stwierdzono u 42,5 % obecność HCV-RNA. Zastosowanie metody PCR pozwala wykryć materiał genetyczny wirusa i rozpoznać infekcję przed serokonwersją, przed wytworzeniem przeciwciał anti-HCV oraz u pacjentów z zaburzeniami autoimmunologicznymi, u których otrzymano fałszywie dodatnie wyniki obecności przeciwciał. Według różnych autorów tą metodą można wykryć od 10^2 do 10^7 kopii wirusa w 1 ml surowicy [3, 40,104,108,110, 115]. W przeprowadzonych badaniach u 10,4% chorych z grupy anti-HCV ujemnych wykazano obecność HCV-RNA. Jest to stosunkowo duży odsetek i wykazany w ostatniej turze prowadzonych badań. We wcześniejszych badaniach prowadzonych w Klinice wynosił 2,6 %. Nakazuje to, traktować każdego chorego dializowanego, niezależnie od tego czy stwierdzono u niego obecność przeciwciał anti-HCV, czy też nie jako potencjalnie zakaźnego. W badaniu prowadzonym przez *Fabrizi i wsp.* (1998) przebadano 394 chorych hemodializowanych i stwierdzono u 2% wiramię (8 osób), u których nie wykazano obecności przeciwciał anti-HCV [35].

Na podstawie przeprowadzonych badań nie znaleziono korelacji pomiędzy występowaniem przeciwciał anti-HCV i/lub materiału genetycznego wirusa, a płcią chorych, jak również przyczyną przewlekłej niewydolności nerek. W pracy *Petrosillo i wsp.*, przeprowadzone badania wykazały większy odsetek infekcji HCV u kobiet - 32% niż u mężczyzn - 28%, ($p=002$) [100].

Znaczący wpływ na występowanie zakażeń HCV ma czasokres leczenia nerkozastępczego, ryzyko wzrasta o 10 % z każdym rokiem dializoterapii. W badaniach przeprowadzonych w Szwecji wykazano, iż w pierwszych 3 latach hemodializy zakażeniu ulegało 12 % chorych rocznie [30]. Badając w analizowanym materiale chorych korelację pomiędzy czasem dializoterapii, a obecnością przeciwciał anti-HCV oraz materiału genetycznego wirusa uzyskano istotną statystycznie zależność pomiędzy zmiennymi ($p<0,001$).

W wielu doniesieniach udowodniono związek występowania zwiększonej liczby chorych z dodatnimi przeciwciałami anty-HCV z wykonywanymi w przeszłości zabiegami chirurgicznymi [17, 50, 98, 99, 100]. W badanym materiale porównano grupę chorych, u których przeszłości wykonano zabieg przeszczepienia nerki z pacjentami bez wywiadu chirurgicznego i otrzymano istotną statystycznie zależność zarówno dotyczącą występowania przeciwciał jak i materiału genetycznego ($p < 0,001$). Do zakażenia może, więc dojść w trakcie zabiegu przeszczepienia nerki, ale także w czasie badań diagnostycznych, które wykonywane są celem kwalifikacji do zabiegu przeszczepienia nerki. Większość biorców nerki zostaje jednak zakażona w okresie leczenia nerkozastępczego. Częstość występowania przeciwciał anty-HCV w tej grupie chorych zależy także od sposobu leczenia nerkozastępczego, czasu leczenia, liczby przetoczeń krwi oraz liczby transplantacji [17]. Po przeszczepie nerki miano wirusa (HCV) mierzone metodą PCR zwiększa się 5-10 razy, wzrasta też aktywność aminotransferaz, a w szczególności AlAT [30, 32]. Nasilenie replikacji wirusa i szybka progresja choroby oraz reaktywacja zakażenia następuje pod wpływem stosowanego leczenia immunosupresyjnego. Pacjenci z dodatnimi przeciwciałami anty-HCV po przeszczepie nerki mają zwiększone ryzyko rozwoju infekcji oraz białkomoczu. Przeżycie przeszczepionej nerki w tej grupie jest istotnie niższe niż u HCV ujemnych biorców, a śmiertelność wyższa (jako wynik uszkodzenia mięszu wątroby i infekcji) [6, 33]. Udowodniono związek pomiędzy zakażeniem HCV a występowaniem przewlekłej glomerulopatii przeszczepu oraz przewlekłym zapaleniem kłębuszków nerkowych występującym *de novo* w nerce przeszczepionej. Dlatego w szczególności pacjenci typowani do zabiegu przeszczepienia nerki powinni być szczegółowo diagnozowani w kierunku infekcji HCV z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. W przypadku stwierdzenia obecności HCV-RNA, powinni być kwalifikowani do leczenia interferonem. Stosowanie tego leku, po przeszczepie nerki związane jest z dużym ryzykiem wstąpienia ostrego odrzucania. Przeszczepianie nerek w

przypadku, gdy dawca i biorca są anty-HCV pozytywni, także zwiększa ryzyko choroby wątroby, jak również może nastąpić nadkażenie innym genotypem wirusa.

Pomimo tego przeszczep nerki jest najlepszą opcją dla pacjentów zakażonych wirusem HCV z terminalną niewydolnością nerek [85].

W analizowanej pracy diagnostykę w kierunku zakażenia wirusem G zapalenia wątroby (przeciwciała anty-HGV) wykonano w grupie 93 pacjentów. Otrzymano wynik dodatni u 41 chorych (44,09%), z tej grupy u 22 oznaczono materiał genetyczny wirusa i otrzymano HGV-RNA (+) u 63,6% badanych. Do tej pory nie ma wiele publikacji na temat występowania zakażeń wirusem typu G zapalenia wątroby, które dotyczyłyby dużych grup pacjentów dializowanych. Jest to być może związane z dyskusyjną patogennością tego wirusa oraz wysokimi kosztami związanymi z diagnostyką. Poza tym, wirus ten został stosunkowo niedawno odkryty (w 1995 roku) i w dalszym ciągu brakuje jednoznacznych odpowiedzi na pytania dotyczące jego znaczenia chorobotwórczego. Początkowo wydawało się, że będzie on odpowiedzią na większość pytań dotyczących zapalenia wątroby o nieznaną etiologię. Tak się nie stało i wirus ten wciąż jest przedmiotem badań a świat medycyny często podważa znaczenie HGV. Z drugiej strony wykrywa się jego obecność w surowicy osób z poważnymi chorobami wątroby oraz z pozawątrobowymi. HGV jest wirusem o udokumentowanej zakaźności i zdolności do powodowania przetrwałej wirerii. Obecność wirusa HGV, nawet wieloletnia może pozostawać bezobjawowa lub może spowodować ostre lub przewlekłe zapalenie wątroby [23, 77, 95, 105, 110]. Z drugiej strony u osoby zakażonej wirusem HGV może w ogóle nie rozwinąć się żadne z tych postaci zapalenia wątroby. Trudność w ostatecznej ocenie znaczenia chorobotwórczego wirusa HGV wynika także z faktu, że większość osób, u których wykrywa się HGV jest jednocześnie zakażona innymi wirusami, najczęściej typu B i C [87, 132, 133]. Uważa się, że przewlekła wirerii oraz przewlekłe zapalenie wątroby spowodowane przez HGV występuje rzadziej, niż wywołane przez HCV. Przeważa pogląd, że infekcja może, choć nie

musi, spowodować przewlekłe zapalenie wątroby typu G. W takim zapaleniu objawy kliniczne nie występują lub są łagodne, a aktywność AlAT jest prawidłowa, czasem nieznacznie zwiększona.

Istnieją doniesienia o wyższej aktywności AspAT niż AlAT. Mało prawdopodobne jest, że izolowane zakażenie HGV prowadzi do rozwoju marskości wątroby [37, 60, 71, 107]. Obserwacja dotycząca aktywności transaminaz oraz innych biochemicznych wskaźników uszkodzenia miększu wątroby jest omówiona poniżej, gdyż rozpatrywana była zarówno infekcja HCV i HGV osobno, jak również koinfekcja tymi wirusami.

W pracy opublikowanej w roku 1998 przez *Kallinowskieoi i wsp.* opisano analizę 266 chorych hemodializowanych, poddanych diagnostyce w kierunku zakażenia HGV. Występowanie przeciwciał w tej grupie wynosiło 7,9%, natomiast w grupie kontrolnej, którą stanowili dawcy krwi 2,7%. [59].

W innej pracy, *Cornu i wsp.* wykazali obecność infekcji HGV, metodą PCR u 16% hemodializowanych w stacjach dializ w Belgii [21]. W obu badaniach nie udowodniono korelacji występowania infekcji z czasem dializoterapii, jak również z liczbą przetoczeń krwi. Porównując badania w innych krajach, we Włoszech częstość występowania infekcji wirusem HGV wynosiła: 19%, w Japonii 3% a we Francji 55% [27, 79, 114]. Z pewnością odsetek 44,09% pacjentów z dodatnimi przeciwciałami anty-HGV obserwowany w Klinice, w badanej grupie pacjentów jest wysoki, a obecność u 63,6% z tych chorych materiału genetycznego daje podstawy do kontynuowania badań nad wirusem HGV. W ocenianej grupie u 21,5 % obserwowano u współistnienie zakażenia HCV i HGV. W niektórych publikacjach udowodniono, że współwystępowanie wirusów HGV i HCV u chorych hemodializowanych jest częstym zjawiskiem [33, 38, 39, 41, 54, 117, 119, 122, 130]. Według danych z piśmiennictwa, odsetek współwystępowania koinfekcji zarówno z wirusem HCV jak i HBV jest częsty (8-65%). Uznaje się, że objawy kliniczne oraz zmiany biochemiczne i histologiczne wątroby odzwierciedlają raczej poziom wirerii HCV niż

HGV [60, 132]. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy czasem dializoterapii oraz wykonanym w przeszłości zabiegiem przeszczepienia nerki, a występowaniem zarówno anty-HGV jak i HGV RNA (+) inaczej niż w przypadku infekcji HCV. Nie wykazano zależności pomiędzy występowaniem HGV, a płcią i wiekiem chorych.

W praktyce podstawowym wskaźnikiem uszkodzenia mięszu wątroby w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby jest zwiększenie aktywności aminotransferaz alaninowej (AlAT) i asparaginianowej (AspAT). Uszkodzenie błon komórkowych i systemów enzymatycznych wywołuje wyciek do krwi enzymów indykatorowych, czego klasycznym przykładem jest wzrost aktywności aminotransferaz w surowicy, i spadek wydzielania do krwi białek, produkowanych przez wątrobę (np. albumin czy czynników krzepnięcia). AlAT jest enzymem występującym w dużych stężeniach w cytoplazmie wątroby i w małych stężeniach w tkankach pozawątrobowych. AspAT występuje przede wszystkim w mitochondriach wątroby. Oba enzymy są uwalniane do krwi w wyniku wzrostu przepuszczalności błon komórkowych wskutek uszkodzenia lub śmierci komórki. W przewlekłych zapaleniach wątroby aktywność tych enzymów jest na ogół zwiększona. W zależności od aktywności procesu martwiczego aktywność może okresowo narastać lub się zmniejszać. W zapaleniu wątroby typu C przebieg wzrostu aktywności aminotransferaz jest najczęściej wielofazowy, wykreślona krzywa wartości AlAT ma kształt falisty. Często aktywności ocenianych enzymów zbliżone są do referencyjnych. Nie zawsze obserwuje się korelację pomiędzy aktywnością aminotransferaz, a nasileniem zmian w biopsatach wątrobowych [58, 138].

Analizując aktywność transaminaz, (AspAT, AlAT) w surowicy krwi u chorych z dodatnimi markerami w kierunku infekcji wzv typu C i typu G uzyskano istotnie wyższą aktywność tych enzymów w grupie tych chorych w stosunku do pacjentów dializowanych bez cech infekcji (odpowiednio $p=0,007$; $p=0,005$). Badając aktywność AspAT również

istotną statystycznie różnicę wykazano pomiędzy grupą chorych bez cech infekcji a pacjentami z koinfekcją HGV i HCV ($p=0,007$). Porównując wartości tego enzymu w grupie pacjentów mających jedynie przeciwciała anti-HCV (bez materiału genetycznego) z pacjentami dodatnim HCV RNA wykazano istotnie wyższe wartości aktywności tego enzymu u chorych ze stwierdzonym materiałem genetycznym tego wirusa ($p=0,05$), nie stwierdzono tej zależności w przypadku analizy aktywności AlAT. Należy jednak zaznaczyć, że aktywność tego enzymu była wyższa w grupie pacjentów z obecnym materiałem genetycznym wirusa.

W przypadku AlAT podobnie jak przy analizie AspAT stwierdzono istotnie statystyczną zależność przy porównaniu grupy bez infekcji oraz z koinfekcją HCV i HGV ($p=0,005$), nie otrzymano takich wyników porównując pacjentów z infekcją wirusem HCV i HGV.

W dostępnym piśmiennictwie przeważa pogląd, że u chorych z terminalną niewydolnością nerek leczonych powtarzаныmi hemodializami obserwuje się zwiększoną aktywność transaminaz w porównaniu z chorymi seronegatywnymi. *Fabrizzi i wsp.* badali wpływ infekcji wirusem HCV na aktywność aminotransferaz w grupie 506 pacjentów przewlekłe dializowanych. Autorzy potwierdzają związek pomiędzy wzrostem aktywności AspAT i AlAT a obecnością przeciwciał anti-HCV ($p=0,0001$), podobnie jak i obecnością HCV RNA [36]. W badaniu tym oznaczano także genotyp wirusa HCV, jednakże nie znaleziono korelacji pomiędzy typem wirusa a aktywnością enzymów wątrobowych. U chorych, u których znaleziono materiał genetyczny wirusa uzyskano wyższe wartości enzymów (AspAT i AlAT) w porównaniu do chorych bez obecności HCV RNA. W wielu pracach wykazano podobne zależności a procent chorych z obecnością przeciwciał anti-HCV, u których enzymy te były podwyższone waha się pomiędzy 4,5-80% [32]. Fakt ten tłumaczyć może kilka przyczyn: okresowy wzrost aktywności zarówno enzymów jak również wiremii, wartość wiremii może być bardzo niska, pacjent może być zainfekowany

niewirulentnym (niezjadliwym) szczepem wirusa, przeciwciała mogą przetrwać po wyeliminowaniu wirusa z organizmu, replikacja wirusa może przebiegać poza komórkami wątrobowymi, testy użyte do oznaczania przeciwciał nie były odpowiedniej jakości.

Udowodniono na podstawie wielu prac, iż pacjenci dializowani mają znamienne niższą aktywność enzymów wątrobowych w stosunku do populacji ogólnej, dlatego wzrost aktywności aminotransferaz, szczególnie AlAT nawet w zakresie normy może sugerować infekcję HCV u tych chorych [44, 53, 112]. Analizując powyższe doniesienia można stwierdzić, że enzymy AspAT i AlAT są słabymi prognostami w rozpoznawaniu infekcji HCV u chorych dializowanych. W wielu badaniach obserwowano słabą zależność pomiędzy aktywnością aminotransferaz a obecnością materiału genetycznego wirusa HCV, jednakże przyjmując niższe wartości za patologiczne, a tak należałoby traktować grupę chorych dializowanych okazałoby się, że zależność ta jest istotna. Udowodniło to badanie prowadzone przez *Fabrizzi i wsp.* oraz *Guh i wsp.* W badaniu prowadzonym przez zespół *Guh i wsp.* okazało się, że przyjmując za patologiczne niższą aktywność AspAT i AlAT, występowanie podwyższonych wartości tych enzymów u chorych z wykrywalnym HCV RNA jest znacząco częstsze w porównaniu z grupą pacjentów ujemnych w kierunku HCV RNA [10, 27, 32].

W przeprowadzonej pracy porównywano także aktywność takich enzymów jak GGTP, fosfataza alkaliczna, cholinesteraza. W dostępnym piśmiennictwie brak jednoznacznych doniesień na ten temat.

Badając poziom bilirubiny u pacjentów z zakażeniem HGV i HCV nie znaleziono zależności statystycznych pomiędzy analizowanymi grupami chorych. W zakażeniach przewlekłych hiperbilirubinemia może nie występować lub jest niewielka. Wzrost jej poziomu w surowicy zazwyczaj koreluje z powikłaniami. Wykazano, że pacjenci, u których wartości bilirubiny przekraczały 40 $\mu\text{mol/l}$ mieli 25% ryzyko rozwinięcia się powikłań w ciągu 5 lat [58].

Zmiany hematologiczne obejmują nieznaczną niedokrwistość, zmniejszenie odsetka retikulocytów, makrocytozę, leukopenię, limfopenię i neutropenię, a także nieznaczną trombocytopenię [58]. Występują zwłaszcza w okresie przedżółtaczkowym. Nie opisuje się swoistych cech dla poszczególnych typów etiologicznych wirusowych zapaleń wątroby. U 5-28% chorych we krwi obwodowej mogą występować nietypowe postacie limfocytów, przypominające komórki stwierdzane w mononukleozie zakaźnej.

Poddając ocenie wartości hematologiczne w badanej grupie chorych nie znaleziono statystycznych zależności dotyczących poziomu hemoglobiny, wartości hematokrytu, liczby erytrocytów. Liczba płytek krwi była niższa (średnio: 151 tys/ μ l) w grupie chorych ze wskaźnikami infekcji wirusem HCV w stosunku do chorych bez infekcji (średnio: 187,8 tys/ μ l). Ogólna liczba leukocytów w grupie chorych z infekcją wirusem HCV była istotnie niższa ($p=0,001$) w stosunku do chorych bez infekcji.

Wątroba jest istotnym narządem w metabolizmie tłuszczów. Cholesterol jest syntetyzowany w wątrobie i innych tkankach, wydalany z żółcią bezpośrednio lub przerabiany w wątrobie na kwasy żółciowe i wydalany z żółcią. W przypadku cholestazy zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzwątrobowej jego stężenie w surowicy wzrasta, natomiast przy uszkodzeniu syntezy w wątrobie maleje. W analizowanej pracy nie stwierdzono zależności statystycznych w poszczególnych grupach, pomiędzy rodzajem infekcji a poziomem cholesterolu całkowitego i triglicerydów w surowicy krwi. Warto wspomnieć, że u pacjentów bez obecności HCV RNA, a mających jedynie przeciwciała anti-HCV poziom cholesterolu jest niższy (średnio: 3,96 mmol/l) niż u chorych z obecnością materiału genetycznego wirusa (średnio: 5,61 mmol/l), podobnie przedstawiała się ocena poziomu triglicerydów w surowicy. W przewlekłym miażdżowym, uszkodzeniu wątroby maleje biosynteza acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej, wskutek czego wzrasta stężenie wolnego cholesterolu we wszystkich frakcjach lipoproteinowych. Również zmniejsza się stężenie HDL i VLDL. Na skutek biosyntezy zmienionej w swojej strukturze

apolipoproteiny A w surowicy krwi stwierdza się obecność zmienionych patologicznie cząsteczek HDL i VLDL [7].

Spośród badań przemiany białkowej, mających znaczenie diagnostyczne w chorobach wątroby należy wymienić: oznaczanie stężenia białka całkowitego osocza oraz poszczególnych jego frakcji. Ogólne stężenie białek jest mało swoistym testem czynności białkotwórczej wątroby, proteinemia zależy bowiem nie tylko od albumin syntetyzowanych głównie w hepatocytach, ale i od globulin wytwarzanych poza wątrobą. Z drugiej strony uwzględniając długi półokres trwania głównych frakcji białkowych osocza (dla albumin: 12-21 dni) łatwo wywnioskować, że oznaczenie ogólnej proteinemii ma wartość diagnostyczną głównie w przewlekłych chorobach miększu wątroby. Hipoproteinemia spowodowana jest najczęściej upośledzeniem biosyntezy albumin w hepatocytach, natomiast hiperproteinemia - zwiększonym wytwarzaniem immunoglobulin w komórkach przeważnie pozawątrobowego układu siateczkowo-śródbłonkowego. Hiperproteinemia występująca w chorobach wątroby najczęściej dowodzi istnienia przewlekłego stanu zapalnego w tym narządzie. Wśród prób białkowych znaczenie ma także pomiar czasu protrombinowego (z wyliczeniem wskaźnika). Choroby wątroby mogą spowodować zmniejszenie syntezy czynników krzepnięcia. Czas protrombinowy może być wskaźnikiem ciężkości uszkodzenia wątroby i wskaźnikiem prognostycznym.

W przeprowadzonym badaniu, analizując poziom białka całkowitego zaobserwowano wyższe średnie poziomy w grupach chorych z infekcją HCV (średnio: 75,4 g/l) oraz HCV i HGV (średnio: 73,4 g/l) w stosunku do chorych bez markerów świadczących o infekcji tymi wirusami (średni poziom białka całkowitego w tej grupie chorych wynosił 67,4 g/l, (p=0,002). U pacjentów z rozpoznaniem jedynie zakażeniem wirusem HGV nie stwierdzono istotnej różnicy w stosunku do grupy chorych bez infekcji. Porównując pacjentów z obecnością materiału genetycznego HCV RNA z chorymi z obecnymi jedynie przeciwciałami także nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie

białka całkowitego. Podobnie przedstawia się analiza dotycząca poziomu albumin, najwyższe średnie stężenie obserwowano u chorych z infekcją HCV. Natomiast w analizie pacjentów z materiałem genetycznym wirusa HCV w stosunku do grupy z obecnością jedynie przeciwciał anti-HCV obserwuje się mniejsze średnie stężenie albumin w pierwszej grupie, jednak nie istotne statystycznie. W piśmiennictwie istnieją doniesienia, że w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C w badaniu elektroforetycznym białek surowicy stwierdza się hipoalbuminemię oraz hipergammaglobulinemię, jak i publikacje przeczące zmianom w elektroforezie białek [76].

W analizowanym materiale, stwierdzono istotny statystycznie wyższy poziom alfa 1 globuliny u chorych z markerami infekcji HCV w stosunku do chorych bez rozpoznanej infekcji wirusowej ($p=0,024$), w przypadku izolowanego HGV nie obserwowano różnic. W przypadku gamma globuliny u chorych z infekcją HCV i/lub HGV poziom jej był statystycznie wyższy w stosunku do chorych z obecnością markerów w kierunku izolowanej infekcji HGV (odpowiednio: $p=0,050$, $p=0,014$). Analizując zachowanie się poziomu gamma globuliny u chorych z obecnością materiału genetycznego HCV RNA oraz pacjentów ze stwierdzonymi jedynie przeciwciałami anti-HCV warto zaznaczyć, że u pacjentów z aktywną infekcją był wyższy, choć nie istotnie statystycznie.

Ultrasonografia (usg) pozwala na morfologiczną ocenę mięszu wątroby, śledziony oraz ocenę układu naczyniowego tych narządów. W niniejszej pracy wykonywano badania pomiaru tych narządów, oceniano echogeniczność, dokonywano pomiaru pnia żyły wrotnej oraz żyły śledzionowej. Badania obrazowe, w tym także usg pozwalają na uwidocznienie zmian związanych z nadciśnieniem wrotnym – zmian stanu mięszu wątroby, średnicy naczyń, ocenę wielkości śledziony, obecności wolnego płynu w jamie otrzewnej oraz obecności naczyń krążenia obocznego. W badaniu usg widoczne są zmiany wielkości wątroby, nierównomierna echogeniczność mięszu, poszerzenie żyły wrotnej. Bardzo cenną metodą jest Dopplerowska ocena przepływu w naczyniach wątrobowych. Zmniejszenie

prędkości przepływu w żyłę wrotnej jest widoczne u ponad połowy chorych z marskością pozapalną wątroby.

W ostrym wirusowym zapaleniu wątroby szybko widoczna jest hepatomegalia i początkowo obniżona echogeniczność mięszu, następnie echogeniczność wzrasta, powiększeniu ulega też zwykle śledziona. Obrazowanie chorych z przewlekłymi zapaleniami wątroby daje szerokie spektrum obrazów w zależności od stopnia nasilenia zmian. W dostępnych publikacjach u części pacjentów nie obserwuje się odchyłeń od normy. Mniej nasilone zmiany mięszowe powodują niewielki, dość równomierny wzrost echogenności wątroby, w jej wnętrzu widoczne są czasami niewielkie węzły chłonne. W badaniu Dopplerowskim w ponad połowie przypadków nie stwierdza się odchyłeń od normy. Na szczególną uwagę zasługują chorzy, u których obok zmian mięszowych - nierównej echogeniczności wątroby, przerostu podścieliska, zmian w wielkości wątroby i śledziony widoczne są; zmniejszenie prędkości przepływu w żyłę wrotnej oraz zaburzenia w jej spektrum przepływu. Łączne występowanie tych objawów przemawia za aktywnymi postaciami zapalenia z nasilonym włóknieniem i szybko rozwijającą się przebudową marską [31].

W analizowanym materiale podjęto próbę oceny mięszu wątroby, śledziony pod względem wielkości i echogeniczności oraz ocenę żyły wrotnej i śledzionowej. Zgodnie z piśmiennictwem otrzymano istotną zależność statystyczną w obrazie wątroby u chorych bez infekcji w porównaniu do chorych ze stwierdzonym zakażeniem HCV i koinfekcją HCV i HGV. Prawidłowy obraz ultrasonograficzny w grupie chorych bez infekcji stwierdzono u 50,4 % badanych, natomiast u chorych zakażonych HCV u 16,7%, wśród pacjentów z koinfekcją HCV i HGV tylko u 10% ($p=0,014$, $p=0,001$). Analizując badanych, u których otrzymano dodatnie wyniki w kierunku izolowanej infekcji wirusem HGV nie stwierdzono takiej zależności. Jest to, zatem jeszcze jeden czynnik przemawiający za dyskusyjną hepatotoksycznością tego wirusa. Odsetek chorych z cechami powiększonej wątroby był

stosunkowo wysoki u pacjentów z koinfekcją i wynosił 70%, co w stosunku do wyniku 35,1% u chorych bez infekcji daje istotną zależność statystyczną. Podobnie przedstawiała się analiza obrazu śledziony, średnicy żyły wrotnej i śledzionowej.

6. WNIOSKI

1. Stwierdzenie stosunkowo wysokiego odsetka chorych dializowanych wykazujących przeciwciała przeciw wirusom C i G zapalenia wątroby jak również obecności materiału genetycznego tych wirusów potwierdza fakt, że infekcje HCV i HGV są częste u chorych hemodializowanych.
2. Stwierdzenie obecności HCV RNA u 10,4% pacjentów hemodializowanych nie wykazujących obecności przeciwciał anti-HCV nakazuje traktować każdego chorego dializowanego jako potencjalnie zakaźnego.
3. Czasokres dializoterapii i wcześniej wykonywane procedury medyczne (przeszczep nerki) mają istotny wpływ na częstość występowania zakażeń HCV.
4. Obecność zakażenia HCV lub współistnienie zakażenia HCV i HGV może odpowiadać za wysoki odsetek zmian w badaniu USG wątroby.
5. Występujące u wysokiego odsetka dializowanych zakażenie wirusem G wydaje się nie mieć istotnego wpływu na zachowanie się aktywności badanych enzymów wątrobowych natomiast może pogłębiać stopień uszkodzenia wątroby stwierdzany w badaniu USG.
6. Częste współistnienie zakażenia HCV i HGV może wskazywać na podobną drogę ich przenoszenia.

7. PIŚMIENICTWO

1. **Abdulkarim A.S., Zein N.N., Germer J.J., Kolbert C.P., Kabbani L., Krajnik K.L., Hola A., Agha M.N., Tourogman M., Persing D.H.:** Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C virus subtypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998, 59, 571-576.
2. **Badalamenti S., Catania A., Lunghi G., Covini G., Bredi E., Brancaccio D., Salvadori M., Como G., Ponticelli C., Graziani G.:** Changes in viremia and circulating interferon-alpha during hemodialysis in hepatitis C virus-positive patients: only coincidental phenomena? *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 143-50.
3. **Barrera J.M.:** Diagnostic tests for hepatitis C virus infection. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 15-18.
4. **Barril G., Traver I.A.:** Prevalence of hepatitis C virus in dialysis patients in Spain. *Nephrol. Dial. Transplant. (Suppl.6)*, 1995, 10, 78-80.
5. **Basaras M., Arrese E., Cabrera F., Ezpeleta C., Cisterna R.:** Detection of HGV in serum and peripheral blood mononuclear cells of maintenance haemodialysis patients. *J. Hosp. Infect.* 1999, 42, 1551-159.
6. **Berthoux P., Dejean C., Cecillon S., Batie M., Berthoux F.:** High prevalence of hepatitis G virus (HGV) infection in renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 2909-2913.
7. **Brzozowski R.:** Choroby wątroby i dróg żółciowych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 1998.
8. **Cabrerizo M., Bartolome J., De Sequera P., Caramelo C., Manzano M.L., Carreno V.:** GBV-C/HGV-RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999, 56, 1120-1128.
9. **Canavese C., Hollo Z., Thea A., Ghisetti V., Brunetto M., Piccoli G.:** Epidemiological relevance of hepatitis G in Italian dialysis patients with and without hepatitis C infection. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 2038-2039.
10. **Caramelo C., Bartolome J., Albalade M., de Sequera P., Navas S., Bermejillo T., Oliva H., Marriott E., Ortiz A., Ruiz Tunon C., Casado S., Carreno V.:** Undiagnosed hepatitis C virus infection in hemodialysis patients: value of HCV RNA and liver enzyme levels. *Kidney Int.* 1996, 50, 2027-2031.
11. **Carrera F., Silva G., Oliveira C., Frazao J.M., Pires C.:** Persistence of antibodies to hepatitis C virus in a chronic hemodialysis population. *Nephron* 1994, 68, 38-40.
12. **Castellano G.:** The natural history of hepatitis C virus infection. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 19-23.

13. **Cenigiz K., Gunaydiotan M., Bedir A., Pekbay A.:** Low prevalence of hepatitis G virus antibodies in glomerular diseases. *Nephron* 1998, 79, 472-473.
14. **Chan T.M., Lau J.Y.N., Wu P.C., Lai C.L., Lok A.S., Chengbi K.:** Hepatitis C virus genotypes in patients on renal replacement therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 731-733.
15. **Chow W.C.:** Hepatitis C: retreatment and treatment of patients with renal failure. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000, 15, Suppl. 152-155.
16. **Cianciara J., Stańczak W., Kozłowska J., Radkowski M., Łoch T., Walewska-Zielecka B., Laskus T.:** Częstość występowania i obraz kliniczny koinfekcji wirusem zapalenia wątroby typu G (HGV) u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. *Hepatol. Pol.* 1998, 5, 111-115.
17. **Cisterne J.M., Rostaing L., Izopet J., Chabannier M.H., Baron E., Duffaut M., Durand D., Suc J.M.:** Epidemiology of HCV infection: disease and renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996, 11, 46-47.
18. **Cocco M., Amoruso M., Lavanna S., Mariotti D., Bertoni G., Sinelli N., Brizzolara R.:** Is hepatitis G virus a real risk for haemodialysis patients? *EDTNA ERCA J.* 1998, 24, 36-37.
19. **Cohen J.J., Harrington J.T., Madias N.E.:** Hepatitis C in renal transplantation. *Kidney Int.* 1997, 52, 843-846.
20. **Conway M., Catterall A.P., Brown E.A., Tibbs C., Gower P.E., Curtis J.R., Coleman J.C., Murray-Lyon I.M.:** Prevalence of antibodies to hepatitis C in dialysis patients and transplant recipients with possible routes of transmission. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1992, 7, 1226-1229.
21. **Cornu C., Jadoul M., Loute G., Goubau P.:** Hepatitis G virus infection in haemodialysed patients: epidemiology and clinical relevance. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 1326-1329.
22. **Cosserat J., Cacoub P., Bletry O.:** Immunological disorders in C virus chronic hepatitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996, 11, 31-35.
23. **Czerwionka-Szaflarska M., Łoś E.:** Współczesne poglądy na zakażenie wirusem G zapalenia wątroby. *Gastroenterol. Pol.* 1999, 6, 161-167.
24. **Da Porto A., Adami A., Susanna F., Calzavara P., Poli P., Castelletto M.R., Amici G.P., Teodori T., Okolicsanyi L.:** Hepatitis C virus in dialysis units: A multicentre study. *Nephron* 1992, 61, 309-310.
25. **Dalekos G.N., Boumba D.S., Katopodis K., Zervou E., Sferopoulos G.S., Siamopoulos K.C., Tsianos E.V.:** Absence of HCV viraemia in anti-HCV-negative haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 1804-1908.
26. **De Filippi F., Lampertico P., Soffredini R., Rumi MG., Lunghi G.,**

- Aroldi A., Tarantino A., Ponticelli C., Colombo M.:** High prevalence, low pathogenicity of hepatitis G virus in kidney transplant recipients. *Dig. Liver Dis.* 2001, 33, 477-479.
27. **De Lamballerie X., Charrel R.N., Dussol B.:** Hepatitis GB virus C in patients on hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334, 1549.
28. **De Lamballerie X.:** Serological and molecular biology screening techniques for HCV infection. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994, 9, 230-237.
29. **De Medina M., Ashby M., Schluter V., Hill M., Leclercq B., Pennell J.P., Jeffers L.J., Reddy K.R., Schiff E.R., Hess G., Perez G.O.:** Prevalence of hepatitis C and G virus infection in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 224-226.
30. **EASL International Consensus Conference on Hepatitis C, Paris 26-28 February 1999, J. Hep. 1999, 30, 956-959.**
31. **Elwertowski M.:** Badania obrazowe w chorobach wątroby. W: *Hepatologia* Wyd. 1. *Med. Sci. Mon.* 2001, 9-42.
32. **Fabrizi F., Lunghi G., Andrulli S.:** Influence of hepatitis C virus (HCV) viremia upon serum aminotransferase activity in chronic dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 1394-1398.
33. **Fabrizi F., Lunghi G., Bacchini G., Corti M., Guarnori I., Raffaele L., Erba G., Pagano A., Locatelli F.:** Hepatitis G virus infection in chronic dialysis patients and kidney transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 1645-1651.
34. **Fabrizi F., Marcelli D., Bacchini G.:** Antibodies to hepatitis C virus (HCV) in chronic renal failure (CRF) patients on conservative therapy: prevalence, risk factors and relationship to liver disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994, 9, 780-786.
35. **Fabrizi F., Martin P., Dixit V., Brezina M., Cole M.J., Gerosa S., Vinson S., Mousa M., Gitnick G.:** Quantitative assessment of HCV load in chronic hemodialysis patients: a cross-sectional survey. *Nephron* 1998, 80, 428-433.
36. **Fabrizi F., Martin P., Quan S., Dixit V., Brezina M., Conrad A., Polito A., Gitnick G.:** Serotyping strip immunoblot assay for assessing hepatitis C virus strains in dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2000, 35, 832-838.
37. **Fehr T., Riehle H.M., Nigg L., Gruter E., Ammann P., Renner E.L., Ambuhl P.M.:** Evaluation of hepatitis B and hepatitis C virus-infected renal allograft recipients with liver biopsy and noninvasive parameters. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 193-201.
38. **Fernandez J.L., Valtuille R., Hidalgo A., del Pino N., Lef L., Rendo P.:** Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients and its relationship with hepatitis C virus infection. *Am. J. Nephrol.* 2000, 20, 380-384.

39. **Furusyo N., Hayashi J., Ariyama I., Sawayama Y., Etoh Y., Kashiwagi S.:** Lower hepatitis G virus infection prevalence compared to hepatitis B and C virus infection prevalences. *Dig. Dis. Sci.* 2000, 45, 188-195.
40. **Galan F., Perez-Gracia M.-T., Lozano A., Benavides B., Fernandez-Ruitz E., Rodriguez-Iglesias M.A.:** A 3-year follow-up of HCV-RNA viremia in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 1211-1214.
41. **Gerard C., Vaira D., Delwaide J., Lamproye A., Maggipinto G., Sondag D., Rorive G., Belaiche J., Rentier B.:** Does HCV screening of blood donors affect transmission of hepatitis G virus in dialysed patients? *Vox Sang.* 1998, 75, 77-80.
42. **Grassi M., Mammarella A., Sagliaschi G., Granati L., Musca A., Traditi F., Pezzella M.:** Persistent hepatitis G virus (HGV) infection in chronic hemodialysis patients and non-B, non-C chronic hepatitis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001, 39, 956-960.
43. **Guadalupe Ercilla M., Vinas O.:** Extrahepatic symptoms of hepatitis C virus infection: relation to autoimmune response. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 24-27.
44. **Guh J.Y., Lai Y.H., Yang C.Y., Chen S.C., Chuang W.L., Hsu T.C., Chen H.C., Chang W.Y., Tsai J.H.:** Impact of decreased serum transaminase levels on the evaluation of viral hepatitis in hemodialysis patients. *Nephron* 1995, 69, 459-465.
45. **Guilera Sarda M., Sanchez Tapias J.M.:** Hepatitis G virus: pathogenic and clinical implications. *Gastroenterol. Hepatol.* 1997, 20, 500-509.
46. **Gunaydin M., Bedir A., Akpolat T., Kuku I., Pekbay A., Esen S., Ozyilkan E., Arik N., Cengiz K.:** Prevalence of serum HGV-RNA among hemodialysis patients in Turkey. *Infection* 1997, 25, 307-309.
47. **Gupta S.K., Pittenger A.L., Swan S.K., Marbury T.C., Tobillo E., Batra V., Sack M., Glue P., Jacobs S., Affrime M.:** Single-dose pharmacokinetics and safety of pegylated interferon-alpha2b in patients with chronic renal dysfunction. *J. Clin. Pharmacol.* 2002, 42, 1109-1115.
48. **Hardy N.M., Chiao J., Arora N., Mars R., Jenkins S.G.:** Hepatitis C virus in the hemodialysis setting: detecting viral RNA from blood port caps by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Clin. Nephrol.* 2000, 54, 143-146.
49. **Hayashi J., Furusyo N., Sawayama Y., Kishihara Y., Kawakami Y., Ariyama I., Etoh Y., Kashiwagi S.:** Hepatitis G virus in the general population and in patients on hemodialysis. *Dig. Dis. Sci.* 1998, 43, 2143-2148.
50. **Hestin D., Guillemin F., Castin N., Le Faou A., Champigneulle J., Kessler M.:** Pretransplant hepatitis C virus infection: a predictor of

proteinuria after renal transplantation. *Transplantation*, 1998, 65, 741-744.

51. **Hinrichsen H., Leimenstoll G., Stegen G., Schrader H., Folsch U.R., Schmidt W.E.; PHV Study Group.:** Prevalence of and risk factors for hepatitis G (HGV) infection in haemodialysis patients: a multicentre study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 271-275.
52. **Hizel N., Tuncbilek S., Boyacioglu S., Ozdemir N., Haberal M.:** Hepatitis G virus infection in haemodialysis patients and its relationship with hepatitis C virus RNA positivity. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998, 30, 451-454.
53. **Hoofnagle J.H.:** Management of hepatitis C: current and future perspectives. *J. Hepatol.* 1999, 31, 264-268.
54. **Huang C.H., Kao J.H., Kuo Y.M., Tsai T.J., Hung K.Y., Chen D.S.:** GB virus C/hepatitis G virus infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 2914-2919.
55. **Iganack E., Przepiórkowska B., Sułowicz W.:** Zakażenia wirusem C zapalenia wątroby u chorych z niewydolnością nerek leczonych dializami. *Postępy w Nefrologii i Nadciśnieniu Tętniczym*, red. Więcek A., Kokot F., *Med. Prakt.* 2001, 1, 34-43.
56. **Izopet J., Rostaing L., Mousson F., Alric L., Dubois M., That H.T., Payen J.L., Duffaut M., Durand D., Suc J.M., Puel J.:** High rate of hepatitis C virus clearance in hemodialysis patients after interferon-alpha therapy. *J. Infect. Dis.* 1997, 176, 1614-1617.
57. **Januszkiewicz-Lewandowska D., Wysocki J., Rembowska J., Lewandowski K., Nowak T., Pernak M., Nowak J.:** Hepatitis G virus co-infection may affect the elimination of hepatitis C virus RNA from the peripheral blood of hemodialysis patients. *Acta. Virol.* 2001, 45, 261-263.
58. **Juszczyk J.:** Wirusowe zapalenia wątroby. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1999.
59. **Kallinowski B., Ahmadi R., Seipp S., Bommer J., Stremmel W.:** Clinical impact of GB-C virus in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 93-98.
60. **Kamar N., Sandres-Saune K., Selves J., Ribes D., Cointault O., Durand D., Izopet J., Rostaing L.:** Long-term ribavirin therapy in hepatitis C virus-positive renal transplant patients: effects on renal function and liver histology. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 184-92.
61. **Kao T.W., Hsu W.A., Chen H.S., Chen W.Y.:** A two year follow-up study of common virus infections in hemodialysis patients in Taiwan. *Artif. Organs.* 2002, 26, 879-883.
62. **Karayiannis P., Hadzijannis S.J., Kim J. :** Hepatitis G virus infection: A clinical characteristics and response to interferon. *J. Viral. Hepatol.* 1997, 4, 37-46.

63. **Karayiannis P., Thomas H.C.:** Hepatitis G virus: identification, prevalence and unanswered questions. *Gut* 1997, 40, 294-296.
64. **Katsoulidou A., Paraskvis D., Kalapothaki V.:** Molecular epidemiology of hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999, 14, 1188-1191.
65. **Khan M.H., Farrell G.C., Byth K., Lin R., Weltman M, George J., Samarasinghe D., Kench J., Kaba S., Crewe E., Liddle C.:** Which patients with hepatitis C develop liver complications? *Hepatology* 2000, 31, 513-520.
66. **Kiyosawa K., Tanaka E.:** GB Virus C/ Hepatitis G Virus. *Intervirology* 1999, 42, 185-195.
67. **Klusonova H., Pliskova L., Palicka V., Fixa P.:** Prevalence of viral hepatitis G infection in hemodialysis patients and coinfection with viral hepatitis B and C. *Vnitr. Lek.* 2001, 47, 678-681.
68. **Kobayashi M., Tanaka E., Oguhi H., Hora K., Kiyosawa K.:** Prospective follow-up study of hepatitis C virus infection in patients undergoing maintenance haemodialysis: comparison among haemodialysis units. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998, 13, 604-609.
69. **Krajowy Zespół Konsultanta Medycznego w Dziedzinie Nefrologii.** Warszawa, lipiec 1999r.
70. **Lampe E., Saback F.L., Yoshida C.F., Niel C.:** Infection with GB virus C/ hepatitis G virus in Brazilian hemodialysis and hepatitis patients and asymptomatic individuals. *J. Med. Virol.* 1997, 52, 61-67.
71. **Laskus T., Wang L.F., Radkowski M., Jang S.J., Vargas H., Dodson F., Fung J., Rakela J.:** Hepatitis G virus infection in American patients with cryptogenic cirrhosis: no evidence for liver replication. *J. Infect. Dis.* 1997, 176, 1491-1495.
72. **Lenzi M., Frisoni M., Mantovani V.:** Haplotype HLA-B8 DR3 susceptibility to hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1998, 91, 2062-2067.
73. **Lopes L.M., Lopes E.P., Silva E, Kirsztajn G.M., Pereira A.B., Sesso R.C., Ferraz M.L.:** Prevalence of hepatitis C virus antibodies in primary glomerulonephritis in Brazil. *Am. J. Nephrol.* 1998, 18, 495-497.
74. **Lopez-Alcorocho J.M., Barril G., Ortiz-Movilla N., Traver J.A., Bartolome J., Sanz P., Selgas R., Carreno V.:** Prevalence of hepatitis B, hepatitis C, GB virus C/hepatitis G and TT viruses in predialysis and hemodialysis patients. *J. Med. Virol.* 2001, 63, 103-107.
75. **Magiera M., Kucharz E.J., Beniowski M., Chelmicka A., Witor A., Witor A., Janczewska-Kazek E.:** Leczenie przewlekłych wirusowych

- zapaleń wątroby typu B i C. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2003, 109, 423-429.
76. **Maier K.P.:** Zapalenie wątroby. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 1997.
 77. **Mailliard M.E.:** Hepatitis G virus: guilty or innocent? *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 366-368.
 78. **Manzini P., Amore A., Brunetto M.R. :** Is hepatitis C virus RNA detectable in dialysis ultrafiltrate? *Nephron*, 1996, 72, 102-106.
 79. **Masuko K., Mitsui T., Iwano K., Yamazaki C., Okuda K., Meguro T., Murayama N., Inoue T., Tsuda F., Okamoto H., Miyakawa Y., Mayumi M.:** Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 1996, 334, 1485-1490.
 80. **Matzkies F.K., Bahner U., Weizenegger M., Bartel J., Cullen P., Schaefer R.M.:** Prevalence of hepatitis G in patients on chronic hemodialysis. *Clin. Lab.* 2000, 46, 247-250.
 81. **Medina M., Ashby M., Schlüter V.:** Prevalence of hepatitis C and G virus infection in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 224-226.
 82. **Meyers C.M., Seeff L.B., Stehman-Breen C.O., Hoofnagle J.H.:** Hepatitis C and renal disease: an update. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 631-657.
 83. **Mihm S., Fayyazi A., Hartmann H., Ramadori G.:** Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology* 1997, 25, 735-738.
 84. **Morales J., Duran C, Artigas G.:** Impact of prophylactic measures on prevalence of anti HCV and viral genotypes in dialysis unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 2805-2808.
 85. **Morales J.M., Pascual-Capdevila J., Campistol J.M., Fernandez-Zatarain G., Munoz M.A., Andres A., Praga M., Martinez M.A., Usera G., Fuertes A., Oppenheimer F., Artal P., Darnell A., Rodicio J.L.:** Membranous glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection in renal transplant patients. *Transplantation* 1997, 63, 1634-1639.
 86. **Moyer L.A., Alter M.J.:** Hepatitis C virus in the hemodialysis setting. A review with recommendations for control. *Semin. Dial.* 1994, 7, 124-127.
 87. **Mphahlele M.J., Lau G.K., Carman W.F.:** HGV: the identification, biology and prevalence of an orphan virus. *Liver* 1998, 18, 143-155.
 88. **Mphahlele M.J., Aspinall S., Spooner R., Carman W.F.:** Age related prevalence of hepatitis G virus in South Africans. *J. Clin. Pathol.* 1999, 52, 752-757.
 89. **Nakai K., Maung Win K., San San O., Arakawa Y., Abe K.:** Molecular characteristic-based epidemiology of Hepatitis B, C, and E viruses and GB

- virus Hepatitis G virus in Myanmar. *J. Clin. Microb.* 2001, 39, 1536-1539.
90. **Nakatsuji Y., Tanaka E., Kiyosawa K.:** Epidemiology of hepatitis G virus infection in Japan. *Nippon Rinsho.* 1997, 55, 604-608. *Nephron* 1997, 77, 273-278.
 91. **Niemczyk S., Stopiński M.:** Wirusowe zapalenie wątroby typu C u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. *Nefrol. Dial. Pol.* 1998, 3, 141-143.
 92. **Noh H., Kang S.W., Choi S.H., Shin S.K., Seo B.J., Lee I.H., Choi K.H., Han D.S., Kim H.S., Lee H.Y.:** Hepatitis G virus infection in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Yonsei. Med. J.* 1998, 39, 116-121.
 93. **Oguchi T., Tanaka E., Orii K., Kobayashi M., Hora K., Kiyosawa K.:** Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. *J. Gastroenterol.* 1999, 34, 234-240.
 94. **Ok. E., Ünsal A., Celik A.:** Clinicopathological features of rapidly progressive hepatitis C virus infection in HCV antibody negative renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 3103-3105.
 95. **Okuda K., Kanda T., Yokosuka O., Hayashi H., Yokozeki K., Ohtake Y., Irie Y.:** GB virus-C infection among chronic haemodialysis patients: clinical implications. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1997, 12, 766-770.
 96. **Okuda K., Yokosuka O., Otake Y., Hayashi H., Yokozeki K., Kashima T., Kobayashi S., Sakuma K., Ohni T., Irie Y.:** Cryoglobulinaemia among maintenance haemodialysis patients and its relation to hepatitis C infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1998, 13, 248-252.
 97. **Pawlotsky J.M., Ben Hayia M., Andre C.:** Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994, 19, 841-846.
 98. **Pereira B.J.G., Levey A.S.:** Hepatitis C virus infection in dialysis and renal transplantation. *Kidney Int.* 1997, 51, 981-984.
 99. **Peterson J., Green G., Iida K., Caldwell B., Kerrison P., Bernich S., Aoyagi K., Lee S.R.:** Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative 'window' phase of hepatitis C infection. *Vox Sang.* 2000, 78, 80-85.
 100. **Petrosillo N., Gilli P., Serraino D., Dentico P., Mele A., Ragni P., Puro V., Casalino C., Ippolito G.:** Prevalence of infected patients and understaffing have a role in hepatitis C virus transmission in dialysis. *Am. J. Kidney. Dis.* 2001, 37, 1004-1010.
 101. **Pietrzak B., Durlik M.:** Zakażenia HCV w położnictwie. *Terapia* 1999, 7, 15-16.
 102. **Puka J., Rutkowski B., Lichodziejewska-Niemierko M., Lao M.,**

- Rowiński W., Grenda R., Czekalski S., Bautembach S.:** Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce- 2002, AM Gdańsk, 2003.
103. **Radovic M., Jelkmann W., Djukanovic L., Ostric V.:** Serum erythropoietin and interleukin-6 levels in hemodialysis patients with hepatitis virus infection. *J. Interf. Cytok. Res.* 1999, 19, 369-373.
 104. **Rajender Reddy K, Modi MW, Pedder S.:** Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 571-586.
 105. **Rambusch E.G., Wedemeyer H., Tillmann H.L., Heringlake S., Manns M.P.:** Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C - a review of the literature. *Z. Gastroenterol.* 1998, 36, 41-53.
 106. **Rodes J., Sanchez Tapias J.M.:** Hepatitis C. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 2-11.
 107. **Ross R.S., Viazov S., Kruppenbacher J.P., Elsner S., Sarr S., Lange R., Eigler F.W., Roggendorf M.:** GB virus C infection in patients who underwent liver transplantation. *Liver* 1997, 17, 238-243.
 108. **Rostaing L., Borde J.S., Hasle C., Bories P., Allal A., Abbal M., Durand D.:** Lack of effect of chronic hepatitis C virus infection on T-cell cytokine production in chronic hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 2001, 21, 194-199.
 109. **Rostaing L., Izopet J., Arnaud C., Rumeau J.L., Duffaut M., Cisterne J.M., Durand D.:** Long-term consequences of co-infection by hepatitis G virus in hepatitis C virus infected kidney transplant patients. *Nephrologie* 1999, 20, 165-70.
 110. **Rostaing L., Izopet J., Moussion F., Alric L., Verdier D., That H.T., Duffaut M., Durand D., Puel J., Suc J.M.:** HCV RNA clearance after treatment with interferon-alpha in chronic hemodialysis patients with or without coinfection by HGV/HGBV-C. *Nephrologie* 1997, 18, 281-286.
 111. **Rostoker G., Pawlotsky J.M., Bastie A.:** Type I membranoproliferative glomerulonephritis and HCV infection. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996, 11, 22-24.
 112. **Saab S., Martin P., Brezina M., Gitnick G., Yee H.F. Jr.:** Serum alanine aminotransferase in hepatitis C screening of patients on hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 2001, 37, :308-315.
 113. **Sameer H., Danlami T., Saleh A.R., Khaja Q., Ghormullah A.G., Aamir I., Abdulkader A.:** Interferon- α in chronic hepatitis C infection in dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1999, 34, 55-60.
 114. **Sampietro M., Badalamenti S., Graziani G., Como G., Buccianti G., Corbetta N., Ticozzi A., Archenti A., Lunghi G., Penso D., Pizzuti A.,**

- Fiorelli G., Ponticelli C.:** Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1997, 51, 348-352.
115. **Sampietro M., Badalamenti S., Graziani G.:** Nosocomial hepatitis C in dialysis units. *Nephron* 1996, 74, 251-160.
116. **Schneeberger P.M., Toonen N., Keur I., van Hamersvelt H.W.:** Infection control of hepatitis C in Dutch dialysis centres. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 13, 3037-3039.
117. **Schroter M., Feucht H.H., Schafer P., Zollner B., Laufs R.:** GB virus C/hepatitis G virus infection in hemodialysis patients: determination of seroprevalence by a four-antigen recombinant immunoblot assay. *J. Med. Virol.* 1999, 57, 230-234.
118. **Schroter M., Feucht H.H., Zollner B., Schafer P., Laufs R.:** Prevalence of a novel DNA virus (TTV) among patients on maintenance hemodialysis. *Nephron* 2001, 87, 139-142.
119. **Seme K., Poljak M., Jeverica S., Koren A., Sasa Zuzek-Resek S.:** Prevalence of hepatitis G virus infection in Slovenian hemodialysis patients as determined by the detection of viral genome and E2 antibodies. *Nephron* 1998, 79, 426-429.
120. **Seme K., Poljak M., Zuzek-Resek S.:** Molecular evidence for nosocomial spread of two different hepatitis C virus strains in one hemodialysis unit. *Nephron* 1997, 77, 273-278.
121. **Sheng L., Soumillion A., Beckers N.:** Hepatitis G virus infection in acute fulminant hepatitis: prevalence of HGV infection and sequence analysis of a specific viral strain. *J. Viral. Hepatol.* 1998, 5, 301-304.
122. **Sheng L., Soumillion A., Peerlinck K., Verslype C., Schelstraete R., Gyselinck F., Emonds M.P., Hess G., Vermeylen J., Desmyter J., Yap S.H.:** Anti-hepatitis G E2 antibody detection and its relation to serum HGV-RNA in patients with clotting disorders: high prevalence of HGV infection and spontaneous remission. *Thromb. Haemost.* 1998, 79, 752-755.
123. **Sheng L., Widyastuti A., Kosala H., Donck J., Vanrenterghem Y., Setijoso E., Soumillion A., Verslype C., Schelstraete R., Emonds M.P., Hess G., Yap S.H.:** High prevalence of hepatitis G virus infection compared with hepatitis C virus infection in patients undergoing chronic hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, 31, 218-223.
124. **Shibuya A., Satomichi A., Takeuchi A., Saigenji K., Sakurai K., Kobayashi N., Yoshida A.:** Transfusion transmitted virus infection in patients on maintenance haemodialysis and in hospital workers. *J. Hosp. Infect.* 2001, 47, 277-281.
125. **Stuyver L., Claeys H., Wyseur A.:** Hepatitis C virus in hemodialysis unit: Molecular evidence for nosocomial transmission. *Kidney Int.* 1996, 49, 889-895.

126. **Sułowicz W., Doleżał M., Hejmo D., Gerhardt E., Ignacak E.:** Występowanie przeciwciał przeciw wirusowi C zapalenia wątroby (anty-HCV) u chorych przewlekle dializowanych. *Przegl. Lek.* 1992, 49, 67-68.
127. **Sułowicz W., Ignacak E., Szymczakiewicz-Multanowska A., Tabor B., Stompór T., Dulak A., Milkowski A., Sydor A., Kręcichwost M., Łonak H.:** Występowanie przeciwciał anti-HCV oraz RNA wirusa u chorych leczonych hemodializami. (Abstr. X Konf. Nauk. Szkol. Pol. Tow. Nefr., Tarnów 1997). *Przegl. Lek.* 1997, 54, 92.
128. **Sułowicz W., Kopeć J., Ignacak E., Drożdż M., Milkowski A., Sydor A., Bentkowski W., Dolińska-Laskoś C., Mazanek M., Rosiek Z. :** Epidemiologia zakażeń wirusami B i C zapalenia wątroby u chorych leczonych hemodializami w stacjach dializ makroregionu Polski południowo-wschodniej. (Abstrakt), X Konf. Nauk. Szkol. Pol. Tow. Nefr., Tarnów, 1997. *Przegl. Lek.* 1997, 54, 113-116.
129. **Sungur C.:** Is HCV a nosocomial infection in haemodialysis patients? *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994, 6, 875-879.
130. **Tacke M., Kiyosawa K, Stark K., Schlueter V., Ofenloch-Haehnle B., Hess G., Engel A.M.:** Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 1997, 349, 318-320.
131. **Takada N., Takase S., Enomoto N., Takada A, Date T.:** Clinical background of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J. Hepatol.* 1992, 14, 35-40.
132. **Tanaka E., Kiyosawa K., Shimoda K., Hino K., Tacke M., Schmolke S., Engel A.M., Hess G.:** Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J. Viral. Hepatol.* 1998, 5, 153-159.
133. **Tanaka M., Nishiguchi S., Tanaka T., Enomoto M., Fukuda K., Takeda T., Nakajima S., Shiomi S., Kuroki T., Monna T., Yano Y., Otani S.:** Prevalence of GBV-C and Hepatitis G virus variants in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J. Hepatol.* 1997, 27, 966-972.
134. **Tillmann H.L., Manns M.P.:** Hepatitis C virus infection: diagnosis, natural course and therapy. *Kidney Blood Press. Res.* 1996, 19, 215-219.
135. **Tribl B., Oesterreicher C., Pohanka E., Sunder-Plassmann G., Petermann D., Muller C.:** GBV-C/HGV in hemodialysis patients: anti-E2 antibodies and GBV-C/HGV-RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells. *Kidney Int.* 1998, 53, 212-216.
136. **Umlauf F., Wong D.T., Underhill P.A., Oefner P.J., Jin L., Urbanek M., Gruenewald K., Greenberg H.B.:** Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients and the effects of interferon treatment. *Am. J. Gastroenterol.* 1997, 92, 1986-1991.

137. **Yuen M.F., Chan T.M., Yip T.P., Yuen J.C., Ho S.K., Lai C.L.:** Prevalence and significance of hepatitis GB virus-c/hepatitis G virus viremia in a large cohort of patients with chronic hepatitis B infection, with chronic hepatitis C infection, and on renal replacement therapy in Hong Kong. *Dig. Dis. Sci.* 2002, 47, 432-437.
138. **Yuki N., Ishida H., Inoue T., Tabata T., Matsushita Y., Kishimoto H., Kato M., Masuzawa M., Sasaki Y., Hayashi N., Hori M.:** Reappraisal of biochemical hepatitis C activity in hemodialysis patients. *J. Clin. Gastroenterol.* 2000, 30, 187-194.
139. **Zamir D., Shtorch S., Zamir C., Fireman Z., Zonder H.:** Low prevalence of hepatitis G infection in dialysis patients in Israel. *Harefuah.* 1999, 137, 361-363.
140. **Zanetti A.R., Tanzi E., Romano L., Galli C.:** GBV-C/HGV: a new human hepatitis related virus. *Res. Virol.* 1997, 148, 119-123.

8. STRESZCZENIE

Zakażenia wirusami zapalenia wątroby typu B i C stanowią istotny problem u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych powtarzanymi dializami. Znacznie mniej przebadanym problemem są zakażenia wirusem G (HGV) w tej grupie chorych.

Celem pracy była:

- Ocena częstości występowania przeciwciał przeciw wirusom C i G zapalenia wątroby a obecność RNA tych wirusów w grupie chorych leczonych hemodializami.
- Obserwacja zależności pomiędzy przebytym i obecnym zakażeniem HCV oraz HGV, a wskaźnikami uszkodzenia mięszu wątroby.
- Ocena współwystępowania infekcji wirusem zapalenia wątroby typu G i typu C oraz wpływ zakażenia mieszanego HGV i HCV na wybrane parametry biochemiczne jak i na obraz kliniczny choroby u pacjentów hemodializowanych.

Badania przeprowadzono u 215 chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych powtarzanymi hemodializami w Klinice Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

U 40 z nich stwierdzono obecność przeciwciał przeciw wirusowi C (anty-HCV). Do dalszej szczegółowej analizy (ze względów ekonomicznych) wybrano 117 chorych. Grupa ta obejmowała wszystkich chorych (40), u których wykazano obecność przeciwciał anty-HCV oraz 77 pacjentów wolnych od zakażenia HCV. Wybrana grupa chorych składała się z 48 kobiet (41,03%), w wieku od 26 do 79 lat ze średnią wieku 54,4 +/- 13,9 lat oraz z 69 mężczyzn (58,97%), wieku od 29 do 80 lat ze średnia wieku 53,2 +/- 12,9 lat. Chorzy byli dializowani 3 razy w tygodniu po 4-5 godzin, a czasokres ich dializoterapii wynosił od 33 do 301 miesięcy, średnio 101,75 miesięcy. U 29 spośród nich w przeszłości wykonano 1 przeszczep nerki, a u 3 po 2 zabiegi.

Przyczynami niewydolności nerek u badanych pacjentów były:

Rozpoznanie	N	%
Glomerulonephritis	44	37,61
Nephrocirrhosis	38	32,48
Pyelonephritis	13	11,11
Degeneratio polycystica renum	10	8,55
Nephropathia diabetica	7	5,98
Przyczyna nieustalona	3	2,56
Lupus nephritis	2	1,71

W analizowanej grupie chorych wykonywano następujące badania:

-Badania serologiczne: mające na celu identyfikację wirusa C zapalenia wątroby (anty-HCV) oraz wirusa G (anty-HGV). Badania te wykonano metodą immunoenzymatyczną (testy III generacji) przy użyciu aparatu COBAS CORE II firmy Roche.

-Badania RT-PCR mające na celu identyfikację w surowicy pacjentów RNA wirusa C (HCV-RNA) oraz wirusa G (HGV-RNA). Identyfikację wirusów C i G w badanym materiale klinicznym prowadzono za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej, która pozwalała na wykrycie nawet pojedynczych cząstek wirusa w badanej próbce materiału.

-Dodatkowo, u wszystkich chorych wykonano badania biochemiczne oceniające stopień uszkodzenia wątroby: stężenie bilirubiny w surowicy krwi, aktywność enzymów wątrobowych: [aminotransferaz: asparaginianowa (AspAT) i alaninowa (AlAT), gammaglutamylotranspeptydaza (GGTP), fosfataza alkaliczna (AP), cholinesteraza (ChE)], stężenie cholesterolu, żelaza, trójglicerydów, morfologię krwi i, wskaźnik protrombiny a także stężenie białka całkowitego i albuminy oraz elektroforezę białek surowicy. Wyniki

uzyskane w trakcie badań odnoszono do norm Pracowni Biochemicznej. Wykorzystano aparaty- Hitachi 917 Analizer oraz Cobas Argos 5, firmy Roche.

Celem poszukiwania zmian morfologicznych w wątrobie i śledzionie oraz cech nadciśnienia wrotnego przeprowadzono badanie ultrasonograficzne. Badania USG wykonywano wykorzystując aparat ultrasonograficzny Acuson 128 XP. Używano głowicy V4 oraz L5-7. Szczegółowo oceniano mięsz w wątroby i śledziony, żyłę wrotną oraz żyłę śledzionową.

W wybranej grupie pacjentów, których poddano analizie u 40 stwierdzono obecność anty-HCV tj. u 18,6 % a u 42,5 % z nich pozytywny wynik HCV-RNA. Warto zaznaczyć, że u chorych dializowanych otrzewnowo procent występowania przeciwciał anty-HCV jest znamienne niższy i waha się od 4,5 do 8%. U 8 (10,4%) chorych z grupy anty-HCV ujemnych wykazano obecność HCV-RNA. Nakazuje to traktować każdego chorego dializowanego niezależnie od tego czy stwierdzono u niego obecność przeciwciał anty-HCV czy też nie, jako potencjalnie zakaźnego. Diagnostykę w kierunku zakażenia wirusem G zapalenia wątroby (przeciwciała anty-HGV) wykonano u 93 pacjentów (ilość oznaczeń była limitowana przez możliwości użytego testu). Przeciwciała anty-HGV stwierdzono u 42 badanych (45,2%).

W grupie chorych, u których wykazano obecność przeciwciał anty-HGV u 22 oznaczano materiał genetyczny wirusa, z czego u 14 (63,6%) badanych stwierdzono obecność HGV RNA.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy czasem dializoterapii, oraz wykonanym w przeszłości zabiegiem przeszczepienia nerki, a występowaniem zarówno anty-HCV jak również PCR-HCV(+) ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano takich zależności przy infekcji wirusem typu G. Diagnostyka (badanie przeciwciał oraz materiału genetycznego) wzw typu C i G wykazała współwystępowanie

tych wirusów u 21,51% w badanej populacji pacjentów. Średnia aktywność transaminaz (AspAT, AlAT) w surowicy krwi u chorych z dodatnimi markerami w kierunku infekcji wzv typu C i typu G była istotnie wyższa od aktywności tych enzymów w grupie chorych dializowanych bez cech infekcji (odpowiednio: $p=0,007$; $p=0,05$). Frakcja gamma globulin była także podwyższona, lecz nie istotna statystycznie. Frakcja alfa2 globulin była nie istotnie wyższa u chorych z wzv typu C w odniesieniu do pacjentów bez infekcji ($p=0,002$). Stwierdzenie wysokiego odsetka przeciwciał jak również obecności materiału genetycznego wirusów zapalenia wątroby typu C, jak również G potwierdza, że infekcje tymi wirusami są częstym powikłaniem wśród chorych hemodializowanych. U chorych z rozpoznaną infekcją HCV lub koinfekcją HCV/HGV stwierdzono powiększenie wątroby i wzmożoną jej echogeniczność oraz poszerzenie żyły wrotnej i śledzionowej.

Wykazano, że odsetek zakażeń wirusem C wzrasta z czasokresem dializoterapii oraz może mieć związek z wykonywanymi w przeszłości procedurami medycznymi jak na przykład przeszczep nerki. Zakażenie wirusem typu C przejawia się nie tylko wzrostem enzymów wątrobowych (AspAT, AlAT), ale również zmianami w obrazie USG wątroby.

Stosunkowo częste współistnienie zakażenia wirusem typu C i G może wskazywać na podobną drogę ich przenoszenia. Współwystępowanie obu tych wirusów jest częste i może wpływać na stopień uszkodzenia wątroby, jednakże izolowane występowanie zakażenia HGV nie wydaje się wywoływać objawów klinicznych.

Wnioski:

1. Stwierdzenie stosunkowo wysokiego odsetka chorych dializowanych wykazujących przeciwciała przeciw wirusom C i G zapalenia wątroby jak również obecności materiału genetycznego tych wirusów potwierdza fakt, że infekcje HCV i HGV są częste u chorych hemodializowanych.

2. Stwierdzenie obecności HCV RNA u 10,4% pacjentów hemodializowanych niewykazujących obecności przeciwciał anti-HCV nakazuje traktować każdego chorego dializowanego jako potencjalnie zakaźnego.
3. Czasokres dializoterapii i wcześniej wykonywane procedury medyczne (przeszczep nerki) mają istotny wpływ na częstość występowania zakażeń HCV.
4. Obecność zakażenia HCV lub współistnienie zakażenia HCV i HGV może odpowiadać za wysoki odsetek zmian w badaniu USG wątroby.
5. Występujące u wysokiego odsetka dializowanych zakażenie wirusem G wydaje się nie mieć istotnego wpływu na zachowanie się aktywności badanych enzymów wątrobowych natomiast może pogłębiać stopień uszkodzenia wątroby stwierdzany w badaniu USG.
6. Częste współistnienie zakażenia HCV i HGV może wskazywać na podobną drogę ich przenoszenia.