

The National Academy of Clinical Biochemistry

Presents

LABORATORY MEDICINE PRACTICE GUIDELINES

**WYTYCZNE LABORATORYJNE
DOTYCZĄCE BADAŃ PRZESIEWOWYCH,
ROZPOZNAWANIA I MONITOROWANIA
USZKODZEŃ WĄTROBY**

Wydawca:
Abbott Laboratories Poland Sp. z o.o.
02-672 Warszawa, ul. Domaniewska 41
tel. (0-22) 606 10 50

Tłumaczenie:
Rozdział I: Prof. dr hab. med. Dagna Bobilewicz
Rozdziały II-VI: MedLoc, biuro tłumaczeń medycznych

Skład, przygotowanie do druku:
MedLoc, biuro tłumaczeń medycznych
00-680 Warszawa, ul. Poznańska 12/37
tel. (0-22) 696 19-29

Warszawa 2001

ISBN 83-910624-7-3

Copyright©2000 by the National Academy of Clinical Biochemistry. Niniejsza publikacja ani żadna jej część nie może reprodukowana, przechowywana w systemach wyszukiwania informacji, tłumaczona na inne języki lub przesyłana w jakiegokolwiek postaci bez pisemnej zgody Narodowej Akademii Biochemii Klinicznej. Zgodę taką można uzyskać pod adresem NACB, 2101 L Street N.W., Suite 202, Washington, DC 20037-1526. Zgoda może być przyznana pod warunkiem umieszczenia w widocznym miejscu, na początku dokumentu logo NACB oraz poniższej informacji:

Reprodukowane (Przetłumaczone) za zgodą National
Academy of Clinical Biochemistry, Washington, DC.



WYTYCZNE LABORATORYJNE DOTYCZĄCE BADAŃ PRZESIEWOWYCH, ROZPOZNAWANIA I MONITOROWANIA USZKODZEŃ WĄTROBY

WYDAWCA

Dr Robert Dufour

Chief, Pathology and Laboratory Medicine Service, VA Medical Center, Washington DC;
Professor of Pathology, George Washington University School of Medicine.

KOMITET DS. WYTYCZNYCH

John A. Lott

Professor of Pathology, The Ohio State University College of Medicine

Frederick S. Nolte

Associate Professor of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine

David R. Gretch

Associate Professor of Laboratory Medicine, University of Washington School of Medicine

Raymond S. Koff

Professor of Medicine, University of Massachusetts Medical Center

Leonard B. Seeff

Senior Scientist, Hepatitis C Programs, National Institute of Diabetes, Digestive and Kidneys Diseases, National Institutes of Health; Professor of Medicine, Georgetown University School of Medicine

Obszerne fragmenty tej monografii były wcześniej publikowane w czasopiśmie *Clinical Chemistry* i są przedrukowane za zgodą Wydawcy.

„Wytyczne dla laboratoryjnej praktyki medycznej“ to nowa nazwa programu Narodowej Akademii Biochemii Klinicznej znanego wcześniej jako „Standardy praktyki laboratoryjnej“.

Fragment niniejszej monografii omawiający dopuszczalne zakresy błędów badań laboratoryjnych powstał dzięki współpracy z Komitetem ds. Wytycznych w Praktyce Medycznej Amerykańskiego Towarzystwa Badań Chorób Wątroby (AASLD).

Wstęp

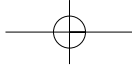
Uszkodzenia hepatocytów są problemem często spotykanym w praktyce medycznej. Liczba przypadków ostrych wirusowych zapaleń wątroby znacząco zmniejszyła się w ostatniej dekadzie w związku z wprowadzeniem szczepień przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu A i B oraz dzięki badaniom dawców na obecność zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C. Liczba innych ostrych uszkodzeń wątroby nie zmieniła się znacząco, wzrosła natomiast liczba rozpoznań przewlekłych uszkodzeń tego narządu. W Stanach Zjednoczonych około 1 milion osób cierpi z powodu przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B, zaś 2,1 - 2,8 miliona - przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (1). Marskość wątroby zajmuje obecnie dziewiąte miejsce wśród głównych przyczyn zgonów w Stanach Zjednoczonych (2); przewiduje się, że liczba zgonów z powodu marskości wywołanej przewlekłym zapaleniem wątroby typu C wzrośnie o 223% do 2008 roku i o 360% do 2028 roku (3). W ostatnich 20 latach liczba przypadków raka wątrobowokomórkowego uległa podwojeniu (4) i oczekuje się dalszego wzrostu o 68% w ciągu następnej dekady w związku z rozwojem nowotworu u osób przewlekle zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (3).

Schorzenia wątroby pozostają często nieme klinicznie aż do momentu ich znacznego zaawansowania i dlatego do rozpoznania uszkodzenia tego narządu oraz określenia jego typu zwykle konieczne są badania laboratoryjne. Najczęstszą na świecie przyczyną uszkodzeń wątroby są infekcje wirusami, które atakują głównie ten narząd i z tego powodu określane są mianem wirusów zapalenia wątroby. Zastosowanie badań serologicznych oraz testów opartych o analizę kwasów nukleinowych jest konieczne do udokumentowania ekspozycji oraz obecności zakażenia, służą one również do monitorowania leczenia osób zakażonych. Uszkodzenia wątroby mogą być spowodowane innymi licznymi chorobami, szczególnie zaburzeniami autoimmunologicznymi oraz wrodzonymi lub nabytymi zaburzeniami metabolicznymi. Badania laboratoryjne mają kluczowe znaczenie w rozpoznawaniu tych schorzeń, szczególnie w przypadku pacjentów, u których brak jest dowodów zakażenia wirusowego. Ponadto przyczyną uszkodzenia wątroby może być etanol i leki. Dla wykrycia tych potencjalnych czynników uszkadzających najistotniejsze znaczenie mają informacje kliniczne.

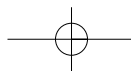
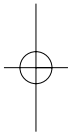
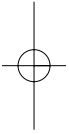
Zalecenia przedstawione w poniższej monografii oparte są na danych, zawartych w publikacjach o wysokiej randze. Wartość naukową danych, które posłużyły do sformułowania poszczególnych zaleceń scharakteryzowano korzystając z kryteriów oceny zaadaptowanych przez Komitet ds. Wytycznych w Praktyce Medycznej Amerykańskiego Towarzystwa Badań Chorób Wątroby (AASLD), które przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Sposób określania wartości informacji (wg AASLD), na podstawie których zostały sformułowane Zalecenia.	
I	Dowody pochodzące z wielu dobrze zaplanowanych, randomizowanych, kontrolowanych badań klinicznych, w których liczba objętych obserwacją pacjentów pozwalała na uzyskanie znaczących danych statystycznych
II	Dowody pochodzące z co najmniej jednego dobrze zaplanowanego badania klinicznego, z lub bez randomizacji, z licznych lub kontrolowanych badań analitycznych lub dobrze zaplanowanych metaanaliz
III	Dowody oparte o doświadczenie kliniczne, badania opisowe lub raporty zespołów ekspertów
IV	Nie oceniane
A	Korzyści dotyczące przeżywalności
B	Poprawa trafności rozpoznania
C	Poprawa jakości życia
D	Znacząca poprawa parametrów patofizjologicznych
E	Wpływ na koszty służby zdrowia

W przypadku każdego **Zalecenia** liczba rzymska od I do IV opisuje pochodzenie dowodów, na których oparte jest dane Zalecenie, zaś litera od A do E określa korzyści, płynące z jego stosowania. W związku z charakterem opracowania w **Zaleceniach** wykorzystano wyłącznie kategorie B i E.



Historical



Spis treści

Rozdział I

Rola dopuszczalnych zakresów błędów dla określenia przydatności badań laboratoryjnych oceniających czynność wątroby oraz uszkodzenia jej mięszu 8

Rozdział II

Markery serologiczne zapalenia wątroby oraz badanie kwasów nukleinowych 30

Rozdział III

Ostre uszkodzenie wątroby 40

Rozdział IV

Przewlekłe uszkodzenie wątroby 53

Rozdział V

Marskość wątroby 71

Rozdział VI

Rak wątrobowokomórkowy 73

Bibliografia 76

Dodatek

Sponsorzy korporacyjni / Podziękowania / Dodatkowe publikacje 92

Rozdział I

Rola dopuszczalnych zakresów błędów dla określenia przydatności badań laboratoryjnych oceniających czynność wątroby oraz uszkodzenia jej mięszu

Parametry analityczne i pozaanalityczne oznaczeń laboratoryjnych

Badania laboratoryjne znalazły zastosowanie do rozpoznawania, monitorowania przebiegu choroby i określania rokowania u pacjentów ze schorzeniami wątroby. Na jakość wyników wpływa wiele czynników, związanych zarówno z postępowaniem przedanalitycznym jak również z samą procedurą analityczną. Podstawowe znaczenie w charakterystyce jakości wyników badań ma dokładność określająca błąd systematyczny oraz precyzja, która w istocie rzeczy określa nieprecyzyjność wykonania i w dalszej części tego opracowania będzie określana jako „błąd precyzji“. Błąd systematyczny stanowi o różnicy pomiędzy wartością otrzymaną a wartością rzeczywistą i jest spowodowany niedoskonałością procesu analitycznego. Błąd precyzji spowodowany jest zarówno czynnikami fizjologicznymi jak i analitycznymi. Nawet w warunkach fizjologicznych wyniki badań u danej osoby podlegają wahaniom związanym tak ze zmiennością przypadkową jak i możliwą do przewidzenia, określaną jako zmienność wewnątrzsobnicza. Ma na nią wpływ szereg czynników jak na przykład spożycie posiłku, pora dnia, wysiłek fizyczny, ostre schorzenia oraz inne warunki stresogenne. Istnieją również znaczące różnice między wynikami poszczególnych osób, które określa się jako zmienność międzysobniczą. Przy interpretacji wyników badań laboratoryjnych traktowanych jako wykładniki stanu zdrowia należy brać pod uwagę wszystkie w/w czynniki, tzn. zmienność wewnątrzsobniczą, międzysobniczą i analityczną.

Parametry analityczne badań pozwalają ocenić zmienność analityczną, a tym samym przydatność kliniczną wyników dla oceny stanu zdrowia pacjenta. Parametry te mogą być wyznaczone różnymi metodami, obejmującymi (w kolejności od najbardziej do najmniej znaczącego czynnika):

- wnioski z badań medycznych,
- dane dotyczące zmienności biologicznej,
- opinie lekarzy-klinicyistów oraz towarzystw (autorytetów) zawodowych,
- dane pochodzące z badań biegłości oraz wytycznych rządowych (5).

Wytyczne dotyczące parametrów jakości wyników powinny obejmować dopuszczalną wartość błędu precyzji, błędu systematycznego oraz tzw. błędu całkowitego (błąd systematyczny + $1,65 \cdot$ błąd precyzji). Przyjmuje się, że docelowy błąd precyzji stanowi

mniej niż połowę wartości zmienności wewnątrzsobniczej dla danego testu, zaś docelowa wartość błędu systematycznego jest mniejsza od jednej czwartej wartości zmienności wewnątrzsobniczej (cv_i) i międzysobniczej (cv_g), obliczonej jako $1/4 (cv_i^2 + cv_g^2)^{1/2}$ (6). Wszystkie wartości wyrażone jako współczynniki zmienności - cv. W tabeli 2 zebrano opublikowane dane dotyczące parametrów jakości oraz precyzji wewnątrzlaboratoryjnej dla testów stosowanych w badaniach wątroby.

Tabela 2. Parametry jakości oraz precyzja (w procentach) testów panelu wątrobowego							
Pochodzenie zaleceń	Rodzaj zaleceń	AlAT	AspAT	Fosfataza zasadowa	γ -glutamylotranspeptydaza (GGT)	Albuminy	Billirubina
Parametry							
CLIA	Zarządzenie obligujące	BC 20	BC 20	BC 30		BC 10	BC 20 lub 0,4 mg/dl
Europejskie (7)	Zmienność biologiczna	N 13,6 B 13,6 BC 36	N 7,2 B 6,2 BC 18	N 3,4 B 6,4 BC 12	B/D	N 1,4 B 1,1 BC 3,4	N 11,3 B 9,8 BC 28
Ricos (8)	Zmienność biologiczna	N 12,2 B 12,2 BC 32	N 6,0 B 5,4 BC 15	N 3,2 B 6,4 BC 12	N 6,9 B 10,8 BC 22	N 1,6 B 1,3 BC 3,9	N 12,8 B 10 BC 31
Skendzel (9)	Opinia kliniczna	B/D	BC 26	B/D	B/D	B/D	BC 23
Precyzja wewnątrzlaboratoryjna (w procentach)							
Lott (10)	Testy biegiłości	8	9	5	6	B/D	B/D
Ross (11)	Testy biegiłości	B/D	B/D	B/D	B/D	4,4	8,9
BC - błąd całkowity; N - błąd precyzji; B - błąd systematyczny; B/D - brak danych							

Zakresy wartości referencyjnych

W celu określenia prawdopodobieństwa obecności choroby, wyniki badań są najczęściej porównywane z wartościami otrzymanymi u zdrowych osób; zakres takich wartości określany jest mianem zakresu wartości referencyjnych, który jest ograniczony przez górną i dolną wartość graniczną. Większość laboratoriów jako zakres wartości referencyjnych przyjmuje wartości, obejmujące 95% populacji osób zdrowych nie różnicując tej populacji według płci i wieku. Jest wiele czynników, które poza stanem chorobowym mogą wpływać na wyniki badań co w szczególności odnosi się do laboratoriów stosujących jeden zakres wartości referencyjnych dla całej populacji. Dane dotyczące czynników wpływających na wynik przedstawiono dla poszczególnych badań profilu wątrobowego w tabelach i na rysunkach.

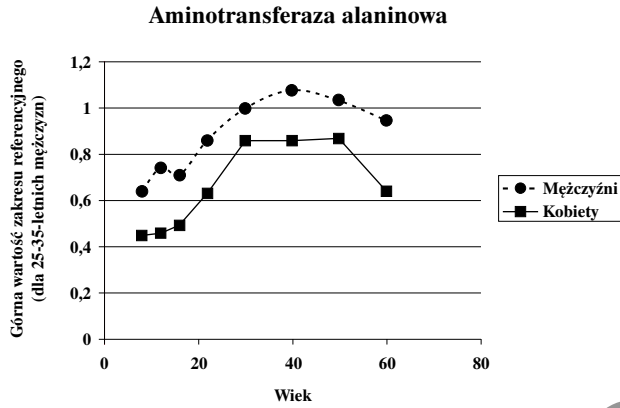
W przypadku niektórych badań górna granica zakresu referencyjnego jest określana w oparciu o badania kliniczne korelujące tę wartość z zachorowalnością na daną chorobę. Przykładem mogą być ściśle określone wartości progowe dla cholesterolu i glukozy na czczo. Praktyczne wykorzystanie tak wyznaczonych wartości progowych wymaga odpowiedniej standaryzacji badań tak, aby wyniki uzyskiwane w różnych laboratoriach były w pełni porównywalne. Dane pochodzące z badań prawdopodobieństwa przeniesienia infekcji w czasie przetoczenia krwi sugerowały, iż górna wartość zakresu referencyjnego dla AlAT może być wyznaczona właśnie na podstawie takiej procedury, jednak brak możliwości standaryzacji oznaczeń tego parametru wykluczył tę możliwość. Brak jest danych dotyczących innych badań związanych z patologią wątroby.

Aminotransferazy

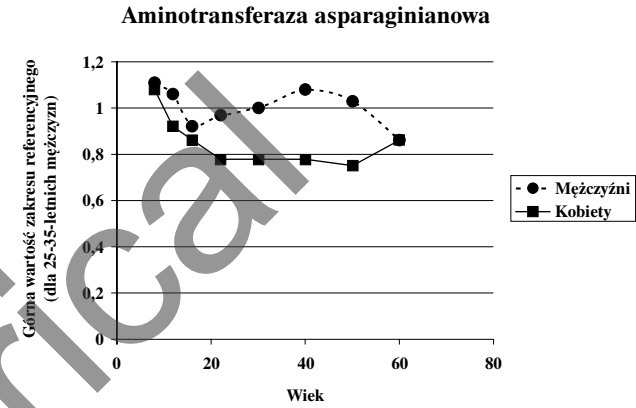
Aminotransferaza asparaginianowa (AspAT, określana również skrótem GOT) oraz aminotransferaza alaninowa (AlAT, określana również skrótem GPT) są szeroko rozpowszechnione w organizmie i obecne we wszystkich komórkach ustroju. AspAT znajduje się głównie w sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych i nerkach, zaś AlAT w wątrobie i nerkach oraz, w mniejszych ilościach, w sercu i mięśniach szkieletowych. Aktywność AspAT i AlAT w wątrobie jest odpowiednio 7000 i 3000 razy większa niż w surowicy (12). AlAT jest enzymem wyłącznie cytoplazmatycznym, AspAT natomiast występuje zarówno w formie mitochondrialnej jak i cytoplazmatycznej (13). Okres półtrwania dla całkowitej AspAT wynosi 17 ± 5 godzin, zaś dla AlAT 47 ± 10 godzin (14). Okres półtrwania mitochondrialnej formy AspAT osiąga średnio wartość 87 godzin (15). U dorosłych aktywność AspAT i AlAT jest znacząco wyższa u mężczyzn niż u kobiet, zaś zakresy wartości referencyjnych zmieniają się wraz z wiekiem (Rysunki 1 i 2).

Do około 15 r.ż. aktywność AspAT jest nieco wyższa niż AlAT, po czym sytuacja ulega odwróceniu w 15 r.ż. u płci męskiej, zaś u płci żeńskiej trwa to do 20 r.ż. (17). U dorosłych aktywność AspAT jest niższa niż AlAT do wieku około 60 lat, kiedy to wartości te ulegają wyrównaniu. Ze względu na niewielkie różnice wiekowe w zakresie wartości referencyjnych nie stosuje się odrębnych zakresów dla populacji w wieku 25 - 60 lat, w której mieści się większość przewlekłych uszkodzeń wątroby. Konieczne jest stosowanie odrębnych zakresów dla dzieci i osób starszych, co może wymagać wprowadzenia ogólnokrajowego programu badań, pozwalającego na zebranie wystarczającej liczby próbek od zdrowych osób.

Choroby wątroby są najważniejszą przyczyną podwyższenia aktywności AlAT i częstą przyczyną podwyższonej aktywności AspAT. Na aktywność tych enzymów wpływa wiele czynników innych niż schorzenia wątroby; zebrano je w Tabeli 3.



Rysunek 1 – Wpływ wieku i płci na górne wartości zakresu referencyjnego dla AlAT. Górną wartość zakresu referencyjnego dla mężczyzn w wieku 25-35 lat określono w jednostkach względnych jako 1,0. Rośnie ona od dzieciństwa do około 40 r.ż., przy czym wzrost ten jest większy u mężczyzn niż u kobiet; u mężczyzn wieku 40 lat jest wyższa o około 10% niż u mężczyzn 25-letnich. Po 40 r.ż. ponownie zmniejsza się, przy czym zmiana jest wyraźniej widoczna u mężczyzn. (16)



Rysunek 2 – Wpływ wieku i płci na wartość górnej wartości zakresu referencyjnego dla AspAT. Górną wartość zakresu referencyjnego dla mężczyzn w wieku 25-35 lat określono w jednostkach względnych jako 1,0. Rośnie ona od dzieciństwa do okresu wczesnej dorosłości, jednak aż do 60 r.ż. zmiany wraz z wiekiem są stosunkowo niewielkie. W każdym przedziale wiekowym, z wyjątkiem dzieciństwa i wieku podeszłego, jest ona w przybliżeniu 25-30% wyższa u mężczyzn niż u kobiet. (16)

Tabela 3. Czynniki wpływające na aktywność AspAT i AlAT inne niż uszkodzenia wątroby				
Czynnik	AspAT	AlAT	Pozycje piśmiennictwa	Komentarz
Pora dnia		45% zmienność w ciągu dnia; najwyższa wartość po południu, najniższa w nocy	18	Brak znaczących różnic między godz. 9 i 21; zarówno w chorobach wątroby jak i u osób zdrowych
Zmienność z dnia na dzień	5-10% zmienność między poszczególnymi dniami	10-30% zmienność między poszczególnymi dniami	19	Podobne zmiany w chorobach wątroby i u osób zdrowych, a także u osób starszych i młodych
Rasa/pleć	15% wyższe u mężczyzn rasy czarnej		21	Brak znaczących różnic między kobietami rasy czarnej i innych ras
Wskaźnik masy ciała (BMI)	40-50% wyższe przy wysokim BMI	40-50% wyższe przy wysokim BMI	17, 22, 23	Bezpośredni związek między wagą i AspAT, AlAT
Posiłek	Brak wpływu	Brak wpływu	17	
Wysiłek fizyczny	3-krotny wzrost przy forsownym wysiłku	20% niższe u osób o normalnej aktywności fizycznej niż u osób nie ćwiczących lub ćwiczących intensywnie	24, 25	Wpływ wysiłku widoczny jest głównie u mężczyzn; u kobiet różnica jest minimalna (<10%). Aktywność enzymów wzrasta bardziej w przypadku treningu siłowego
Przechowywanie próbek	Stabilne w temperaturze pokojowej przez 3 dni, w chłodniarce przez 3 tygodnie (spadek < 10%); w stanie zamrożenia stabilne przez lata (spadek 10-15%)	Stabilne w temperaturze pokojowej przez 3 dni, w chłodniarce przez 3 tygodnie (spadek 10-15%). Znaczący spadek w przypadku zamrażania i rozmrażania	26, 27, 28	Określenie stabilności na podstawie badania surowicy oddzielonej od elementów morfotycznych; stabilność przez 24 godz. w przypadku pełnej krwi, znaczący wzrost po 24 godz.
Hemoliza, anemia hemolityczna	Znaczący wzrost	Umiarkowany wzrost		Zależne od stopnia hemolizy; zwykle kilkukrotnie mniejszy wzrost niż LDH
Uszkodzenie mięśni	Znaczący wzrost	Umiarkowany wzrost		Powiązane ze stopniem podwyższenia kinazy kreatynowej
Inne	Makroenzymy	Makroenzymy	29, 30	Najczęściej stabilne podwyższenie aktywności dotyczy wyłącznie jednego z enzymów (AspAT lub AlAT)

Nieoczekiwanie nieprawidłowe wyniki często okazują się być w normie po ponownym wykonaniu badania. W większości typów schorzeń wątroby aktywność AlAT jest wyższa niż AspAT; wyjątek stanowi alkoholowe zapalenie wątroby, w którym może być wiele przyczyn podwyższenia aktywności AspAT. Alkohol powoduje podwyższenie aktywności mitochondrialnej AspAT w surowicy (31), podczas gdy w innych formach uszkodzeń wątroby zmniejsza się aktywność cytozolowej i mitochondrialnej

AspAT, alkohol natomiast wybiórczo obniża tylko aktywność frakcji cytozolowej (32). Niedobór pirydoksyny, częsty u alkoholików, zmniejsza aktywność wątrobowej AlAT (33); alkohol natomiast indukuje uwalnianie mitochondrialnej AspAT z komórek bez ich widocznego uszkodzenia (34).

W warunkach laboratoryjnych mierzy się aktywność katalityczną AspAT i AlAT (35); obydwie enzymy do utrzymania maksymalnej aktywności wymagają pirydoksal-5'-fosforanu (P-5'-P), chociaż wpływ niedoboru tego związku na AlAT jest silniejszy niż na AspAT (36). W niewydolności nerek aktywności AspAT i AlAT są znacząco niższe niż u osób zdrowych, być może z powodu obecności substancji wiążących P-5'-P, gdyż całkowite stężenie P-5'-P jest podwyższone (37). Z powodu wyraźnych różnic między wynikami uzyskanymi w różnych laboratoriach kluczowe znaczenie mają wysiłki podejmowane w celu standaryzacji metod pomiarowych. Obecnie jedną z metod prowadzących do minimalizacji tych różnic jest wyrażanie wartości jako wielokrotność górnej wartości zakresu referencyjnego (38, 39).

Zgodnie z zaleceniami CLIA dopuszczalna wartość błędu całkowitego dla AlAT wynosi 20%. Dane kliniczne, na podstawie których można określić dopuszczalne granice błędu dla większości testów laboratoryjnych służących do oceny funkcji wątroby, z wyjątkiem AlAT nie są w praktyce dostępne. Pomimo panujących poglądów o dużej zmienności biologicznej AlAT istnieje niewiele danych dotyczących zmienności w przewlekłych chorobach wątroby, szczególnie w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C. W badaniu obejmującym 275 pacjentów z potwierdzonym zakażeniem wirusem HCV, średni międzyosobniczy współczynnik zmienności wynosił 38%, choć u jednej czwartej pacjentów wartość ta była mniejsza niż 23%. (Dufour, obserwacje niepublikowane). W kilku pracach wykazano, że przewlekłe zakażenie wirusem HCV nie wymaga leczenia w przypadkach, kiedy wartości AlAT mieszczą się w zakresie referencyjnym. Tak więc jakość oznaczeń AlAT na poziomach mieszczących się w zakresie wartości referencyjnych ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego leczenia pacjentów z zakażeniem HCV.

Autorzy oraz komitet ds. Wytycznych Postępowania Lekarskiego Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Wątroby (AASLD) są zgodni, że kryteria dopuszczalnych błędów dla AlAT powinny być zdefiniowane dla górnych wartości zakresu referencyjnego oraz że wielkość aktualnie dopuszczalnych błędów nie odpowiada wymogom klinicznym. Dane pochodzące z badań pacjentów ze stabilnymi poziomami AlAT sugerują, iż do prawidłowej kwalifikacji pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z leczenia zakażenia wirusem HCV, błąd całkowity dla górnych wartości referencyjnych nie powinien przekraczać 10%. Dane dotyczące precyzji wewnątrzlaboratoryjnej (Tabela 2) wskazują, że aktualnie stosowane metody uniemożliwiają osiągnięcie tego celu. Najprawdopodobniej konieczne będzie opracowanie programu

standaryzacji dla pomiarów AlAT podobnego do tego, jaki został zastosowany w odniesieniu do oznaczeń CK-MB. Może to wymagać wprowadzenia innych metod, jak np. immunologiczne, umożliwiających osiągnięcie wartości błędu całkowitego pozwalającej na odpowiednie postępowanie z chorymi na przewlekłe zapalenie wątroby.

Zgodnie zarówno z zaleceniami CLIA jak i zmiennością biologiczną dopuszczalna wartość błędu całkowitego dla AspAT waha się pomiędzy 15- 20%, co spełnia wymogi, stawiane dla celów klinicznych rozpoznawania i monitorowania leczenia chorób wątroby (9). W przypadku AspAT wartości błędu całkowitego nie mają tak dużego znaczenia jak w przypadku AlAT; w przewlekłym zakażeniu wirusem HCV nieprawidłowe wartości AspAT stwierdzone są w mniejszej liczbie przypadków niż AlAT (odpowiednio 66% i 71%). Rzadko (u 6% przypadków) stwierdzone są nieprawidłowe wartości AspAT przy prawidłowych wynikach AlAT, z wyjątkiem marskości wątroby lub alkoholizmu (Dufour, obserwacje niepublikowane).

Zalecenia: Metody stosowane do pomiarów aktywności AlAT powinny charakteryzować się całkowitym błędem analitycznym dla górnych wartości referencyjnych <10% (IIB). Aktualne wartości błędu dla pomiarów AspAT (15-20%) spełniają wymogi kliniczne (IIIB).

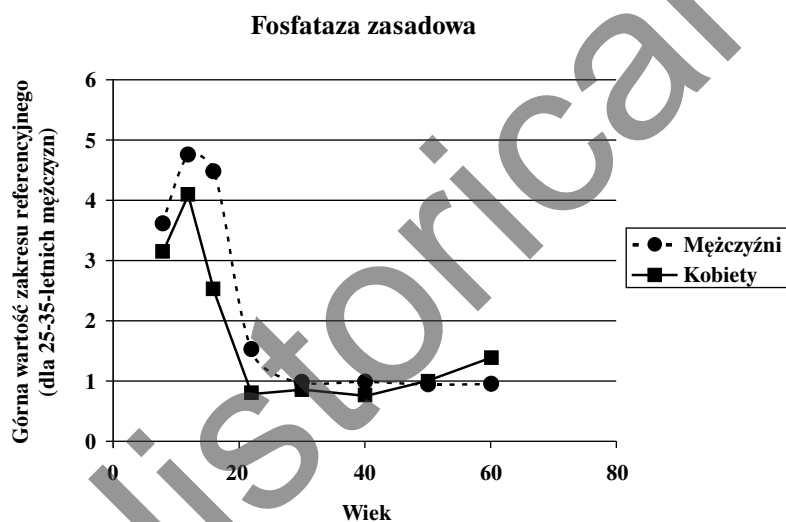
Standaryzacja pomiarów wartości AlAT dla poszczególnych metod oraz standaryzacja międzylaboratoryjna jest głównym wymogiem związanym bezpośrednio z postępowaniem medycznym. Do czasu opracowania standaryzacji (IIIB) należałoby rozważyć wprowadzenie wyników znormalizowanych.

Minimalnym wymogiem jest posiadanie przez laboratorium osobnych zakresów wartości referencyjnych dla dorosłych kobiet i mężczyzn; wspólnym przedsięwzięciem powinno być również opracowanie wartości referencyjnych dla dzieci oraz dla osób w wieku powyżej 60 r.ż. (IIB).

Niewyjaśnione wyniki przekraczające górny zakres referencyjny AlAT i/lub AspAT powinny spowodować powtórzenie oznaczeń. W przypadku osób wykonujących regularne intensywne ćwiczenia fizyczne, ponowne badania powinny być wykonywane po okresie wolnym od wysiłku. Określenie długości tego okresu wymaga osobnych badań. (IIB, E).

Fosfataza zasadowa

Fosfataza zasadowa (AP) uczestniczy w transporcie metabolitów przez błony komórkowe, a jej obecność wykrywana jest w łożysku, śluzówce jelita, nerkach, kościach i wątrobie (kolejność zgodnie z zawartością od najwyższej do najniższej). Fosfataza zasadowa zawarta w kościach, wątrobie i nerkach ma podobną strukturę białkową, kodowaną przez ten sam gen (40, 41); różnice dotyczą zawartości węglowodanów. Okres półtrwania izoenzymu wątrobowego wynosi trzy dni (42). Na Rysunku 3 przedstawiono zmiany górnych wartości zakresu referencyjnego dla fosfatazy zasadowej w zależności od wieku i płci.



Rysunek 3 – Wpływ wieku i płci na górną wartość zakresu referencyjnego dla fosfatazy zasadowej. Górną wartość zakresu referencyjnego dla mężczyzn w wieku 25-35 lat określono w jednostkach względnych jako 1,0. Aktywność fosfatazy zasadowej jest kilkakrotnie wyższa u dzieci i młodzieży; aktywność charakterystyczna dla dorosłych jest osiągnięta około 25 r.ż. Do późnego okresu życia wartości te są nieznacznie wyższe u mężczyzn niż u kobiet. U mężczyzn górne wartości zakresu referencyjnego nie zmieniają się z wiekiem, natomiast u kobiet wzrastają po menopauzie. (16)

Wykorzystanie zakresu wartości referencyjnych odpowiedniego dla wieku ma szczególne znaczenie w interpretacji wyników u dzieci; u dorosłych w wieku 25 - 60 r.ż. bez względu na płeć zakresy referencyjne nie różnią się istotnie. Po 60 r.ż. u kobiet górne wartości ulegają podwyższeniu. Należy zaznaczyć, że w badaniach nie uwzględniono nasilenia osteoporozy, która może być przyczyną zwiększenia aktywności fosfatazy

w surowicy. Poza populacją dzieci stosowanie osobnych zakresów wartości referencyjnych jest również konieczne u kobiet ciężarnych.

Cholestaza stymuluje syntezę fosfatazy zasadowej przez hepatocyty. Sole kwasów żółciowych, detergenty lub inne substancje powierzchniowo czynne ułatwiają uwalnianie enzymu z błon komórkowych (43, 44). W Tabeli 4 ujęto inne czynniki wpływające na aktywność fosfatazy zasadowej.

Tabela 4. Czynniki wpływające na aktywność fosfatazy zasadowej inne niż uszkodzenia wątroby			
Czynnik	Zmiana	Pozycje piśmiennictwa	Komentarz
Zmienność z dnia na dzień	5-10%	19	Podobne zmiany w chorobach wątroby i u osób zdrowych, a także u osób starszych i młodych
Posilek	Wzrost rzędu 30 U/l	45, 46	W przypadku grupy krwi B i 0; podwyższenie utrzymuje się do 12 godzin; wzrost aktywności związany z izoenzymem jelitowym
Rasa/płeć	15% wyższe u mężczyzn rasy czarnej, 10% wyższe u kobiet rasy czarnej	21	
Wskaźnik masy ciała (BMI)	25% wyższe przy wysokim BMI	46	
Wysiłek fizyczny	Brak znaczącego wpływu	25	
Przechowywanie próbek	Stabilne przez 7 dni w chłodziarce, w zamrażarce stabilność rzędu miesięcy	27	
Hemoliza	Hemoglobina hamuje aktywność enzymu	47	
Ciąża	2-3 krotny wzrost w trzecim trymestrze	48	Wzrost aktywności spowodowany obecnością izoenzymu łożyskowego i kostnego
Palenie tytoniu	10% wyższe	21, 46	
Doustne środki antykoncepcyjne	20% niższe	49	
Inne	Wysokie w schorzeniach kości, guzach produkujących fosfatazę zasadową. Niskie po ciężkich zapaleniach jelit (u dzieci) i w hipofosfatemiach.	47	Możliwość różnicowania z chorobami wątroby poprzez określenie izoenzymu i/lub stwierdzenie prawidłowych wartości GGT

Do oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej szeroko stosowana jest metoda Bowers, McComb i Kelly z użyciem p-nitrofenylofosforanu (50). Obecność czynników kompleksujących takich jak cytrynian, szczawian i EDTA, które wiążą kationy cynku i magnezu, będące kofaktorami fosfatazy zasadowej, może fałszywie zaniżyć wyniki, powodując otrzymanie nawet wartości „zerowych“. Przetoczenie krwi, zawierającej cytrynian powoduje przejściowe obniżenie aktywności fosfatazy.

Rozdział izoenzymów fosfatazy zasadowej (kostny, wątrobowy, nerkowy) jest trudny z powodu podobieństw strukturalnych. Najszersze zastosowanie znalazła metoda elektroforezy o wysokiej rozdzielczości oraz ogniskowanie izoelektryczne. Izoenzym kostny może być oznaczany z zastosowaniem inaktywacji cieplnej (metoda niedokładna), przy użyciu metod immunologicznych lub metodą rozdziału elektroforetycznego. Testy immunologiczne są ogólnie dostępne na rynku (51) i mogą być wykorzystane w monitorowaniu pacjentów z chorobami kości. W związku z tym, iż istnieje duża zgodność między podwyższeniem aktywności fosfatazy zasadowej pochodzenia wątrobowego i wzrostem aktywności innych enzymów jak γ -glutamylotranspeptydaza (GGT), współistniejące podwyższenie stężenia GGT jest potwierdzeniem wątrobowego pochodzenia fosfatazy, jednak nie wyklucza współistniejącej choroby kości (52).

W przeciwieństwie do większości enzymów, wewnątrzsobnicza zmienność aktywności fosfatazy zasadowej jest niewielka i średnio wynosi nieco powyżej 3% (Tabela 2). Obecnie błąd całkowity waha się w granicach 10-15%, a średni błąd precyzji wynosi 5%, co jest zbliżone do wymogów klinicznych, określających wartość błędu całkowitego na 12%. Zakres dopuszczalnego błędu całkowitego określony przez CLIA na 30% wydaje się zbyt szeroki dla celów klinicznych i powinien zostać zawężony.

Zalecenia: Testy do pomiarów aktywności fosfatazy zasadowej powinny charakteryzować się całkowitym błędem analitycznym rzędu 10-15% dla górnych wartości referencyjnych (IIB).

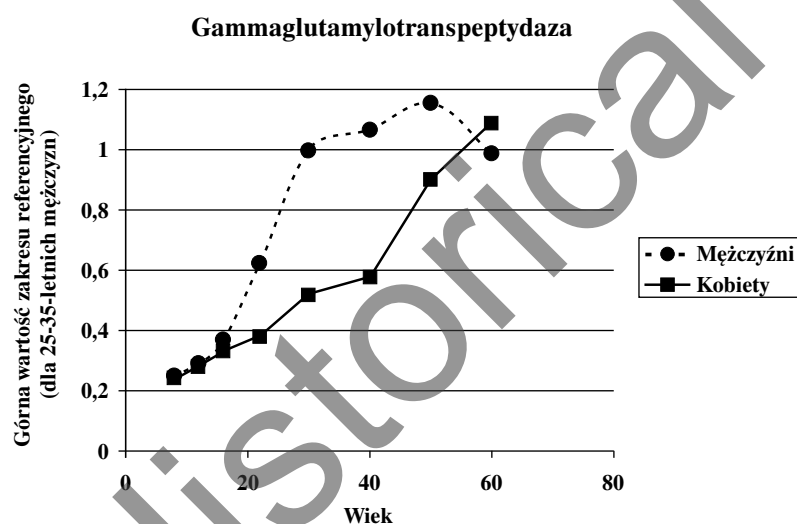
Osobne zakresy wartości referencyjnych powinny być opracowane dla dzieci, z uwzględnieniem wieku i płci, oraz dla kobiet ciężarnych. Dla osób dorosłych w wieku powyżej 25 lat można zastosować jeden zakres. (IIB).

Próbki surowicy do oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej powinny być uzyskiwane z krwi pobieranej od pacjentów będących na czczo; u pacjentów z nieznacznym podwyższeniem wartości fosfatazy, u których nie ma pewności, że byli na czczo przed ewentualnym przystąpieniem do dalszych badań należy dokonać ponownego oznaczenia bezwzględnie na czczo (IIB, E).

Określanie izoenzymów fosfatazy zasadowej lub dołączenie oznaczeń innych enzymów jak np. GGT jest konieczne tylko wówczas, gdy przyczyna podwyższenia aktywności fosfatazy całkowitej nie może być jednoznacznie określona w oparciu o badania kliniczne i laboratoryjne (IIB, E).

Gammaglutamylotranspeptydaza

Gammaglutamylotranspeptydaza (GGT), jest enzymem błonowym obecnym w bliźszych kanalikach nerkowych, wątrobie, trzustce (przewodniki i komórki groniaste) oraz w jelicie (kolejność zgodnie z zawartością w narządach od najwyższej do najniższej). GGT w surowicy jest głównie pochodzenia wątrobowego, jej okres półtrwania wynosi od siedmiu do dziesięciu dni, w uszkodzeniach wątroby pochodzenia alkoholowego ulega wydłużeniu do 28 dni, co sugeruje upośledzenie funkcji oczyszczania, jaką pełni wątroba. Na Rysunku 4 przedstawiono różnice aktywności GGT w zależności od wieku i płci.



Rysunek 4 – Wpływ wieku i płci na górną wartość zakresu referencyjnego dla GGT. Górną wartość zakresu referencyjnego dla mężczyzn w wieku 25-35 lat określono w jednostkach względnych jako 1,0. Górne wartości zakresu referencyjnego dla GGT wraz z wiekiem ulegają podwyższeniu, przy czym jest to wyraźniej zaznaczone u kobiet niż u mężczyzn. Przed 50 r.ż. u mężczyzn są około 25-40% wyższe niż u kobiet, jednak z wiekiem różnice te ulegają zatarciu (16).

Dla mężczyzn w wieku 25-80 lat można zastosować ten sam zakres referencyjny. Wartości referencyjne są około dwukrotnie wyższe u osób pochodzenia afrykańskiego. Ze względu na to, że informacje dotyczące rasy pacjenta na ogół nie są dostępne dla laboratorium, w praktyce nie ma możliwości zastosowania odrębnych zakresów uwzględniających pochodzenie. U kobiet i dzieci górne wartości referencyjne rosną stopniowo wraz z wiekiem i są istotnie niższe niż u dorosłych mężczyzn. Osobne

zakresy referencyjne powinny być wyznaczone dla kobiet i dzieci z uwzględnieniem poszczególnych przedziałów wiekowych w obu grupach. Opracowanie odrębnych zakresów referencyjnych dla dzieci może wymagać wprowadzenia ogólnokrajowego programu badań, pozwalającego na zebranie wystarczającej liczby próbek pochodzących od zdrowych osób.

W chorobach wątroby z niedrożnością dróg żółciowych GGT jest nieco czulszym parametrem niż fosfataza zasadowa. W 93-100% przypadków chorych z cholestazą GGT podwyższona jest średnio 12-krotnie podczas gdy aktywność fosfatazy zasadowej u 91% chorych rośnie średnio 3-krotnie (52, 53, 54). Wydaje się, że wzrost GGT w cholestazie spowodowany jest tym samym mechanizmem co wzrost fosfatazy (54, 55). Aktywność GGT podwyższona jest u 80-95% chorych z jakąkolwiek postacią ostrego zapalenia wątroby (55, 56). W Tabeli 5 zebrano inne czynniki, które wpływają na aktywność GGT.

Tabela 5. Czynniki wpływające na aktywność GGT inne niż uszkodzenia wątroby			
Czynnik	Zmiana	Pozycje piśmiennictwa	Komentarz
Zmienność z dnia na dzień	10-15%	19	Podobne zmiany w chorobach wątroby i u osób zdrowych, a także u osób starszych i młodych
Rasa	Około 2-krotnie wyższa u rasy czarnej	21	Różnice podobne u mężczyzn i kobiet
Wskaźnik masy ciała (BMI)	25% wyższa przy nieznacznie podwyższonym BMI 50% wyższa przy BMI > 30	22	Efekt podobny u mężczyzn i kobiet
Posiłek	Zmniejszenie po posiłku; wzrost wraz z upływem czasu od posiłku	57	
Wyсіłek fizyczny	Brak znaczącego wpływu	57	
Przechowywanie próbek	Stabilne przez 7 dni w chłodziarce, w zamrażarce stabilność rzędu miesięcy	47	
Ciąża	25% niższa we wczesnej ciąży	58, 59	
Leki	Podwyższona po karbamazepinie, cymetydynie, furosemidzie, heparynie, izotretinoinie, metotreksacie, doustnych lekach antykoncepcyjnych, fenobabitlu, fenytoinie, kwasie walproinowym	60	Najczęściej wartości 2-krotnie wyższe od referencyjnych, mogą osiągać wzrost 5-krotny szczególnie w przypadku fenytoiny
Palenie tytoniu	10% wyższe przy wypalaniu 1 paczki papierosów dziennie; około dwukrotnie wyższe w przypadku wypalania większej liczby papierosów	57	
Spożycie alkoholu	Bezpośredni związek między spożyciem alkoholu i aktywnością GGT	57, 61	Może być podwyższona tygodniami po zaprzestaniu przewlekłego przyjmowania alkoholu

Pacjenci z cukrzycą, nadczynnością tarczycy, reumatoidalnym zapaleniem stawów i obturacyjnymi chorobami płuc często wykazują podwyższoną aktywność GGT; przyczyny tego zjawiska są w większości niejasne. Po ostrym zawale mięśnia sercowego, nieprawidłowe stężenie GGT może utrzymywać się tygodniami (62). Wpływ pozawątrobowych czynników na wzrost aktywności GGT sprawia, że wartość predykcja tego parametru w odniesieniu do chorób wątroby jest niska i wynosi tylko 32% (63).

W większości laboratoriów do oznaczeń GGT jest wykorzystywana metoda według Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC) opisana przez Shawn'a (64). Precyzja tej metody przy aktywności stanowiącej mniej niż połowę górnej wartości referencyjnej wynosi około 10%; przy aktywności dwukrotnie wyższej od wartości granicznej, zbliża się do 5%. Dopuszczalna granica błędu całkowitego dla GGT z uwzględnieniem zmienności biologicznej wynosi 20% co jest wystarczające dla celów klinicznych przy założeniu, że generalnie biorąc wartość praktyczna oznaczeń GGT jest ograniczona.

Zalecenia: Testy do pomiarów aktywności γ -glutamylotranspeptydazy powinny charakteryzować się całkowitym błędem analitycznym $\leq 20\%$ dla górnych wartości referencyjnych (IIIB).

Zalecane jest wykonywanie oznaczeń w próbkach pobranych rano od osób będących na czczo (IIB).

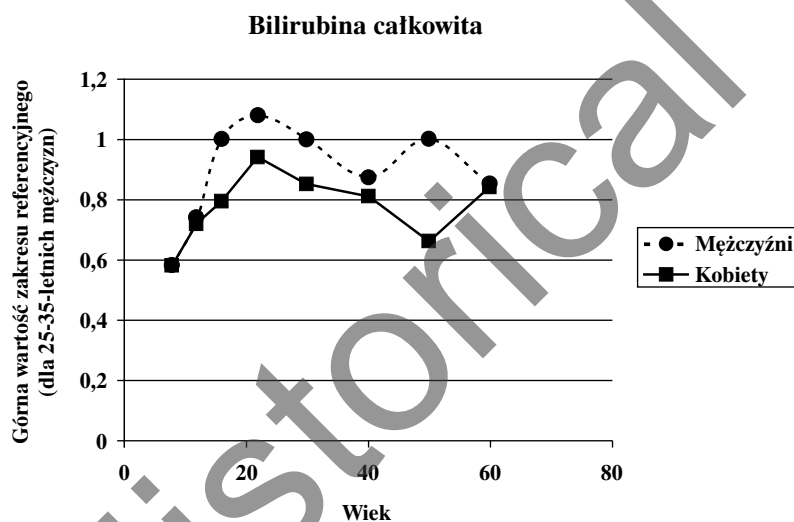
O ile dla dorosłych mężczyzn wystarczające jest stosowanie jednego zakresu wartości referencyjnych tak w przypadku dzieci i dorosłych kobiet konieczne jest wyznaczenie osobnych zakresów referencyjnych uwzględniających wiek (IIB).

Z powodu braku swoistości GGT pomiary tego enzymu powinny być wykonywane w ściśle określonych przypadkach jak np. określenie źródła podwyższonej aktywności fosfatazy zasadowej (IIIB, E).

Bilirubina

Dzienna produkcja niezwiązanej bilirubiny, powstającej głównie z rozpadu erytrocytów wynosi 250 do 350 mg (65). Przy prawidłowych wartościach bilirubiny jej klirens wynosi 5 mg/kg/dobę, czyli u dorosłych około 400 mg/dobę i nie ulega istotnemu zwiększeniu w przypadku hemolizy (66). Okres półtrwania niezwiązanej bilirubiny

jest krótszy niż 5 minut (67). UDP-glukuronilotransferaza katalizuje wiązanie bilirubiny w wątrobie. Bilirubina związana wydalana jest do żółci i zasadniczo nie jest obecna we krwi zdrowych osób. Bilirubina delta (δ -bilirubina, określana czasem również terminem biliproteiny) powstaje z połączenia związanej bilirubiny z albuminami (68), okres półtrwania tego związku wynosi około 17-20 dni (taki sam jak w przypadku albuminy), co sprawia, że u pacjentów powracających do zdrowia po zapaleniu wątroby lub po udrożnieniu przewodów żółciowych żółtaczka utrzymuje się jeszcze przez pewien czas (69). Na Rysunku 5 przedstawiono zmiany górnych wartości zakresu referencyjnego dla bilirubiny w zależności od wieku i płci.



Rysunek 5 – Wpływ wieku i płci na górną wartość zakresu referencyjnego dla bilirubiny całkowitej. Górną wartość zakresu referencyjnego dla mężczyzn w wieku 25-35 lat określono w jednostkach względnych jako 1,0. Górne wartości zakresu referencyjnego dla bilirubiny ulegają podwyższeniu w okresie dzieciństwa i wczesnej młodości, osiągając szczyt w wieku około 20 lat; później wraz z wiekiem wartości te stopniowo zmniejszają się. W każdym wieku są wyższe u mężczyzn niż u kobiet, chociaż różnice te są minimalne u osób starszych (16)

Podwyższenie stężenia bilirubiny związanej jest swoiste dla chorób wątroby oraz przewodów żółciowych (70). Może również występować w związku z upośledzeniem procesu wydalania bilirubiny zależnego od energii, co może mieć miejsce w posocznicy, całkowitym żywieniu pozajelitowym oraz po zabiegach chirurgicznych (71). W okresie zdrowienia po zapaleniu wątroby oraz usunięciu przyczyny niedrożności przewodów żółciowych, stężenie związanej bilirubiny szybko zmniejsza się, podczas gdy zmiany stężenia δ -bilirubiny są wolniejsze (72). Zespół Gilberta, występujący

u około 5% populacji, charakteryzuje się łagodnym podwyższeniem stężenia bilirubiny niezwiązanej spowodowanym niedostateczną aktywnością UDP-glukuronylo-transferazy oraz zmniejszonym wychwytem jonów organicznych (73, 74). Stężenie bilirubiny całkowitej rzadko przekracza 58-85 $\mu\text{mol/l}$ (4-5 mg/dl), nawet przy przedłużającej się głodówce, o ile nie występują inne czynniki współistniejące powodujące podwyższenie stężenia bilirubiny (75). Czynniki te zebrano w Tabeli 6.

Czynnik	Zmiana	Pozycje piśmiennictwa	Komentarz
Zmienność z dnia na dzień	15-30%	19	
Posiłek	Stężenie bilirubiny rośnie średnio 1-2-krotnie w czasie głodówki trwającej do 48 godzin	76, 77	Średnio stężenie wyższe o 20-25% rano na czczo niż po posiłku
Rasa	33% niższe u mężczyzn rasy czarnej, 15% niższe u kobiet rasy czarnej	21, 78	Porównywalne z wartościami w innych grupach rasowych/etnicznych
Wysiłek fizyczny	30% wyższe u mężczyzn	25	Brak znaczącego wpływu w przypadku kobiet
Ekspozycja na światło	Zmniejszenie do 50% po jednej godzinie	79	Większy wpływ na bilirubinę niezwiązaną niż na bezpośrednią
Ciąża	Zmniejszenie o 33% w drugim trymestrze	48	Podobne zmiany w drugim i trzecim trymestrze
Hemoliza	Reakcje krzyżowe w przypadku niektórych testów	47	Hemoglobina absorbuje światło o tej samej długości fali co bilirubina
Doustne leki antykoncepcyjne	15% niższe	49	
Anemia hemolityczna	Zwiększenie stężenia bilirubiny niezwiązanej	47	

Stężenie bilirubiny mierzone jest najczęściej za pomocą dwóch testów określających stężenie bilirubiny całkowitej oraz bilirubiny bezpośredniej; odejmując stężenie bilirubiny bezpośredniej od wartości stężenia bilirubiny całkowitej otrzymać można stężenie bilirubiny pośredniej. Test określający bilirubinę bezpośrednią mierzy głównie δ -bilirubinę oraz bilirubinę związaną a także niewielki procent bilirubiny wolnej (79, 80). Wysokie pH oraz obecność detergentów zwiększa udział bilirubiny wolnej dającej reakcję bezpośrednią; aby temu zapobiec odczynnik do oznaczeń bilirubiny bezpośredniej powinien zawierać co najmniej 50 $\mu\text{mol/l}$ HCl (81). Światło może przekształcać bilirubinę niezwiązaną w fotoizomer dający reakcję bezpośrednią (79); powoduje również obniżenie stężenia bilirubiny całkowitej o 0,34 $\mu\text{mol/l/godzinę}$ (0,02 mg/l/godzinę). Spektrofotometria bezpośrednia (metoda suchej fazy) mierzy oddzielnie stężenie bilirubiny związanej i niezwiązanej, a następnie oblicza stężenie

δ -bilirubiny jako różnicę między sumą tych wartości oraz zawartością bilirubiny całkowitej. Niektórzy sugerują, iż bilirubina związana jest lepszym wskaźnikiem powrotu do zdrowia po chorobach wątroby niż bilirubina „bezpośrednia“ (82).

Dopuszcza się wartość błędu całkowitego do 20% (CLIA) lub 30% (zmiennosc biologiczna). Zdaniem lekarzy 23% zmiana stężenia bilirubiny w zakresie górnych wartości referencyjnych wskazuje na znaczącą zmianę stanu klinicznego (9). Tak więc wymogi jakości określone przez CLIA wydają się być zgodne z wymogami klinicznymi. W przypadku wyższych stężeń, zmiana o 2 mg/dl (5%) uznawana była za znaczącą klinicznie, co oznacza, że przy ustalaniu granic dopuszczalnego błędu musi być uwzględnione również stężenie bilirubiny.

Zalecenia: Testy do pomiarów bilirubiny powinny charakteryzować się całkowitym błędem analitycznym $\leq 20\%$ (lub $6,8 \mu\text{mola/l}$ [$0,4 \text{ mg/dl}$]) dla górnego zakresu stężeń referencyjnych (IIIB).

Dla mężczyzn i kobiet należy ustalić odrębne zakresy wartości referencyjnych. W związku z faktem, iż u dorosłych górne wartości wraz z wiekiem ulegają obniżeniu, nieznaczne podwyższenie stężenia bilirubiny nie ma istotnego znaczenia i można stosować jeden zakres referencyjny bez uwzględnienia wieku. Dla dzieci natomiast powinny być opracowane osobne zakresy referencyjne (IIIB).

Albumina

Albumina jest białkiem produkowanym przez hepatocyty i obecnym w surowicy w dużym stężeniu. Nasilenie produkcji tego białka uzależnione jest od kilku czynników takich jak: podaż aminokwasów, ciśnienie onkotyczne osocza, stężenie cytokin (w szczególności IL-6) oraz liczba czynnych hepatocytów (83). Okres półtrwania albuminy w warunkach prawidłowych wynosi 19-21 dni. Stężenia albuminy u noworodków są niskie i wahają się w granicach 28 do 44 g/l (2,8-4,4 g/dl). W pierwszym tygodniu życia osiągają wartości spotykane u dorosłych - 37 do 50 g/l (3,7-5,0 g/dl), a następnie wzrastają do 45-54 g/l (4,5-5,4 g/dl) w wieku 6 lat i pozostają na tym poziomie do okresu młodości, a następnie rozpoczyna się spadek stężenia do wartości charakterystycznej dla dorosłych. Nie ma znaczących różnic w zakresach wartości referencyjnych dla mężczyzn i kobiet (84). Podwyższenie stężenia albuminy najczęściej spowodowane jest zagęszczeniem krwi w wyniku odwodnienia, przedłużonym uciskiem stazy w czasie pobierania krwi lub parowaniem próbki. Główne przyczyny obniżenia stężenia albuminy to utrata białek (zespół nerczycowy, oparzenia, enteropatia z utratą białka), zwiększony obrót metaboliczny (stany katabolizmu,

glikokortykoidy), zmniejszona podaż białek (niedożywienie, diety z bardzo niską zawartością białek) oraz choroby wątroby. W związku z długim okresem półtrwania stężenie albumin rzadko ulega obniżeniu w ostrym zapaleniu wątroby, natomiast w stanach przewlekłych przechodzących w marskość stopniowo zmniejsza się wraz z postępem choroby. Stężenie albuminy jest markerem dekompensacji oraz ma znaczenie prognostyczne dla rozwoju marskości.

Stężenie albumin jest mierzone najczęściej za pomocą metod wykorzystujących wiązanie barwnika, szczególnie zieleni i czerwieni bromokrezolowej; obecnie około 50% laboratoriów korzysta z tych metod. Metoda z użyciem zieleni bromokrezolowej może dawać nieco wyższe wartości (85), chociaż różnice między obiema metodami są niewielkie (83). Zastosowanie czerwieni bromokrezolowej może być przyczyną niedoszacowania stężenia albuminy w niewydolności nerek (86) oraz u pacjentów z podwyższonym stężeniem δ -bilirubiny (87), co sprawia, że metoda ta nie powinna być stosowana w odniesieniu do surowic żółtaczkowych. Ocena stężenia albumin w oparciu o elektroforezę białek nie jest zalecana w związku z tym, że albuminy wykazują wyższe niż inne białka powinowactwo do barwnika, co jest przyczyną uzyskiwania zawyżonych wartości. (83). Metody immunologiczne nie znalazły szerszego zastosowania do oznaczeń stężenia albumin w surowicy (88).

Optymalny błąd dla oznaczeń albumin uwzględniający zmienność biologiczną określa się na 4%, CLIA dopuszcza błąd rzędu 10%. Znaczne obniżenie stężenia albumin poniżej dolnych wartości referencyjnych jest uznanym parametrem dla rozpoznania marskości wątroby i oceny nasilenia procesu chorobowego. Dane pochodzące z badań Amerykańskiego Kolegium Patologów (CAP) wskazują, że tylko 2% laboratoriów zapewnić może poziom błędów wyznaczony w oparciu o zmienność biologiczną i w związku z tym, zdaniem ekspertów, limit błędów określony przez CLIA jest wystarczający dla celów klinicznych.

Zalecenia: Błąd całkowity < 10% dla dolnych wartości zakresu referencyjnego odpowiada wymogom klinicznym. Błąd optymalny, uwzględniający zmienność biologiczną jest tak mały, że ze względów technicznych większość laboratoriów nie może go osiągnąć (IIB).

Metodą z wyboru stosowaną do oznaczeń stężenia albumin u pacjentów z chorobami wątroby powinna być metoda z użyciem zieleni bromokrezolowej. Zastosowanie czerwieni bromokrezolowej oraz elektroforezy w tej grupie chorych może być przyczyną błędnych wyników (IIB).

Czas protrombinowy

Czas protrombinowy (PT) jest to czas konieczny do utworzenia skrzepu po dodaniu do osocza czynnika tkankowego i fosfolipidów. Na czas ten mają wpływ zmiany aktywności czynników X, VII, V, II (protrombina) i I (fibrynogen). Wszystkie te czynniki syntetyzowane są w wątrobie, zaś trzy z nich (II, VII i X) aktywowane są przez enzym zależny od witaminy K i działający na drodze przyłączenia drugiej, γ -karboksylowej grupy do reszt kwasu glutaminowego. Działanie przeciwkrzepliwe warfaryny, będącej antagonistą witaminy K, polega na hamowaniu γ -karboksylacji, co uniemożliwia wiązanie wapnia i zmniejsza aktywność w/w czynników. Osoby przyjmujące warfarynę lub mające niedobory witaminy K syntetyzują prawidłowe ilości prekursorów czynników krzepnięcia, jednak w formie nieaktywnej zwanej „białkami powstającymi w wyniku niedoboru witaminy K“ (protein induced by vitamin K antagonists - PIVKA). Dostępne są testy immunologiczne mierzące des- γ -karboksyprombiny - białko PIVKA występujące w największej ilości. Czas protrombinowy nie jest bezpośrednio zależny od stężenia poszczególnych czynników krzepnięcia i ulega znaczącemu wydłużeniu dopiero wówczas gdy stężenie czynnika danego czynnika opadnie poniżej 10% procent wartości prawidłowej (89).

PT podawany jest najczęściej w sekundach i porównywany z wartościami referencyjnymi. Czas konieczny do utworzenia skrzepu w próbce jest odwrotnie proporcjonalny do ilości czynnika tkankowego zawartego w odczynnikach. W celu zminimalizowania zmienności PT w zależności od zmiennej zawartości czynnika tkankowego w różnych odczynnikach wprowadzono tzw. Międzynarodowy Wskaźnik Czułości (ISI); im mniejsza ilość czynnika tkankowego, tym niższa wartość ISI i tym dłuższy czas protrombinowy.

Dla zobiektywizowania wyników czasu protrombinowego w zależności od ISI różnych odczynników zawierających czynnik tkankowy wprowadzono współczynnik INR jako formę wyrażania czasu protrombinowego. INR jest wyliczany według poniższego wzoru:

$$INR = \left(\frac{PT_{pacjenta}}{PT_{średnia\ wartość\ dla\ próbki\ kontrolnej}} \right)^{ISI}$$

Użycie odczynników z niskimi wartościami wskaźnika ISI poprawia powtarzalność pomiarów INR i sprawia, że mogą one być stosowane do monitorowania leczenia przeciwkrzepliwego (90).

Wpływ wartości ISI na PT jest znacznie większy w przypadku leczenia pochodnymi warfaryny niż w chorobach wątroby, tak więc wartość INR nie oddaje dokładnie stopnia hamowania układu krzepnięcia w schorzeniach wątroby (89, 91, 92). W próbkach pochodzących od pacjentów przyjmujących warfarynę stwierdzano PT 20 sekund przy stosowaniu odczynników z wysokim ISI oraz PT 40 sekund, przy stosowaniu odczynników z niskim ISI, jednak INR w obu przypadkach był identyczny (89). Tak więc wskaźnik INR normalizuje wyniki otrzymywane u pacjentów leczonych warfaryną pomimo różnic w wartościach ISI stosowanych odczynników. W chorobach wątroby zmniejszenie wartości ISI odczynników powoduje tylko nieznaczne wydłużenie czasu protrombinowego. Przykładowo, dla próbki pochodzącej od osoby ze schorzeniem wątroby PT ma wartość 20 sekund przy zastosowaniu odczynników z wysokim ISI, zaś 23,6 sek. w przypadku odczynników z niskimi wartościami ISI. W przeciwieństwie do pacjentów przyjmujących warfarynę, u których INR jest praktycznie identyczny bez względu na ISI w powyższym przypadku INR miał wartość 2,9 przy zastosowaniu odczynników z wysokim ISI oraz 1,86 przy zastosowaniu odczynników z niskim ISI (89). W chorobach wątroby stosowanie odczynników o niskim wskaźniku ISI i podanie czasu protrombinowego w INR w znacznym stopniu niedoszacowuje stopień zaburzeń układu krzepnięcia. Prawdopodobną przyczyną rozbieżności w użyteczności wyrażania czasu protrombinowego w INR w chorobach wątroby i monitorowaniu terapii warfaryną są znaczące różnice w proporcjach protrombiny i des- γ -karboksyprotrombiny. U pacjentów przyjmujących warfarynę lub mających niedobory witaminy K obserwuje się znaczące podwyższenie stężenia des- γ -karboksyprotrombiny i zmniejszenie ilości natywnej protrombiny, natomiast u pacjentów z ostrym zapaleniem lub marskością wątroby stwierdza się zmniejszenie ilości natywnej protrombiny z tylko nieznacznym podwyższeniem ilości des- γ -karboksyprotrombiny (93). Niektóre preparaty czynnika tkankowego są hamowane przez des- γ -karboksyprotrombinę (93).

PT jest wydłużony, zwykle co najmniej o 3 sekundy w stosunku do średniej wartości dla populacji, w ostrym niedokrwinnym (94, 95) i toksycznym (96) zapaleniu wątroby, rzadko natomiast jest wydłużony powyżej trzech sekund w zapaleniu wirusowym (97) lub alkoholowym (98, 99). PT jest często wydłużony w żółtaczce mechanicznej i może reagować na podanie witaminy K drogą pozajelitową. W przewlekłym zapaleniu wątroby czas protrombinowy mieści się zazwyczaj w granicach wartości referencyjnych, natomiast ulega wydłużeniu przy progresji i pozostaje wydłużony u pacjentów z marskością (100). W Tabeli 7 zebrano pozostałe czynniki wpływające na wartość czasu protrombinowego.

Tabela 7. Czynniki wpływające na czas protrombinowy		
Czynnik	Zmiana	Pozycje piśmiennictwa
Przechowywanie próbek	Brak zmian w temperaturze pokojowej do 3 dni; zamrażanie skraca PT	101
Stężenie cytrynianu	Zaleca się stężenie 3,2%	102
Zbyt mała objętość krwi	Falszywie wydłużony PT	102
Wysoki hematokryt	Falszywie wydłużony PT	102
Inne czynniki	Warfaryna, zaburzenia wchłanianie, niedobory witaminy K, leki obniżające produkcję witaminy K (szczególnie antybiotyki, pochodne kwasu fibrynowego) oraz koagulopatia ze zużycia wydłużają PT	

W przypadku stosowania różnych aparatów pomiarowych (nawet w obrębie tego samego modelu) wyniki uzyskane odczynnikami o tej samej wartości ISI są zazwyczaj różne (103). Zastosowanie odczynników o tym samym ISI pochodzących od różnych producentów, może dawać różne wartości INR w odniesieniu do tej samej próbki (104). Powtarzalność pomiarów PT w obrębie danego laboratorium, stosującego ten sam aparat i te same odczynniki waha się w przedziale od 3-8%, gdy czasy protrombinowe są wydłużone zmienność INR jest większa niż czasu protrombinowego. Średnia wewnątrzlaboratoryjna zmienność INR szacowana jest na $\pm 10\%$ (105). Zmienność międzylaboratoryjna wartości PT określanych przy zastosowaniu różnych odczynników może być znaczna; w jednym z badań sięgała 20% (104). Ostatnio wykazano, że użycie osoczy wzorcowych w celu wyznaczenia wartości ISI dla odczynników i aparatury używanych w poszczególnych laboratoriach, znacząco poprawia powtarzalność wyników INR (104, 106, 107).

Zalecenia: Do określania czasu protrombinowego u pacjentów z chorobami wątroby należy raczej wyrażać PT w sekundach niż INR; nie zapewnia to jednak porównywalności wyników między laboratoriami (IIB).

W odniesieniu do oznaczeń czasu protrombinowego w chorobach wątroby konieczne jest wykonanie dodatkowych badań dotyczących standaryzacji odczynników oraz wartości diagnostycznej wyliczanych wskaźników (w procentach, INR).

Amoniak (NH₃)

Amoniak jest produktem metabolizmu aminokwasów; usuwany jest on z organizmu głównie poprzez produkcję mocznika w wątrobie. *Helicobacter pylori* - mikroorganizm obecny w śluzówce żołądka wydaje się być istotnym źródłem amoniaku u pacjentów z marskością wątroby (108). W chorobach wątroby podwyższone stężenie NH₃ jest zwykle objawem niewydolności tego narządu. Wysokie stężenia amoniaku obserwowane są w niedoborach enzymów biorących udział w cyklu mocznikowym (110), w zespole Reye'a (111) oraz w ostrej lub przewlekłej encefalopatii wątrobowej (112, 113). Umiarkowane podwyższenie stężenia NH₃ w surowicy stwierdzone jest u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby i jest proporcjonalne do

Tabela 8. Czynniki wpływające na stężenie amoniaku inne niż uszkodzenia wątroby			
Czynnik	Zmiana	Pozycje piśmiennictwa	Komentarz
Wiek	4-8-krotnie wyższe u noworodków; 2-3-krotnie wyższe u dzieci < 3 r.ż.; w wieku dojrzewania osiąga wartości charakterystyczne dla dorosłych	119	
Rodzaj materiału	We krwi tętniczej stężenie wyższe niż we krwi żyłnej; różnice są znacznie większe w przypadku chorób nerek i wątroby. W przypadku krwi włosniczkowej wartości podwyższone w związku z obecnością amoniaku w pocie i możliwym zanieczyszczeniem próbki o ile jeśli skóra nie była odpowiednio oczyszczona.	112, 120	Ze zmianami funkcji wątroby koreluje wyłącznie stężenie amoniaku we krwi tętniczej. Zastosowanie opaski uciskowej oraz zaciskanie pięści zwiększa stężenie amoniaku we krwi żyłnej.
Wysiłek fizyczny	Maksymalnie trzykrotny wzrost po wysiłku	121	Podwyższenie stężenia wyższe u mężczyzn niż u kobiet.
Palenie tytoniu	Podwyższenie o 10 mmol/l po wypaleniu jednego papierosa	120	
Czas przechowywania próbki	Stężenie amoniaku rośnie z powodu metabolizmu komórkowego: 20% wzrost po 1 godzinie i 100% wzrost po 2 godzinach.	122	Szybkie schłodzenie próbki oraz szybkie oddzielenie osocza minimalizuje wzrost stężenia amoniaku. Szybkość wzrostu stężenia większa w chorobach wątroby z powodu wysokiej aktywności GGT w próbkach
Inne czynniki	Podwyższone w ostrej białaczce, po przetoczeniach krwi, przeszczepach szpiku kostnego, przeciekach wrotnych (portal shunts), krwawieniach z przewodu pokarmowego lub przy wysokiej podaży białek	123, 124	
Leki	Kwas walproinowy, glicyna (zawarta w płynach służących do płukania po resekcjach gruczołu krokowego i endometrium) zwiększają produkcję amoniaku	125, 126	

rozległości zmian (114). Wykorzystanie NH_3 do monitorowania pacjentów z encefalopatią jest kwestią kontrowersyjną; niektóre badania wskazują na dobrą korelację między stężeniem amoniaku a stopniem zaawansowania encefalopatii (111, 113), podczas gdy inne prace nie potwierdzają tej zależności (115). Wydaje się, że NH_3 nasila działanie kwasu γ -aminomasłowego (GABA) (116) i zwiększa liczbę receptorów benzodwuzepinowych (117). Zarówno GABA jak i benzodwuzepiny brane były pod uwagę jako czynniki patogenetyczne encefalopatii wątrobowej. Z drugiej strony, objawy kliniczne obserwowane u osób z izolowaną hiperamonemią nie są identyczne z objawami występującymi w encefalopatii wątrobowej (118). W Tabeli 8 przedstawiono inne czynniki wpływające na stężenie amoniaku.

Należy oddzielić osocze od komórek w ciągu godziny od pobrania próbek; w przypadku pacjentów z chorobami wątroby idealnym rozwiązaniem byłoby oddzielenie elementów morfotycznych w ciągu 15 minut (120, 122).

Do pomiaru stężenia amoniaku wykorzystywano różne metody (120), obecnie najpopularniejsze są testy enzymatyczne. Znana jest również technologia tzw. suchej fazy w której zastosowano zasadowe pH w celu przekształcenia jonu amonowego w amoniak i pomiarze ilości amoniaku za pomocą błękitu bromofenolowego. Zmienność międzylaboratoryjna przy zastosowaniu tej samej metody waha się w przedziale od 10 do 20%, natomiast w przypadku zastosowania różnych metod różnice są średnio mniejsze niż 10% (127)

Zalecenia: Pomiar amoniaku w osoczu dla celów diagnostycznych lub monitorowania przebiegu encefalopatii wątrobowej nie jest zalecany jako badanie rutynowe u pacjentów z ostrymi lub przewlekłymi schorzeniami wątroby; metoda ta może być użyteczna u pacjentów z encefalopatią o niejasnej etiologii (IIB).

Zaleca się wykonywanie pomiarów stężenia amoniaku w krwi tętniczej, a nie żylniej (IIB).

W celu uniknięcia fałszywego podwyższenia stężenia amoniaku należy oddzielić osocze od elementów morfotycznych krwi ciągu 15 minut od pobrania próbki (IIB).

Rozdział II

Markery serologiczne zapalenia wątroby oraz badanie kwasów nukleinowych

Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV) – Wirus zapalenia wątroby typu A jest wirusem RNA należącym do rodziny pikornawirusów. HAV szerzy drogą pokarmową oraz poprzez kał i wywołuje uszkodzenie wątroby po okresie inkubacji trwającym kilka tygodni. RNA wirusa HAV obecny jest w stolcu i surowicy przez większość okresu przed wystąpieniem objawów klinicznych, natomiast zanika wkrótce po pojawieniu się objawów choroby. Immunoglobuliny klasy M (IgM) będące przeciwciałami przeciwko HAV (anty-HAV IgM) są najczęściej obecne w chwili wystąpienia objawów i pozostają wykrywalne przez okres od 3 do 6 miesięcy po zakażeniu (zakres < 30-420 dni, z pozytywną odpowiedzią w 13,5% przypadków w okresie dłuższym niż 4 miesiące) (128). Obecność całkowitych przeciwciał anty-HAV utrzymywać się może długo po infekcji, być może przez całe życie (129); częstość obserwowanych przypadków odpowiedzi serologicznej rośnie wraz z wiekiem, osiągając wartości od 11% u dzieci w wieku < 5 lat do 74% u osób w wieku > 50 lat (130). Szczepienie przeciwko wirusowi HAV indukuje produkcję przeciwciał anty-HAV w ilościach wykrywalnych w okresie 2 do 4 tygodni od podania pierwszej dawki szczepionki (131), zaś wykrywalność tych przeciwciał utrzymuje się przez okres 5 lat u 99% osób, które zakończyły szczepienie (132). Nie istnieją dostępne w handlu testy pozwalające na wykrycie antygenów lub kwasu nukleinowego HAV. Mikroskopia elektronowa z zastosowaniem metod immunologicznych oraz testy immunologiczne wykorzystywane są do wykrywania antygenów wirusa HAV w filtratach ze stolca oraz w innych próbkach do celów badawczych, natomiast testy do wykrywania RNA HAV stosowane są w dokumentowaniu źródeł epidemiologicznych oraz w celach naukowych.

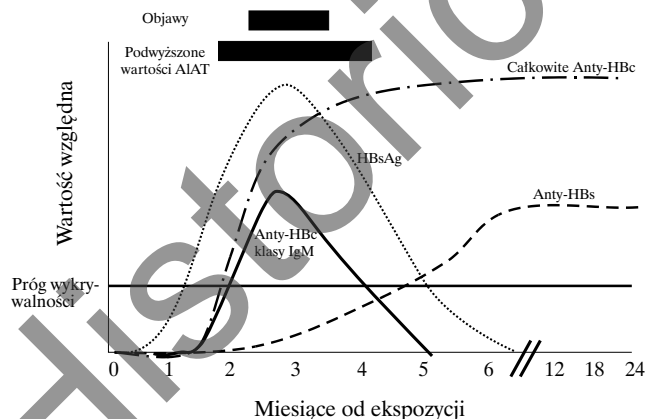
Zalecenia: W diagnozowaniu ostrych zakażeń HAV powinny być wykorzystywane przeciwciała anty-HAV klasy IgM (IB).

W celu określenia statusu immunologicznego dotyczącego zakażenia wirusem HAV oznaczana powinna być całkowita ilość przeciwciał Total HAV (IB).

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) – Wirus zapalenia wątroby typu B jest wirusem DNA należącym do grupy hepadnawirusów. Wirusy te podlegają replikacji poprzez utworzenie pośredniego łańcucha RNA, który następnie jest kopiowany za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy, co powoduje odtworzenie łańcuchów DNA. Wirus HBV przenoszony jest poprzez kontakt z płynami ustrojowymi; najczęściej odbywa się to poprzez podawanie preparatów krwiopochodnych, kontakty sek-

sualne oraz wskutek przeniesienia wirusa z matki na dziecko (zwykle dochodzi do tego po urodzeniu). Chociaż zakażenia wirusem HBV mają najczęściej charakter ostry i kończą się całkowitym wyzdrowieniem u młodzieży i immunokompetentnych dorosłych, występują również infekcje przewlekłe. Dochodzi do nich u około 1-3% zdrowych dorosłych, 5-10% pacjentów z obniżoną odpornością i u 90% noworodków narażonych na kontakt z wirusem HBV.

HBV produkuje kilka antygenów białkowych, które mogą indukować wytwarzanie przeciwciał odpornościowych. Obecny w największej ilości antygen powierzchniowy wirusa (HBsAg) produkowany jest w nadmiarze wraz z cząstkami wirusa, jednak może być również obecny, gdy DNA wirusa jest wbudowany w komórkowy DNA i nie wytwarza zakaźnych wirionów. Antygen rdzeniowy „c” i antygen „e” (HbcAg i HBeAg) wytwarzane są w tym samym obszarze genetycznym wirusa i wykrywane są wśród cząstek zakaźnych. Na Rysunku 6 pokazano typowy serologiczny i kliniczny przebieg ostrego zakażenia wirusem HBV (133).



Rysunek 6 – Wykres zmian stężeń markerów serologicznych w ostrym zakażeniu wirusem zapalenia wątroby typu B oraz w okresie zdrowienia. Po zakażeniu pierwszym wykrywalnym markerem jest antygen powierzchniowy (HBsAg) pojawiający się w osoczu 1 do 3 miesięcy po ekspozycji. Około 1-2 miesięcy później pojawiają się pierwsze przeciwciała IgM przeciwko antygenowi rdzeniowemu wirusa (anty-HBc klasy IgM), co zbiega się ze wzrostem aktywności enzymów AspAT i ALAT w osoczu. W chwili wystąpienia żółtaczki u większości pacjentów wykrywane są zarówno antygeny HBsAg jak i przeciwciała anty-HBc klasy IgM. W czasie, gdy organizm eliminuje wirusa, wykrywalne stają się przeciwciała anty-HBs. U niewielkiego odsetka pacjentów może występować okres przejściowy, w którym nie są wykrywane ani antygen HBsAg, ani przeciwciała anty-HBs; jedynym wykrywalnym wówczas markerem są przeciwciała anty-HBc IgM; stan ten określa terminem „okna rdzeniowego”. Chociaż nie jest to widoczne na rysunku, zwykle u takich pacjentów wykrywane mogą być przeciwciała anty-HBe. Konieczne jest drugie badanie potwierdzające wyniki oznaczeń na obecność przeciwciał anty-HBc. Po wyzdrowieniu przeciwciała anty-HBc i anty-HBs mogą być obecne w osoczu u większości osób do końca życia.

Przeciwciała klasy IgM przeciwko HBcAg (anty-HBc IgM) uważane są za „złoty standard“ w diagnozowaniu ostrego zapalenia wątroby typu B (134). Mogą być one również obecne w zmiennych, niskich mianach u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B, szczególnie, gdy w osoczu pacjenta stwierdza się antygen HBeAg, HBV DNA wirusa, lub gdy obserwowane są epizody podwyższonej aktywności AlAT wskazującej na reaktywację procesu chorobowego (135). Obecność całkowitych przeciwciał anty-HBc stwierdza się zazwyczaj przez całe życie (136). Charakterystyczna dla początku ostrego zakażenia wirusem HBV jest obecność w osoczu antygeny HBsAg oraz brak przeciwciał anty-HBs, jednak sporadycznie oba te markery mogą być nieobecne (134), co czyni przeciwciała anty-HBc klasy IgM jedynym wyznacznikiem infekcji („okno rdzeniowe“). Izolowana obecność przeciwciał anty-HBc może również reprezentować niski poziom wirerii, zanik przeciwciał anty-HBs wiele lat po wyzdrowieniu lub może być spowodowane fałszywie dodatnią reakcją (136, 137, 138). Z możliwością wystąpienia fałszywie dodatniej reakcji powiązane są dwa czynniki: niski poziom reaktywności przeciwciał anty-HBc oraz brak przeciwciał anty-HBs uzyskany w badaniu za pomocą czułych testów immunologicznych. Jak wynika z kilku obserwacji, w żadnym przypadku charakteryzującym się niskim poziomem przeciwciał anty-HBc oraz brakiem przeciwciał anty-HBs nie stwierdzano w wywiadzie odpowiedzi na pojedyncze wstrzyknięcie szczepionki zawierającej HBsAg, podczas gdy odpowiedź taką notowano w 35-40% przypadków z niskim poziomem przeciwciał anty-HBs i w 50-80% przypadków z wysokimi poziomami przeciwciał anty-HBc (137, 139, 140). Proces zdrowienia po zakażeniu charakteryzuje się zanikiem antygeny HBsAg oraz pojawieniem się przeciwciał anty-HBs. Współobecność HBsAg oraz przeciwciał anty-HBs może być obserwowana u niewielkiej liczby pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HBV. Zjawisko to wydaje się występować szczególnie często u pacjentów, u których wykonywane są dializy podtrzymujące (7%) w porównaniu z innymi pacjentami, u których obecny jest antygen HBsAg (2%) (141). Obecność przeciwciał anty-HBs w takich przypadkach wydaje się nie mieć znaczenia klinicznego. W Tabeli 9 przedstawiono profile występowania markerów serologicznych w różnych postaciach oraz fazach zakażenia wirusem HBV (142).

Tabela 9. Diagnostyka serologiczna zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (modyfikacja tabeli pochodzącej z publikacji 142)

Marker	Inkubacja	Ostre zakażenie	Po infekcji	Przewlekłe zakażenie	Szczepienie
HBsAg	+ ^a	+	-	+	-
HBeAg	+	+	-	+/-	-
HBV DNA	+	+	- ^b	+/-	-
Anty-HBc					
IgM	-	-	-	+/- ^c	-
Całkowite	-	-	+	+	-
Anty-HBe	-	-	+/-	+/- ^d	-
Anty-HBs	-	-	+	-	+

^a +, wykrywalne; -, niewykrywalne; +/- może być wykrywalne.
^b metody inne niż PCR
^c może być dodatnie u 10-15% pacjentów z reaktywacją zakażenia
^d U pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV zwykle wykrywane są antygeny HBsAg lub przeciwciała anty-HBe.

W Tabeli 10 przedstawiono przykłady niezgodności lub nietypowych profili serologicznych w zapaleniu wątroby.

Tabela 10. Niezgodności lub nietypowe profile serologiczne w zapaleniu wątroby typu B wymagające dalszej diagnostyki.

- HBsAg dodatnie/anty-HBc ujemne
- HBsAg, anty-HBs i anty-HBc dodatnie
- Wyłącznie anty-HBc dodatnie
- Wyłącznie anty-HBs dodatnie u nieimmunizowanych pacjentów
- HBsAg ujemne/HBeAg dodatnie
- Dodatnie w przypadku HBeAg i anty-HBe
- Całkowite anty-HBc ujemne/anty-HBc IgM dodatnie

Testy dające niespójne wyniki powinny być powtórzone; ponadto wskazane może być również oznaczenie innych markerów serologicznych w celu ustalenia prawidłowego rozpoznania (143).

Zalecenia: W celu stwierdzenia aktualnego lub przeszłego zakażenia wirusem HBV wykonane powinny być oznaczenia antygeny HBsAg oraz przeciwciał anty-HBs i anty-HBc. W przypadku podejrzenia ostrego zakażenia wykorzystane powinny być testy badające obecność przeciwciał anty-HBc klasy IgM (IB).

Nie ma konieczności oznaczania antygeny HBeAg i przeciwciał anty-HBe w celu stwierdzenia ostrego zapalenia wątroby typu B oraz w rutynowych badaniach zakażenia HBV (IIIB, E).

W przypadku pacjentów, u których stwierdzono niespójne wyniki badań, testy należy powtórzyć; utrzymujące się niezgodności powinny być ocenione przez hepatologa lub gastroenterologa (IIIB).

W przypadku pacjentów, u których stwierdza się przewlekłą obecność antygeny HBsAg, HBeAg oraz przeciwciał anti-HBe użyteczne może być wykorzystanie testów pozwalających na określenie statusu zakażenia. DNA wirusa HBV może być obecne w hepatocycie w dwóch postaciach: replikującego wirusa, co prowadzi do produkcji cząstek zakaźnych, lub fragmentu wbudowanego w DNA gospodarza, który jest formą niereplikującą. Antygen HBeAg produkowany jest wyłącznie jako część replikującego wirusa, w związku z czym może być wykorzystywany do pośredniej oceny stanu produkcji DNA wirusa w hepatocycie. U pacjentów, u których stwierdza się obecność HBeAg, zanik tego antygeny oraz serokonwersja prowadząca do pojawienia się przeciwciał anti-HBe są najczęściej powiązane ze stwierdzeniem spadku ilości krążącego DNA wirusa HBV metodami innymi niż łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), normalizacją aktywności aminotransferaz oraz poprawą obrazu w badaniu histologicznym, co świadczy o niskiej replikacji wirusa oraz o poprawie klinicznej (144). Pomiar zawartości DNA wirusa są bardziej użyteczne u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B otrzymujących leczenie przeciwwirusowe. Spadek ilości wykrywalnego DNA wirusa HBV w testach hybrydyzacji w ciekłej fazie jest wcześniejszym wskaźnikiem odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe niż spadek ilości HBeAg (143). W handlu dostępnych jest kilka testów służących do wykrywania DNA wirusa HBV w surowicy; w Tabeli 11 przedstawiono progi czułości. Aktualnie brak jest międzylaboratoryjnej standaryzacji testów mierzących DNA HBV.

Tabela 11. Dolne progi wykrywalności dla testów wykrywających DNA wirusa HBV	
Metoda	Próg wykrywalności (liczba kopii/ml) ^a
Hybrid capture	3,0 x 10 ⁶
Branch DNA	0,7 x 10 ⁶
Liquid Hybridization	4,0 x 10 ⁴
Łańcuchowa reakcja polimerazy PCR	10 ² - 10 ³
^a Wyniki mogą być również wyrażone w pg/ml DNA wirusa HBV poprzez podzielenie wartości przez 2,85 * 10 ⁵	

Krążący we krwi DNA wirusa może być wykrywany czułymi metodami PCR u wysokiego odsetka pacjentów, u których nie wykrywa się HBsAg, natomiast wykrywalne są przeciwciała anti-HBs, anti-HBe i anti-HBc, miesiące lub lata po wyzdrowieniu z ostrego (145) lub przewlekłego (146) zapalenia wątroby. Znaczenie tego faktu nie jest jasne, ponieważ większość wirusowego DNA wykrywana jest w kompleksach immunologicznych (145) i może nie reprezentować całego genomu. Ostatnie badania wykonane u 7 potencjalnych dawców wątroby, którzy byli HBsAg ujemni oraz anti-HBs i anti-HBc dodatni, wykazało obecność replikującej postaci wirusa wewnątrz hepatocytów u 6 z 7 osób (147). Podobnie u pacjentów z przewlekłym

zakażeniem wątroby typu C zwykle wykrywany jest DNA wirusa HBV (z zastosowaniem czułych metod PCR) zarówno w wątrobie jak i surowicy, szczególnie u osób, u których przeciwciała anti-HBc są jedynym markerem zakażenia HBV (137, 138). Badania te sugerują, iż wielu pacjentów, których uznano wcześniej za wyleczonych z zakażenia wirusem HBV, w dalszym ciągu reprezentuje niskie, choć kontrolowane, poziomy replikacji obecne wiele lat po klinicznym powrocie do zdrowia. Nie jest jasne, jaki poziom wirerii DNA wirusa HBV powinien być uznany w celach klinicznych za dowód „wyzdrowienia“ z zakażenia.

Zalecenia: HBeAg i anti-HBe są użytecznymi parametrami pozwalającymi na monitorowanie pacjentów, u których stwierdza się przewlekłą obecność antygeny HBsAg (IB).

Oznaczenia ilościowe DNA wirusa HBV powinny być wykorzystywane do monitorowania odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe (IIB).

Powinien być ustanowiony międzynarodowy standard dla testów wykrywających HBV DNA, zaś producenci powinni zgodnie z nim ponownie dokonać kalibracji zestawów testowych (IIIB).

Testy do badania HBV DNA powinny mieć charakter ilościowy; zdefiniowane powinny być również klinicznie użyteczne liniowości dla tych testów (IIIB).

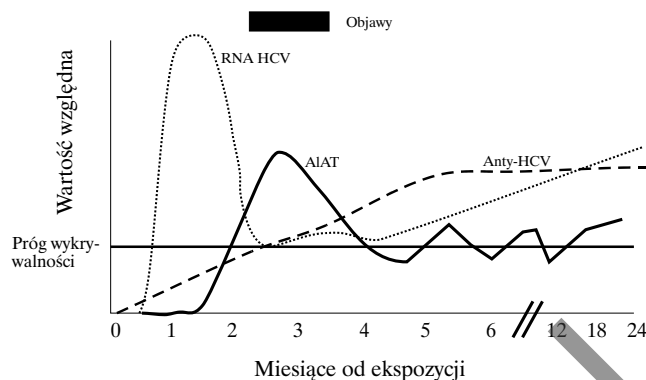
Zapalenie wątroby typu C (HCV) – Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest wirusem RNA należącym do rodziny flawowirusów. Jak dotąd nie powiodły się próby wyhodowania tego wirusa; rozpoznawany jest on poprzez wykrycie sekwencji wirusowych metodami rekombinacyjnymi. Obecnie określono sekwencję całego genomu wirusa. Aktualnie nie są dostępne w handlu żadne testy pozwalające na wykrywanie antygenów HCV, chociaż opracowano bardzo czuły test wykrywający białko rdzeniowe tego wirusa (148).

Większość testów wykrywających zakażenie HCV mierzy obecność przeciwciał przeciwko wirusowi. Testy przesiewowe pozwalają wykrywać przeciwciała skierowane przeciwko białkom wirusa HCV, które zwykle pojawiają się średnio 80 dni (zakres od 33 do 129 dni) po zakażeniu; wykorzystywana jest druga generacja testów immunoenzymatycznych anti-HCV (EIA-2) (149). Pacjenci z obniżoną odpornością oraz poddawani dializom mogą w rzadkich przypadkach wykazywać brak przeciwciał wykrywanych przez EIA-2, pomimo innych dowodów na aktywne zakażenie wirusem (150). Trzecia generacja testów EIA (EIA-3) wykrywających przeciwciała anti-HCV została zaakceptowana przez FDA do badań przesiewowych produktów

krwiopochodnych. Zawierają one rekonfigurowane antygeny rdzeniowe i NS3 oraz dodatkowy antygen (NS5), który nie występuje w testach EIA-2. EIA-3 charakteryzują się nieznacznym wzrostem czułości, ale jednocześnie mniejszą swoistością niż EIA-2, przy skróceniu okresu wykrywalności przeciwciał do średnio 7-8 tygodni po zakażeniu (151). W przypadku pacjentów, u których doszło do eliminacji wirusa HCV z krążenia, miano przeciwciał anti-HCV stopniowo obniża się (152) i ostatecznie zanika u 6-10% zakażonych osób (153, 154). W ocenie możliwości okołoporodowego przeniesienia wirusa HCV stwierdzano zanik przeciwciał matczynych po 12 miesiącach u 90% nie zakażonych niemowląt, zaś u 100% po 18 miesiącach (155). U około 90% zakażonych niemowląt wykrywano RNA HCV w osoczu w trzecim miesiącu życia (156).

Uzupełniające testy wykrywające przeciwciała anti-HCV mogą być pomocne w rozstrzygnięciu wątpliwości dotyczących fałszywie dodatnich wyników testów EIA. Rekombinowane testy immunoblot (RIBA) zawierają te same antygeny HCV co testy EIA, a także dysmutazę nadtlenkową (SOD) do wykrywania nieswoistych przeciwciał przeciwko białkom drożdży (rekombinowane antygeny HCV są zwykle uzyskiwane z zastosowaniem drożdży jako wektorów). Dodatni wynik testu RIBA definiowany jest jako reaktywność na dwa lub więcej antygeny HCV pochodzące z różnych rejonów genomu, przy braku reaktywności na SOD. Reaktywność na pojedynczy antygen wirusa HCV lub reaktywność w szerokim zakresie antygenów wraz z reakcją na SOD uznawane są za wyniki nieokreślone. W populacjach z wysokim ryzykiem zakażenia HCV, jest mniej niż 1% wyników fałszywie dodatnich w testach EIA-2. Ponadto u osób świeżo zakażonych testy RIBA dają wynik dodatni tylko w 85% przypadków (157). Tak więc w populacjach o wysokim ryzyku zakażenia nie ma konieczności wykonywania tych testów w celu zdiagnozowania zapalenia wątroby typu C (158).

Aktywne zakażenie wirusem HCV definiowane jest obecnością RNA wirusa w osoczu. RNA HCV może być wykryty w ciągu 1-2 tygodni po ostrym zakażeniu, czyli kilka tygodni przed pojawieniem się nieprawidłowych wartości AlAT oraz przed pojawieniem się przeciwciał anti-HCV (152). Na Rysunku 7 przedstawiono profil czasowy markerów w typowym zakażeniu HCV.



Rysunek 7 – Wykres zmian stężeń markerów serologicznych w czasie w ostrym zakażeniu wirusem zapalenia wątroby typu C. Po zakażeniu, pierwszym wykrywalnym markerem jest RNA wirusa HCV pojawiający się w osoczu 1-2 tygodnie po ekspozycji. Stężenie RNA stopniowo rośnie, jednak wraz z rozwojem odpowiedzi immunologicznej zaczyna opadać; w około 15% przypadków przejściowo wynik badania RNA może być ujemny. Przeciwciała anty-HCV pojawiają się średnio 8-10 tygodni po ekspozycji; czas ten w przypadku testów trzeciej generacji jest krótszy niż w testach drugiej generacji. Po okresie ostrej infekcji, który u większości osób jest niemy klinicznie, w 75-85% przypadków dochodzi do rozwoju przewlekłego zakażenia HCV. W okresie przejściowym między ostrą i przewlekłą fazą zakażenia, okresowo stwierdzana może być obecność RNA HCV oraz podwyższone wartości ALAT; najczęściej parametry te mogą być dodatnie wiele lat po zakażeniu, chociaż w 15-25% przypadków przewlekłego zakażenia wartości ALAT mogą utrzymywać się w granicach wartości prawidłowych.

Pomimo braku akceptacji ze strony FDA, testy wykorzystujące metodę PCR z odwrotną transkrypcją (RT) do wykrywania RNA wirusa HCV są powszechnie stosowane w praktyce klinicznej; najczulszy z nich wykrywa >100 kopii RNA/ml. Testy wykrywające RNA wirusa nie mają standaryzacji, zaś wyniki testów ilościowych mogą wykazywać znaczne różnice między poszczególnymi laboratoriami korzystającymi z różnych testów (158, 159). RNA wirusa HCV jest bardzo podatny na degradację wskutek wysokiej aktywności RNA-zy obecnej we krwi; tak więc próbki przeznaczone do oznaczenia RNA wirusa powinny być odwirowywane zaraz po wytworzeniu się skrzepu. Do testów badających RNA HCV preferowane jest użycie próbek osocza zawierających EDTA lub cytrynian sodu. Heparynizowane osocze wykazuje działanie hamujące na wiele testów wykorzystujących amplifikację kwasów nukleinowych, natomiast próbki są niestabilne, o ile nie zostaną zamrożone wkrótce po pobraniu. Jeśli wirowanie przeprowadzane jest natychmiast, traczone jest mniej niż 10% RNA HCV nawet wówczas, gdy osocze lub surowica nie są oddzielane od elementów morfotycznych przez okres do 6 godzin (160). W przypadku stosowania próbek z separatorem, próbki pozostają stabilne przez okres do 24 godzin po

wirowaniu (160). Dopuszczalne jest krótkotrwałe (< 7 dni) przechowywanie surowicy lub osocza w temperaturze 4°C. Po zamrożeniu próbki pozostają stabilne przez okres trzech cykli zamrażania-rozmrażania (160). Testy do ilościowego oznaczania RNA wirusa HCV są często mniej czułe niż testy jakościowe wykorzystujące te same technologie, jednak nie jest to regułą. Aktualna wersja testu wykorzystującego technologię branched DNA jest mniej czuła (z dolnym progiem wykrywalności 200 000 kopii/ml); mimo to testy tego typu charakteryzują się lepszą liniowością i powtarzalnością niż testy PCR. Ostatnio do sprzedaży w Stanach Zjednoczonych został wprowadzony bardziej czuły test. W przypadku pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HCV, którzy nie byli leczeni, jest mało prawdopodobne uzyskanie próbek, w których RNA wirusa jest niewykrywalne w teście branched DNA, zaś wykrywalne metodą PCR. Wyniki poszczególnych metod pomiarowych nie mogą być bezpośrednio porównywalne z powodu wykorzystywania różnych standardów. Obecnie dostępny jest międzynarodowy standard Światowej Organizacji Zdrowia dla testów do oznaczania RNA wirusa HCV metodą amplifikacji kwasów nukleinowych (161) i jest on wprowadzany przez producentów zestawów.

Zalecenia: Testy przesiewowe EIA do wykrywania przeciwciał przeciwko wirusowi HCV są odpowiednie do diagnozowania przeszłych lub aktualnych zakażeń w populacjach o dużej zachorowalności; nie ma konieczności stosowania dodatkowych testów u tego rodzaju pacjentów. Jeśli konieczne jest potwierdzenie aktywnego zakażenia, wykorzystany powinien być test do oznaczania RNA wirusa HCV (IIB, E).

Testy uzupełniające do oznaczania przeciwciał anti-HCV (RIBA) powinny być wykorzystywane w przypadku badań populacji o niskiej zachorowalności, lub też w celu potwierdzenia wcześniejszego zakażenia HCV u pacjentów, u których wynik badania RNA wirusa jest ujemny (IIB, E).

W przypadku testów do oznaczania RNA wirusa HCV konieczne jest uzyskanie lepszej zgodności między poszczególnymi metodami oraz lepszej precyzji; metody powinny wykorzystywać standard opracowany przez Światową Organizację Zdrowia (IIB).

Próbki przeznaczone do oznaczania RNA wirusa HCV powinny stanowić osocze pobrane na EDTA lub cytrynian, krew powinna być odwirowywana natychmiast po pobraniu w celu uniknięcia fałszywie niskich wyników (IIB).

Wirus zapalenia wątroby typu D – HDV jest ułomnym wirusem RNA, który replikuje wyłącznie w obecności antygenu HBsAg. Poszukiwanie dowodów zakażenia tym wirusem powinno być rozważane u pacjentów HBsAg-dodatnich z objawami ostrego lub przewlekłego zapalenia wątroby, w szczególności w przypadkach przebiegu piorunującego lub wówczas, gdy ryzyko zakażenia HDV jest wysokie. Jedynym szeroko dostępnym w handlu testem serologicznym służącym do wykrywania wirusa HDV jest test służący do oznaczania całkowitych przeciwciał anti-HDV. U pacjentów, u których doszło do eliminacji wirusa, przeciwciała zanikają w okresie od 1 do 5 lat (169). W większości sytuacji klinicznych do zdiagnozowania zakażenia HDV wystarczające jest oznaczenie antygenu HBsAg oraz przeciwciał anti-HBc klasy IgM i całkowitych przeciwciał anti-HDV. Pacjenci z ostrym współzakażeniem wirusem HDV posiadają zwykle przeciwciała anti-HBc klasy IgM, natomiast u osób z nadkażeniem tym patogenem przeciwciała te najczęściej nie występują.

Wirus zapalenia wątroby typu E – HEV jest wirusem RNA szerzącym się drogą jelitową, który jest przyczyną sporadycznych lub mających charakter epidemiczny ostrych zapaleń wątroby w krajach rozwijających się; nie wywołuje on przewlekłego zapalenia wątroby. W Stanach Zjednoczonych wirus ten rzadko bywa przyczyną zapalenia wątroby; najczęściej chorują osoby podróżujące do obszarów endemicznych, chociaż przynajmniej w jednym przypadku nie stwierdzono związku z podróżą (170). W celach diagnostycznych opracowano testy immunologiczne pozwalające na wykrywanie przeciwciał anti-HEV (171). Ocena wielu metod oznaczania tych przeciwciał wykazała znaczące różnice stwierdzanych mian oraz brak zgodności między metodami, chociaż testy wykrywające przeciwciała przeciwko ORF2 charakteryzowały się największą dokładnością (172). Przeciwciała reagujące z antygenami wirusa HEV stwierdzano u 15-25% homoseksualistów płci męskiej, narkomanów przyjmujących narkotyki drogą dożylną lecz również u dawców krwi w Baltimore, co sugeruje brak swoistości testów (173).

Rozdział III

Ostre uszkodzenie wątroby

Uszkodzenie wątroby definiowane jest jako zniszczenie hepatocytów. Zgodnie z tradycyjnym podziałem rozpoznawane są dwa rodzaje uszkodzenia wątroby: ostre i przewlekłe. Określane są one często terminem „zapalenia wątroby“, który wskazuje na obecność procesu zapalnego w obrębie wątroby. W pewnych przypadkach uszkodzenia wątroby jednakże zapalenie obecne jest w stopniu minimalnym lub nie występuje w ogóle; w związku z tym w niniejszej publikacji używany będzie termin uszkodzenie wątroby. Ostre uszkodzenie wątroby odnosi się do zniszczenia komórek wątrobowych, do którego dochodzi nagle i w krótkim czasie. Najbardziej charakterystyczną cechą ostrego uszkodzenia wątroby jest znaczące podwyższenie aminotransferaz we krwi (zwykle więcej niż osiem razy powyżej górnej granicy normy), czemu często towarzyszy podwyższenie stężenia bilirubiny. W niektórych przypadkach dochodzi do zaburzeń syntezy białek, szczególnie wówczas, gdy bezpośrednie uszkodzenie hepatocytów spowodowane było niedokrwieniem lub zatruciem drogą jelitową. Termin przewlekłe uszkodzenie wątroby odnosi się do ciągłego procesu niszczenia hepatocytów trwającego przez dłuższy czas, definiowanego zwykle jako okres przekraczający 6 miesięcy. Przewlekłe uszkodzenie wątroby rozpoznawane jest zwykle po nieznacznie podwyższonych wartościach aminotransferaz (zwykle mniej niż 4-krotnie powyżej górnego progu normy), chociaż ich aktywność może okresowo ulegać podwyższeniu, a także, w niewielkim odsetku przypadków, może pozostawać stale w granicach wartości referencyjnych. Wydalanie bilirubiny oraz synteza białek na ogół pozostają w normie. Aktywność fosfatazy zasadowej jest zwykle prawidłowa w większości przypadków ostrego i przewlekłego uszkodzenia wątroby; jej oznaczenia służą głównie rozpoznawaniu zaburzeń funkcji wątroby w przypadkach niedrożności dróg żółciowych, które mogą przypominać ostre lub przewlekłe uszkodzenie tego narządu. Badanie poziomu białka całkowitego, które często stanowi część panelu badań wątrobowych, na ogół nie jest użyteczne w ocenie funkcji wątroby, ponieważ na jego wynik wpływają zmiany poziomu przeciwciał oraz zmiany dotyczące syntezy białek przez wątrobę. Stwierdzenie wzrostu stężenia globulin w przypadku pacjentów z ostrym lub przewlekłym uszkodzeniem wątroby może wskazywać na proces autoimmunologiczny jako przyczynę uszkodzenia narządu.

Zalecenia: U pacjentów z rozpoznaniem lub podejrzeniem uszkodzenia wątroby, w celach diagnostycznych powinny być wykonywane następujące badania: aktywność aminotransferazy asparaginianowej, aminotransferazy alaninowej, fosfatazy zasadowej, stężenie bilirubiny całkowitej, bilirubiny bezpośredniej, białka całkowitego oraz albumin. Przewidywany zestaw badań jest obecnie zaakceptowany przez Zarząd Finansowy Ochrony Zdrowia ds. zwrotów kosztów leczenia (IIB, E).

Ostre uszkodzenie wątroby

Ostre uszkodzenie wątroby może być rozpoznane przez stwierdzenie obecności żółtaczki lub nieswoistych objawów ostrego schorzenia, którym towarzyszy podwyższenie aktywności AspAT i/lub AlAT. W przybliżeniu 80% osób z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby nie jest nigdy diagnozowanych klinicznie, chociaż w niektórych przypadkach chorobę wykryć można przez stwierdzenie podwyższenia aktywności aminotransferaz przy jednoczesnej obecności nieswoistych objawów klinicznych lub ich braku. Aktywność AspAT i AlAT rzadko jest podwyższona więcej niż 10-krotnie powyżej górnej granicy normy w chorobach innych niż ostre uszkodzenie wątroby. Aktywność fosfatazy zasadowej podwyższona jest ponad 3-krotnie powyżej górnej granicy przedziału referencyjnego w mniej niż 10% przypadków ostrego uszkodzenia wątroby (174, 175). W okresie ostatniej dekady zanotowano znaczący spadek liczby przypadków ostrego wirusowego zapalenia wątroby; w Ośrodkach Zwalczenia Chorób (Centres for Disease Control - CDC) stwierdzono spadek liczby zapaleń wątroby typu B o 55% oraz zapaleń nie-A, nie-B (z których większość stanowi zapalenie wątroby typu C) o 80% (175a). Inne choroby wątroby są obecnie częściej zaliczane do przyczyn podwyższenia aktywności AspAT i AlAT. W przeprowadzanych ostatnio badaniach stwierdzono, iż u 25% pacjentów, u których aktywność AspAT przekraczała ponad 10-krotnie górną granicę normy, przyczyną tego stanu była niedrożność dróg żółciowych (176). Ogółem, u około 1-2% pacjentów z niedrożnością przewodów żółciowych stwierdza się przejściowe podwyższenie aktywności AspAT i/lub AlAT powyżej 2000 U/l (177, 178); aktywność tych enzymów zwykle obniża się do normy po 10 dniach, nawet jeśli niedrożność istnieje w dalszym ciągu (174, 176, 177).

Najlepszym parametrem pozwalającym na rozpoznanie ostrego uszkodzenia wątroby jest stwierdzenie wartości 200 U/l dla AspAT (czułość 91%, swoistość 95%) i 300 U/l dla AlAT (czułość 96%, swoistość 94%) (175). Aktywność AspAT jest ponad 10-krotnie wyższa od górnej wartości przedziału referencyjnego u ponad połowy pacjentów w okresie wystąpienia objawów (175). W niepowikłanym poalkoholowym zapaleniu wątroby, wartości AspAT i AlAT prawie nigdy nie osiągają

wartości 10 razy wyższej od górnej granicy normy, stosunek wartości AspAT/AlAT jest wyższy od 2 u 80% pacjentów, zaś podwyższenie aktywności fosfatazy zasadowej obserwowane jest w 20% przypadków (98, 179, 180). Żółtaczka stwierdzana jest w 60-70% przypadków poalkoholowego zapalenia wątroby (179, 180). Częstość występowania żółtaczki u pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby wykazuje zmienność w zależności od wieku i czynnika etiologicznego. Żółtaczka obserwowana jest rzadko u dzieci z wirusowym zapaleniem wątroby, a jeśli jest obecna, występuje w znacznie łagodniejszej postaci niż u dorosłych. W jednym z badań wzrost stężenia bilirubiny powyżej 171 $\mu\text{mol/l}$ (10 mg/dl) stwierdzono tylko u 1% dzieci z ostrym zapaleniem wątroby, podczas gdy u dorosłych odsetek ten wynosił 27% (181). W przypadku dorosłych żółtaczka rozwija się w 70% przypadków ostrego zapalenia wątroby typu A (182), w 33-50% przypadków ostrego zapalenia wątroby typu B (183, 184) i w 20-33% przypadków ostrego zapalenia wątroby typu C (185, 186). Istnieje bezpośrednia korelacja między wiekiem i maksymalnym stężeniem bilirubiny w surowicy u dzieci; wraz ze zwiększeniem wieku o 10 lat obserwowano średni wzrost stężenia bilirubiny o 85 $\mu\text{mol/l}$ (5 mg/dl). W przypadku dorosłych nie stwierdza się związku między wiekiem i maksymalnym stężeniem bilirubiny (187). Ilość bilirubiny bezpośredniej wyrażana jako odsetek bilirubiny całkowitej jest podobna w ostrym uszkodzeniu wątroby i w żółtaczce mechanicznej: tylko w 16% przypadkach ostrego uszkodzenia wątroby zawartość bilirubiny bezpośredniej wynosi <50% bilirubiny całkowitej. Niższe procentowe zawartości bilirubiny bezpośredniej sugerują inną przyczynę żółtaczki - np. hemolizę (187).

Zalecenia: Ostre uszkodzenie wątroby może być rozpoznane przez stwierdzenie podwyższenia aktywności AlAT do wartości 10-krotnie wyższej od górnego progu wartości referencyjnych oraz podwyższenie aktywności fosfatazy zasadowej mniej niż 3x powyżej górnej granicy normy (IIB).

Pomiar stężenia bilirubiny bezpośredniej jest konieczny do wykluczenia innych przyczyn podwyższenia stężenia bilirubiny całkowitej, jak np. hemoliza, jednak badanie to nie pozwala na zróżnicowanie uszkodzenia komórki wątrobowej od żółtaczki mechanicznej (IIB).

Wskaźniki (markery) nasilenia choroby

Ostre zapalenie wątroby typu A lub B jest zwykle samoograniczającym się procesem chorobowym, a większość pacjentów powraca całkowicie do zdrowia. U osób z ostrym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C w około 80-85% przypadków rozwija się przewlekłe zapalenie wątroby, chociaż odsetek ten wydaje się być niższy w przypadku dzieci oraz młodych kobiet otrzymujących przeciwciała anti-Rh (154, 188, 189). W rzadkich przypadkach ostre uszkodzenie wątroby prowadzi do ciężkiego uszkodzenia narządu oraz ostrej jego niewydolności. Badania powinny pozwalać na identyfikację osób z wysokim ryzykiem wystąpienia niewydolności wątroby. Aktywność aminotransferaz jest powiązana bardziej z samym uszkodzeniem wątroby niż z jego ciężkością. Istnieje słaba korelacja między aktywnością aminotransferaz oraz stężeniem bilirubiny w wirusowym zapaleniu wątroby (175), natomiast w uszkodzeniu niedokrwinnym lub toksycznym nie stwierdza się takiej zależności (190). Aktywność aminotransferaz nie wykazuje związku z rokowaniem i może ulegać obniżeniu wraz z pogorszeniem stanu pacjenta; we wszystkich przypadkach uszkodzenia wątroby aktywność tych enzymów zaczyna się zmniejszać zanim stężenie bilirubiny osiągnie wartość maksymalną, niezależnie od tego, czy doszło do poprawy, czy też pogorszenia stanu ogólnego (175, 191). Czas protrombinowy (PT) jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym; czasy >4 sekund powyżej wartości kontrolnej, > 20 sekund lub wartość INR $> 6,5$ wykorzystywane są do identyfikacji pacjentów, u których ryzyko śmierci jest wysokie (99, 191). W niedokrwinnym lub toksycznym uszkodzeniu wątroby wydłużenie czasu protrombinowego występuje zwykle wkrótce po uszkodzeniu, zaś najwyższa wartość stwierdzana jest w ciągu 24-36 godzin, po czym parametr ten szybko powraca do wartości prawidłowych. W przypadku uszkodzenia spowodowanego acetaminofenem, samo wydłużenie czasu protrombinowego nie wskazuje na prawdopodobieństwo wystąpienia niewydolności wątroby (94, 96), natomiast utrzymujące się podwyższenie tej wartości lub jej narastanie w 4 dni po spożyciu acetaminofenu świadczy o takiej możliwości (192). Inne badania mogą być użyteczne prognostycznie w przypadku niektórych swoistych przyczyn uszkodzenia wątroby (191). W wirusowym zapaleniu wątroby stężenie bilirubiny całkowitej $>257 \mu\text{moli/l}$ (15 mg/dl) wskazuje na ciężkie uszkodzenie wątroby i konieczność monitorowania pacjenta w związku z możliwością wystąpienia encefalopatii (193). W poalkoholowym zapaleniu wątroby wartości stężenia bilirubiny $>428 \mu\text{moli/l}$ (>25 mg/dl) lub albumin <25 g/l (2,5 g/dl) prognozują wysokie prawdopodobieństwo zgonu (91, 180).

Zalecenia: Stwierdzenie stężenia bilirubiny całkowitej $>257 \mu\text{moli/l}$ (15 mg/dl) lub wartości PT > 4 sekundy powyżej górnej granicy normy u osób z wirusowym zapaleniem wątroby, przy braku innych czynników mogących mieć wpływ na wyniki, wskazuje na ciężkie uszkodzenie wątroby (IIB).

W przypadku zatrucia acetaminofenem, utrzymujące się wydłużenie czasu protrombinowego lub narastanie tej wartości w 4 dni po spożyciu substancji wskazuje na ciężkie uszkodzenie wątroby (IIB).

Rozpoznanie różnicowe

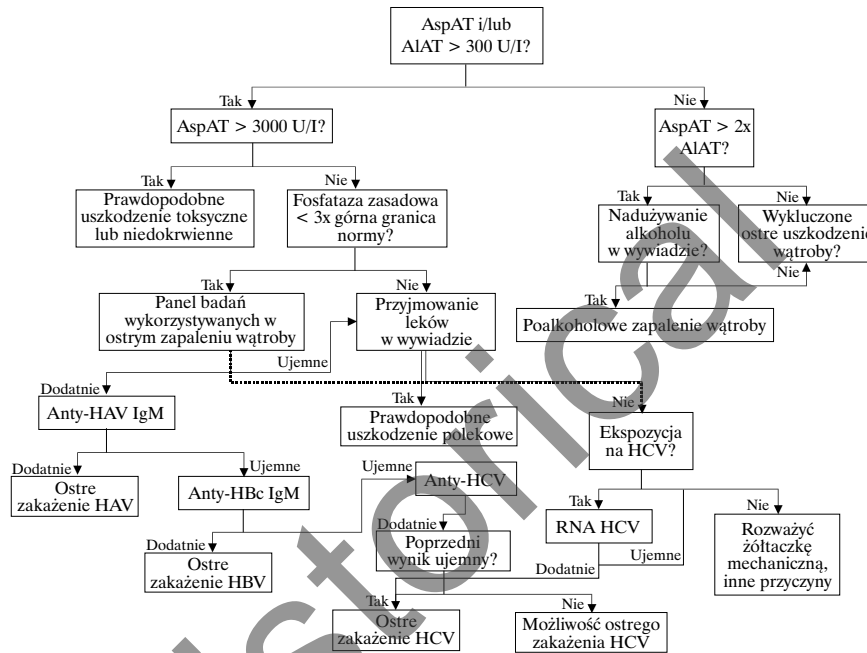
Zmiany w badaniach laboratoryjnych są zróżnicowane w zależności od przyczyn ostrego uszkodzenia wątroby (Tabela 12).

Schorzenie	Maks. wartość AlAT (x GGN)	Stosunek AspAT/AlAT	Maks. stężenie bilirubiny (mg/dl)	Wydłużenie czasu protrombinowego (sek.)
Wirusowe zapalenie wątroby	10-40	< 1	< 15	< 3
Poalkoholowe zapalenie wątroby	2-8	> 2	< 15	1-3
Uszkodzenie toksyczne	> 40	> 1 we wczesnym okresie	< 5	> 5 (prześciowo)
Uszkodzenie niedokrwienne	> 40	> 1 we wczesnym okresie	< 5	> 5 (prześciowo)

x - wielokrotność; GGN - górna granica normy

Na podstawie obserwacji objawów towarzyszących uszkodzeniu wątroby często możliwe jest określenie prawdopodobnego rodzaju czynnika, który to uszkodzenie spowodował. Wstępne badanie pacjentów z najczęstszą (immunologiczną) postacią ostrego uszkodzenia wątroby powinno obejmować zebranie wywiadu dotyczącego przyjmowanych leków oraz wykonanie badań na obecność przeciwciał przeciwko wirusom zapalenia wątroby typu A, B i C (HAV, HBV i HCV). Większość reakcji ze strony wątroby na przyjmowanie leków występuje 3 - 4 miesiące po rozpoczęciu leczenia. W niektórych jednakże sytuacjach uszkodzenie wątroby obserwowane może być nawet 12 miesięcy po rozpoczęciu przyjmowania leku, zaś w nielicznych przypadkach wystąpić może w kilka dni lub kilka tygodni po zakończeniu przyjmowania danej substancji (198). Dlatego też istotne jest zebranie informacji na temat wszystkich leków, które przyjął lub przyjmował pacjent w okresie ostatniego roku.

W badaniu w kierunku wirusowego zapalenia wątroby należy korzystać z zaakceptowanego przez Zarząd Finansowy Ochrony Zdrowia panelu badań wykonywanych w ostrym zapaleniu wątroby (przeciwciała anti-HAV klasy IgM, anti-HBc klasy IgM, antygen HBsAg i przeciwciała anti-HCV) (Rysunek 8).



Rysunek 8 – Schemat postępowania w ostrym uszkodzeniu wątroby - W przypadku pacjentów z objawami lub objawami ostrego uszkodzenia wątroby (gorączka, utrata apetytu, ciemniejsza barwa moczu, luźne stolce, żółtaczka) wstępne badanie obejmuje pomiar aktywności AspAT i ALAT. Nieznaczne podwyższenie aktywności AspAT (< 10x górna granica normy), szczególnie wówczas, gdy AspAT > ALAT sugeruje ostre poalkoholowe zapalenie wątroby, podczas gdy znaczne podwyższenie tej wartości (> 100x górna granica normy) zdecydowanie wskazuje na niedokrwienne lub toksyczne uszkodzenie wątroby. U osób, u których stwierdzono wartości pośrednie, powinny być wykonane badania wchodzące w skład panelu ostrego zapalenia wątroby (patrz tekst). Stwierdzenie obecności przeciwciał anti-HAV klasy IgM lub anti-HBc klasy IgM uważane jest za czynnik pozwalający na zdiagnozowanie ostrego zapalenia wątroby typu A lub typu B. Ostre zapalenie wątroby typu C nie może być definitywnie stwierdzone na podstawie badań serologicznych, jednak można podejrzewać jego obecność w przypadku obecności przeciwciał anti-HCV u pacjentów z żółtaczką (jeśli poprzednie badanie dało wynik ujemny), lub w przypadku dodatniego wyniku badania na obecność RNA wirusa HCV u osób, u których nie wykryto przeciwciał anti-HCV. W sytuacji, gdy u pacjentów stwierdza się ujemne wyniki badań na obecność markerów zakażenia wirusowego, rozważyć należy inne przyczyny ostrego uszkodzenia wątroby, jak niedrożność dróg żółciowych, obecność innych czynników zakaźnych, choroba Wilsona lub autoimmunologiczne zapalenie wątroby (patrz Tabela 13).

Przeciwciała anti-HAV klasy IgM, których oznaczenie jest testem diagnostycznym z wyboru w ostrych zakażeniach wirusem HAV, zanikają po 4-6 miesiącach (194), podczas gdy całkowite przeciwciała przeciwko HAV obecne są we krwi przez całe życie (129) i wykrywane są u dużego odsetka populacji (130). W związku z krótkim okresem transmisji, diagnostyka w kierunku ostrego zakażenia wirusem HAV powinna być przeprowadzona tak szybko, jak jest to tylko możliwe po wystąpieniu objawów, najlepiej w ciągu 48 godzin, w celu umożliwienia wdrożenia leczenia narażonych na zachorowanie osób z zastosowaniem przeciwciał odpornościowych. Oznaczenie przeciwciał anti-HBc klasy IgM oraz antygenu HBsAg jest najbardziej niezawodnym testem w ostrym zakażeniu wirusem HBV (134, 193); przeciwciała anti-HBc klasy IgG (całkowite) obecne są we krwi latami i nie są przydatne w rozpoznawaniu ostrego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (136). Inne markery wirusowe oraz przeciwciała nie są wykorzystywane w diagnozowaniu tej choroby. Aktualnie nie są dostępne żadne testy, które pozwoliłyby na definitywne rozpoznanie ostrego zapalenia wątroby typu C, ponieważ przeciwciała anti-HCV oraz RNA wirusa HCV mogą być obecne zarówno w ostrej jak i przewlekłej postaci choroby. Przeciwciała anti-HCV wykrywane są za pomocą testów EIA-2 tylko w 57% przypadków ostrego zakażenia HCV w chwili początkowego podwyższenia enzymów, podczas gdy RNA wirusa obecne jest praktycznie u wszystkich chorych (195), choć u 15% jego obecność ma charakter okresowy (157, 196). W chwili wystąpienia objawów klinicznych, u 80-90% pacjentów wykrywane są przeciwciała anti-HCV (196). Wyniki, które mogą stanowić wsparcie dla rozpoznania ostrego zapalenia wątroby typu C, to brak przeciwciał anti-HCV i obecność w osoczu RNA wirusa HCV, lub (gdy nie oznaczano RNA HCV), zmiana wyniku badania przeciwciał anti-HCV z ujemnego na dodatni w krótkim okresie. Wykorzystanie przeciwciał anti-HDV do wykrycia zakażenia wirusem delta (HDV) powinno być ograniczone do pacjentów z dodatnim wynikiem badania na obecność antygenu HBsAg, szczególnie wówczas, gdy towarzyszy mu ciężkie zapalenie wątroby, obecne są czynniki podwyższonego ryzyka (uzależnienie od narkotyków przyjmowanych drogą dożylną, hemofilia), lub gdy przebieg choroby ma charakter dwufazowy (197). Jeżeli u pacjenta z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B dojdzie do dodatkowego zakażenia wirusem HDV, obraz kliniczny może przypominać ciężkie ostre uszkodzenie wątroby z niewydolnością tego narządu (197).

Zalecenia: Wstępne badanie w przypadku ostrego uszkodzenia wątroby powinno obejmować zebranie szczegółowego wywiadu dotyczącego przyjmowanych obecnie i w przeszłości leków oraz oznaczenie markerów zakażenia wirusowego (anty-HAV klasy IgM, anty-HBc klasy IgM, HBsAg oraz anty-HCV) (IIB).

Z powodu konieczności zastosowania profilaktyki po kontakcie danej osoby z wirusem, przeciwciała anty-HAV klasy IgM powinny być oznaczone w czasie < 48 godzin (IIIC, E).

W związku z opłacalnością finansową (w zależności od zachorowalności), laboratorium wstępnie może wykonać oznaczenie przeciwciał całkowitych anty-HAV oraz przeciwciał anty-HBc, badając następnie poziom przeciwciał klasy IgM tylko w przypadku, gdy wynik dodatni uzyskano w jednym lub obydwu testach, o ile w ten sposób zachowany będzie określony powyżej czas konieczności postawienia diagnozy (IIIE).

Rozpoznanie ostrego zakażenia HCV (u pacjentów z klinicznym obrazem ostrego uszkodzenia wątroby) może być wstępnie postawione na podstawie ujemnych wyników oznaczeń markerów zakażenia wirusami HAV i HBV, wiedzy o fakcie narażenia na kontakt z wirusem oraz ujemnego wyniku badania przeciwciał anty-HCV i dodatniego wyniku oznaczenia RNA wirusa HCV, lub też ujemnego wyniku wstępnego badania przeciwciał anty-HCV i późniejszego stwierdzenia obecności tych przeciwciał w okresie 1-3 miesięcy (IIIB).

Badanie w kierunku obecności wirusa HDV powinno być ograniczone do pacjentów z dodatnim wynikiem badania antygeny HBsAg, atypowym przebiegiem choroby oraz wysokim ryzykiem zakażenia tym wirusem (IIB, E).

Postępowanie w przypadku pacjentów, u których nie stwierdzono najczęstszych przyczyn ostrego uszkodzenia wątroby (Tabela 13)

Tabela 13. Rzadsze przyczyny ostrego uszkodzenia wątroby			
Przyczyna	Główne cechy	Badania laboratoryjne	Dane dodatkowe
Choroba Wilsona	Osoby młode, niska aktywność fosfatazy zasadowej, wysokie stężenie bilirubiny.	Niskie stężenie ceruloplazminy tylko w 40% przypadków. Nieprawidłowy gen w obrębie 13 chromosomu	Stężenie miedzi w surowicy nie jest badaniem rozstrzygającym u pacjentów z ostrą chorobą Wilsona. Często połączone z hemolizą, niewydolnością nerek
Autoimmunologiczne zapalenie wątroby	Osoby młode; podwyższone stężenie gammaglobulin; niski poziom albumin, często obecne wodobrzusze	Dodatni wynik badania w kierunku obecności ANA i/lub ASMA	W niektórych przypadkach inne zaburzenia autoimmunologiczne
Wirusowe zapalenie wątroby typu E	Podróż do obszarów endemicznych	Przeciwciała anti-HEV	Podobne do wirusowego zapalenia wątroby typu A
Inne wirusy	Często obserwowane objawy kliniczne przypominające mononukleozę	Przeciwciała anti-CMV i anti-EBV	Podwyższona aktywność fosfatazy zasadowej
ANA - przeciwciała przeciwjądrowe; ASMA - przeciwciała przeciw mięśniom gładkim; HEV - wirus zapalenia wątroby typu E; CMV - cytomegalowirus; EBV - wirus Epstein-Barr			

Niedokrwiennie i toksyczne uszkodzenie wątroby – Wartości stężeń AspAT i AlAT ponad 100x powyżej wartości prawidłowej są rzadko stwierdzane w wirusowym zapaleniu wątroby (174, 175), natomiast często występują zarówno w toksycznym uszkodzeniu wątroby (wskutek działania leków, np. acetaminofen) (96, 199, 200), jak i uszkodzeniu niedokrwiennym (94, 95, 190). W wywołanym aminoacetofenem uszkodzeniu wątroby, maksymalna wartość AspAT sięga ponad 3000 U/l w 90% przypadków (200). Toksyczne lub niedokrwiennie uszkodzenie wątroby stanowi 90% wszystkich uszkodzeń tego narządu, w których aktywność AspAT przekracza 3000 U/l (200a). W obydwu omawianych rodzajach uszkodzeń maksymalna wartość aktywności AspAT i AlAT osiągana jest wcześniej (często w ciągu pierwszych 24 godzin po przyjęciu do szpitala), przy czym aktywność AspAT początkowo przewyższa AlAT. Po osiągnięciu wartości maksymalnej aktywność obu enzymów szybko spada; w przypadku AspAT spadek ten jest szybszy niż w przypadku AlAT i może osiągnąć wartość 50% lub więcej w pierwszych 24 godzinach (199, 200), co jest związane z krótszym czasem półtrwania tego enzymu (175). Aktywność AspAT osiąga wartość bliską wartości prawidłowej średnio w 7 dni po uszkodzeniu (174). Czas protrombinowy przekraczający o 4 lub więcej sekund granicę normy stwierdzany jest w 90% przypadków (94, 96) i szybko ulega skróceniu po osiągnięciu przez AspAT wartości maksymalnej (94). Stężenie bilirubiny jest niższe niż 34 $\mu\text{mol/l}$ (2 mg/dl) w 80% przypadków uszkodzenia toksycznego lub niedokrwiennego (94, 95, 96). Aktywność dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) jest często wyższa niż

aktywność AspAT w chwili wystąpienia objawów toksycznego lub niedokrwienego uszkodzenia wątroby (94, 199, 200), podczas gdy w wirusowych zapaleniach wątroby wartość ta jest podwyższona w pierwszym badaniu tylko w 55% przypadków, przy czym wartość średnia jest tylko nieznacznie wyższa od górnej granicy normy (175).

Inne przyczyny – W rzadkich przypadkach choroby Wilsona oraz autoimmunologicznego zapalenia wątroby (omawiane szerzej przy opisie przewlekłego zapalenia wątroby) dochodzić może do ostrego uszkodzenia tego narządu (Tabela 13). Wirusowe zapalenie wątroby typu E jest chorobą endemiczną występującą w niektórych częściach świata; osoby z ostrym uszkodzeniem wątroby, które podróżowały do tych obszarów lub pozostawały na ich terenie, powinny być badane na obecność przeciwciał anti-HEV. Niektóre wirusy inne niż klasyczne czynniki zapalenia wątroby (HAV, HBV, HCV, HEV) powiązane są z występowaniem tej grupy chorób; należą do nich wirusy opryszczki, cytomegalii (CMV), enterowirusy, koronawirusy, reowirusy (u noworodków), adenowirusy, parwowirus B6 (w grupie pediatrycznej), wirusy ospy wietrznej i półpaśca oraz wirus Epstein-Barr. Kiła, leptospiroza oraz toksoplazmoza mogą również być przyczyną uszkodzenia wątroby, podobnie jak inne rzadziej występujące czynniki zakaźne. W rzadkich przypadkach inne choroby, jak chłoniaki, zespół Budd'a-Chiari'ego oraz schorzenie polegające na zarastaniu drobnych żył wątroby, mogą prezentować obraz ostrego uszkodzenia wątroby. Na ogół uszkodzenia wątroby powiązane z tymi czynnikami etiologicznymi są albo bardzo rzadkie, albo połączone ze swoistym zespołem chorobowym (ospa wietrzna w przypadku wirusa varicella-zoster, mononukleozą w przypadku wirusa Epstein-Barr lub cytomegalowirusa). Większość pacjentów, u których doszło do uszkodzenia wątroby w wyniku działania innych czynników infekcyjnych, ma objawy sugerujące rodzaj patogenu. Swoista diagnostyka zakażenia spowodowanego przez inne czynniki powinna być przeprowadzona wówczas, gdy etiologia pozostaje nieznaną po wykluczeniu częstych przyczyn choroby i gdy ustalenie rozpoznania wydaje się klinicznie wskazane. Do dodatkowego zakażenia innymi wirusami wywołującymi zapalenie wątroby może dojść u pacjentów z innymi postaciami uszkodzenia wątroby; przykładowo, pacjenci z przewlekłym zakażeniem wirusem HCV lub poalkoholowym zapaleniem wątroby mogą ulec zakażeniu wirusami HAV lub HBV i rozwinąć ostre zapalenie wątroby spowodowane tą infekcją. W przewlekłym zapaleniu wątroby, nagły wzrost aktywności aminotransferaz naśladujący ostre uszkodzenie wątroby może pojawić się wraz z zanikiem antygenów HBeAg (208) lub z pojawieniem się gatunków wirusa podobnych do HCV (209).

Zalecenia: W przypadku pacjentów, u których stwierdzono ujemny wynik badania markerów WZW, zaś początkowe stężenie AspAT było ponad 100-krotnie wyższe od górnej granicy normy, należy podejrzewać uszkodzenie toksyczne lub niedokrwienie (IIB).

W przypadku pacjentów, u których stwierdzono ujemny wynik badania markerów WZW, zaś aktywność enzymów jest 8 do 100-krotnie wyższa od górnej granicy normy, należy za pomocą badań wykluczyć możliwość wystąpienia choroby Wilsona oraz autoimmunologicznego zapalenia wątroby (IIB).

Badanie na obecność przeciwciał przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu E zalecane jest u osób, u których stwierdzono ujemne wyniki badań serologicznych w kierunku zakażenia innymi wirusami, zaś w wywiadzie ustalono, że podróżowały do obszarów endemicznych lub pozostawały na ich terenie (IIIE).

Badania na obecność innych czynników infekcyjnych (wirus Epstein-Barr, cytomegalowirus, kiła, toksoplazmoza) wykonane mogą być wówczas, gdy nie stwierdzono żadnych innych przyczyn schorzenia (IIB).

Monitorowanie

Aminotransferazy – W wirusowym zapaleniu wątroby aktywność aminotransferaz ma tendencję do wzrostu przed wystąpieniem żółtaczki, zaś maksymalną wartość osiąga w chwili jej pojawienia się, a następnie stopniowo ulega obniżeniu (191). Spadek aktywności jest powolny w zapaleniu wirusowym i poalkoholowym; stężenia AspAT i AlAT obniżają się odpowiednio o średnio 11,7% i 10,5% dziennie, a podwyższenia tych wartości utrzymują się odpowiednio przez 22 ± 16 i 27 ± 16 dni (175). W wirusowym zapaleniu wątroby typu A wtórny wzrost aktywności enzymów występuje w 5-10% przypadków i jest połączony z obecnością RNA wirusa HAV w krążeniu oraz cząstek wirusa w stolcu, co wskazuje na potencjalną możliwość przeniesienia infekcji (210). Zgodnie z danymi przedstawionymi powyżej, w niedokrwinnym i toksycznym uszkodzeniu wątroby aktywność AspAT i AlAT obniża się powoli po osiągnięciu wartości maksymalnej. W chwili, gdy aktywność aminotransferaz wykazuje trwałą tendencję do obniżania się, parametry te nie wymagają dalszego kontrolowania aż do momentu całkowitego wyzdrowienia. Powrót aktywności tych enzymów do wartości prawidłowych nie jest pewną oznaką zdrowienia w wirusowym zapaleniu wątroby typu B i C. W przypadku pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, 49% osób, u których przy wstępnym badaniu stwierdza się prawidłowy poziom AlAT, po serokonwersji wykazuje podwyższenie aktywności tego enzymu w dalszych badaniach (211). W zapaleniu wątroby typu B wartości AspAT i AlAT mogą powrócić do normy mimo utrzymywania się zakażenia (212).

Bilirubina – Bilirubina osiąga maksymalne stężenie często o około tydzień później niż aminotransferazy, a następnie jej zawartość stopniowo obniża się. W wirusowym zapaleniu wątroby maksymalne stężenie bilirubiny rzędu 257-342 $\mu\text{mol/l}$ (15-20 mg/dl) jest zjawiskiem rzadkim. Tylko 10-12% pacjentów z tym schorzeniem wykazuje wartości powyżej 257 $\mu\text{mol/l}$ (15 mg/dl), zaś wartości powyżej 342 $\mu\text{mol/l}$ (20 mg/dl) stwierdzone są jedynie u 4% osób; wyższe stężenia bilirubiny częściej występują w zakażeniach wirusem HBV (175, 181). Wraz z obniżaniem się stężenia bilirubiny całkowitej, proporcjonalny udział δ -bilirubiny ulega podwyższeniu, często osiągając wartość 70-80% bilirubiny całkowitej (213, 214). U dorosłych z wirusowym zapaleniem wątroby, podwyższone stężenie bilirubiny utrzymuje się 30,3 \pm 19,7 dni po wystąpieniu wartości maksymalnej (175), u dzieci natomiast ulega szybciej eliminacji (181); żółtaczka utrzymuje się przez ponad 6 tygodni u 34% dorosłych osób zakażonych wirusem HBV, zaś jedynie w 15% przypadków innych postaci wirusowego zapalenia wątroby (181). Przedłużony okres występowania podwyższonych stężeń bilirubiny związanej, obserwowany jest czasami w zapaleniach wirusowych wątroby, szczególnie typu A, jednak nie oznacza złego rokowania, o ile funkcja syntezy nie uległa zaburzeniu (215). Znaczący wzrost stężenia bilirubiny jest zjawiskiem rzadkim w przypadku toksycznego i niedokrwiennego uszkodzenia wątroby. W chwili, gdy stężenie bilirubiny w surowicy zaczyna się obniżać, nie ma konieczności dokonywania kolejnych pomiarów, o ile żółtaczka nie ulegnie nasileniu.

Badanie parametrów krzepnięcia – Wydłużony czas protrombinowy jest często stwierdzany w niedokrwinnym i toksycznym uszkodzeniu wątroby; nierzadko osiąga wartości > 15 sekund lub 4 sekundy powyżej górnej granicy normy przed późniejszym szybkim powrotem do wartości prawidłowych. Brak danych, które pozwalałyby na ocenę wpływu stopnia wydłużenia czasu protrombinowego na rokowanie w niedokrwinnym uszkodzeniu wątroby. Wydłużenie czasu protrombinowego > 15 sekund lub o 4 sekundy powyżej granicy normy w wirusowym lub poalkoholowym zapaleniu wątroby jest oznaką ciężkiego przebiegu choroby (98, 99, 180).

Markery serologiczne – W przypadku osób z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby typu B, HBsAg jest najlepszym wskaźnikiem eliminacji wirusa. U pacjentów, u których nie stwierdza się antygenu HBsAg i pojawiają się przeciwciała anti-HBs, niemal nigdy nie dochodzi do nawrotu i uszkodzenia wątroby; osoby takie można uważać za wyleczone z zakażenia wirusem HBV. W ostrych zakażeniach wirusem HCV, w większości przypadków nigdy nie rozwija się obraz kliniczny ostrego uszkodzenia wątroby (154, 211). Jedynym pewnym wskaźnikiem eliminacji wirusa jest stwierdzony kilkakrotnie (w co najmniej dwóch badaniach) ujemny wynik testu na obecność RNA HCV (z użyciem czułych testów jakościowych).

Zalecenia: Czas protrombinowy > 4 sekund powyżej górnego progu referencyjnego, stężenie bilirubiny > 257 $\mu\text{mol/l}$ (15 mg/dl) lub wystąpienie encefalopatii są charakterystyczne dla chorych z wysokim ryzykiem. Pacjenci ci wymagają dokładniejszego monitorowania i skierowania do gastroenterologa lub hepatologa (IIB).

W przypadku pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby typu B, ponowne oznaczenie antygenu HBsAg powinno być przeprowadzone po 6-12 miesiącach; jeśli wynik tego badania jest ujemny i stwierdza się obecność przeciwciał anti-HBs, nie ma konieczności dalszego kontrolowania pacjenta (IIE).

U pacjentów z ostrym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, aktywność AlAT powinna być okresowo kontrolowana przez kolejne 1-2 lata w celu upewnienia się, czy wartości te utrzymują się w granicach normy. Eliminacja wirusa powinna być potwierdzona za pomocą testu jakościowego do oznaczania RNA wirusa HCV (IIB).

Rozdział IV

Przewlekłe uszkodzenie wątroby

Przewlekłe uszkodzenie wątroby jest względnie częstym zaburzeniem z minimalnymi objawami, jednakże w długim okresie charakteryzującym się ryzykiem znacznej zachorowalności i śmiertelności. W sensie patologicznym zdefiniowane jest ono jako postępująca martwica i stan zapalny w obrębie wątroby, którym często towarzyszy włóknienie. Stan ten może doprowadzić do marskości wątroby (15-20% przypadków w przewlekłym zakażeniu wirusem HCV) oraz predysponuje do rozwoju raka wątrobowokomórkowego. Najczęściej spowodowany jest on przewlekłym zakażeniem wirusowym. W samych Stanach Zjednoczonych około 1-1,25 miliona osób jest przewlekłe zakażonych wirusem HCV (1). Ponadto około 1-1,25 miliona ludzi jest w Stanach Zjednoczonych przewlekłymi nosicielami wirusa HBV. O ile w innych częściach świata współczynnik zapadalności dla zakażenia HCV na ogół ma wartość od 0,5 do 5%, o tyle wartość współczynnika zapadalności dla zakażenia HBV wykazuje znaczące różnice, zaś na wielu terenach zakażenie to ma charakter endemiczny. Zapadalność w przypadku endemicznego zakażenia HBV u dzieci zmniejsza się w wielu rejonach świata w związku z wprowadzeniem szczepień przeciwko temu wirusowi. Dane kliniczne oraz wyniki badań laboratoryjnych często są wystarczające do postawienia najbardziej prawdopodobnego rozpoznania; współczynnik prognostyczny, w porównaniu z liczbą rozpoznań postawionych na podstawie biopsji, dla alkoholowego zapalenia wątroby ma wartość 88%, zaś 81% dla przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby (przed okresem powszechnej dostępności testów do oznaczania HCV) (216).

Zalecenia: W przypadku braku wyniku biopsji wątroby wskazującego na przewlekłe zapalenie tego narządu, w celu postawienia rozpoznania tego schorzenia wykorzystać należy jedną z poniższych definicji klinicznych:

Podwyższenie wartości AlAT przez okres dłuższy niż 6 miesięcy od epizodu ostrego zapalenia wątroby, **LUB**

Podwyższenie stężenia AlAT (którego nie tłumaczy żadna przyczyna) stwierdzone w więcej niż jednym badaniu w okresie 6 miesięcy. Krótszy okres może być rozważny w przypadku pacjentów z czynnikami ryzyka przewlekłego zapalenia wątroby, genetycznymi przyczynami uszkodzenia wątroby lub uszkodzeniami autoimmunologicznymi, lub też w przypadku obecności oznak lub objawów klinicznych choroby tego narządu (IIB).

Pomimo to, że definicja przewlekłego uszkodzenia wątroby jako utrzymywania się podwyższonych wartości AlAT jest powszechnie akceptowana, u 15-50% osób z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C aktywność tego enzymu stale pozostaje w granicach normy (211). Prawdopodobieństwo utrzymywania się prawidłowych wartości AlAT zmniejsza się wraz ze wzrostem liczby pomiarów; nawet po trzykrotnym stwierdzeniu prawidłowej aktywności tego enzymu, u 11% spośród pacjentów z przewlekłą wiremią HCV w późniejszym okresie choroby stwierdza się trwale podwyższone wartości stężenia AlAT (211). Aktywność AlAT często ulega fluktuacjom między wartościami prawidłowymi i nieprawidłowymi, szczególnie w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C; u 60% pacjentów, u których wielokrotnie wykonywano oznaczenia AlAT, rzadko stwierdzano wartości prawidłowe (Dufour DR, obserwacje niepublikowane). U większości pacjentów, u których stale stwierdzano prawidłową aktywność AlAT, w badaniach histologicznych materiału biopsyjnego stwierdzano obraz przewlekłego zapalenia wątroby, jednak na ogół proces zapalny i włóknienie były mniej nasilone, zaś progresja zmian w kierunku marskości stwierdzana była rzadziej niż u pacjentów z zakażeniem HCV, u których wartości AlAT były podwyższone (185, 217). CDC w swoich wytycznych nie zaleca leczenia pacjentów z zakażeniem HCV i utrzymującymi się prawidłowymi wartościami AlAT (218). Chociaż konieczne jest przeprowadzenie badań długoterminowych, wydaje się, że zaproponowana definicja kliniczna nie pomija znaczącej grupy chorych, którzy wymagają leczenia, i którzy mogą odnieść z niego korzyści.

Nie zawsze możliwe jest rozróżnienie ostrego i przewlekłego uszkodzenia wątroby. U większości pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C (najczęstszą postacią przewlekłego uszkodzenia wątroby) wartości AlAT 1-4-krotnie przekraczają górną granicę normy, zaś w 90% przypadków maksymalna wartość jest mniej niż 7-krotnie wyższa od górnej granicy normy; wielkości te są więc niższe niż obserwowane zwykle w ostrym zapaleniu wątroby. Jednakże w około 5% przypadków szczytowa wartość AlAT może być ponad 10-krotnie wyższa od górnej granicy normy, z towarzyszącą żółtaczką, co daje obraz kliniczny podobny do obserwowanego w ostrym uszkodzeniu wątroby (Dufour DR, obserwacje niepublikowane). W takich przypadkach często konieczne jest wykonanie dodatkowych badań w celu wykluczenia innej przyczyny ostrego uszkodzenia wątroby.

Badania przesiewowe

Ogólnopopulacyjne badania przesiewowe w celu wykrycia osób z przewlekłym uszkodzeniem wątroby, nie mają uzasadnienia ekonomicznego; powinny być one ograniczone jedynie do osób z grup wysokiego ryzyka (218, 219). Należą do nich członkowie rodzin, w których w przeszłości stwierdzano choroby genetyczne mające wpływ na czynność wątroby, co opisano poniżej, lub też osoby, u których stwierdza

się czynniki ryzyka przewlekłego zakażenia wirusowego (Tabela 14).

Tabela 14. Czynniki ryzyka przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby (218)	
Ustalane czynniki ryzyka	<ul style="list-style-type: none"> • Stosowanie leków podawanych w formie wstrzyknięć • Długotrwałe hemodializy • Przetoczenie krwi lub transplantacja przez 1992 rokiem (HCV) • Przyjmowanie krwi (łącznie z zakłuciem) pochodzącej od dawcy, u którego w późniejszych badaniach stwierdzono zakażenie HCV • Przyjmowanie koncentratów czynników krzepnięcia wyprodukowanych przed 1987 rokiem • Przodkowie pochodzący z Azji (HBV) • Nie szczepieni pracownicy służby zdrowia (HBV) • Matka mająca w chwili urodzenia dziecka przewlekłe zakażenie HBV lub HCV • Stosunki homoseksualne między mężczyznami (HBV)
Możliwe czynniki ryzyka	<ul style="list-style-type: none"> • Piercing oraz tatuaż • Liczni partnerzy seksualni lub choroby przenoszone drogą płciową • Pracownicy służby zdrowia (HCV) • Kontakt z osobami zakażonymi wirusem HBV lub HCV

Aktywność AlAT jest wyższa niż AspAT w przypadku wszystkich przyczyn przewlekłego uszkodzenia wątroby z wyjątkiem spożywania alkoholu; poziom AspAT w znaczącej liczbie przypadków mieści się w granicach normy. Wartości AlAT mogą być prawidłowe u pacjentów z marskością wątroby, podczas gdy wartości AspAT pozostają podwyższone (100, 220). Zasadniczo u wszystkich pacjentów wartości bilirubiny całkowitej i bezpośredniej oraz fosfatazy zasadowej pozostają prawidłowe, nie są więc przydatne w badaniach przesiewowych (216, 221, 222). Jeśli w rutynowych badaniach stwierdzony zostanie podwyższony poziom AlAT, wynik ten powinien być potwierdzony w dalszych badaniach, zanim podjęte zostaną jakiegokolwiek działania. Jedynie u niewielkiej liczby osób z podwyższoną wartością AlAT w tylko jednym badaniu stwierdza się chorobę wątroby (221, 223). U pacjentów z nieznacznie podwyższoną aktywnością AlAT (1-2-krotnie powyżej górnej granicy normy) przyczyną tego zaburzenia najprawdopodobniej nie jest choroba (216, 222, 223); mimo to, w przypadku około 30% pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV szczytowa wartość AlAT jest mniej niż 2-krotnie wyższa od górnej granicy normy (Dufor DR, obserwacje niepublikowane). Ponieważ enzym ten znajduje się również w mięśniach szkieletowych, wskazane jest uwzględnienie wysiłku fizycznego, a jeśli takowy miał miejsce, należy rozważyć pomiar aktywności kinazy kreatynowej w celu wykluczenia mięśniowego pochodzenia AlAT (25, 223).

W przypadku pacjentów, u których stwierdza się czynniki ryzyka przewlekłego zakażenia wirusami HBV lub HCV (Tabela 14), w ramach badań przesiewowych w kierunku przewlekłej infekcji określony powinien być antygen HBsAg i przeciwciała anty-HCV. Osoby będące przewlekłymi „nosicielami“ wirusa HBV najczęściej wyka-

zują prawidłową aktywność AlAT (224); podobne wartości stale lub okresowo stwierdza się u 15-30% pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV; prawdopodobieństwo otrzymania prawidłowych wyników pomiarów spada jednakże wraz ze wzrostem częstości powtarzania oznaczeń (225). W związku z faktem, iż u osób posiadających przeciwciała anti-HCV okresowo nie stwierdza się wykrywalnej wirerii, pacjenci z dodatnim wynikiem badania na obecność przeciwciał anti-HCV i prawidłowymi wartościami AlAT powinni być poddani badaniu jakościowemu na obecność RNA wirusa HCV w celu zidentyfikowania tych z nich, u których doszło do przetrwałego zakażenia. RNA HCV może być przejściowo obecny we krwi we wczesnych stadiach infekcji (157). Jeśli u pacjenta stwierdza się stale podwyższone wartości AlAT, dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał anti-HCV i ujemne wyniki badań RNA HCV, ostatni z tych testów powinien być powtarzany.

Zalecenia: Badania przesiewowe w kierunku przewlekłego zapalenia wątroby zalecane są osobom, u których nie stwierdza się objawów choroby, jednak występują czynniki wysokiego ryzyka powstania schorzenia (IIB, E).

Pomiar AlAT jest najbardziej ekonomicznym badaniem przesiewowym do wykrywania metabolicznych lub polekowych uszkodzeń wątroby; jeśli w wywiadzie stwierdza się nadużywanie alkoholu, oznaczyć należy również AspAT (IIB, E).

U osób z wysokim ryzykiem wirusowego zapalenia wątroby, poza AlAT oznaczane powinny być również swoiste markery serologiczne (antygen HBsAg, przeciwciała anti-HCV) (IB).

Jeśli jest to konieczne, procedura potwierdzenia obecności przewlekłego zakażenia wirusem HCV u osób z dodatnim wynikiem oznaczeń przeciwciał anti-HCV, powinna obejmować badanie RNA HCV (IIB).

Diagnostyka różnicowa

Jeśli wywiad kliniczny sugeruje nadużywanie alkoholu i/lub wartości AspAT są wyższe niż AlAT (szczególnie, gdy są wyższe niż 2 x wartość AlAT), najbardziej prawdopodobnym rozpoznaniem jest poalkoholowe zapalenie wątroby. W rzeczywistości w żadnej innej postaci przewlekłego uszkodzenia wątroby wartości AspAT nie są wyższe od AlAT, dopóki nie dojdzie do rozwoju marskości wątroby (221, 222). Pomimo to, iż większość przypadków przewlekłego uszkodzenia wątroby wywołana jest przez wirusy, leki lub alkohol, również liczne inne przyczyny mogą prowadzić do tego

schorzenia. Dodatkowe badania nie są konieczne, jeśli wstępna ocena pacjenta wskazuje na zapalenie wątroby typu B, C lub poalkoholowe zapalenie wątroby (222, 226). Leki zlecane przez lekarzy mogą powodować trwałe podwyższenie wartości AlAT; najczęściej dotyczy to takich leków, jak sulfonamidy, środki obniżające stężenie cholesterolu oraz izoniazyd (198). W jednym z badań, które przeprowadzono na terenach o niskiej zapadalności na wirusowe zapalenie wątroby, u osób z przewlekłym uszkodzeniem wątroby, którego etiologii nie wyjaśniono mimo wykonania wielu badań laboratoryjnych, często w wywiadzie stwierdzano przyjmowanie leków (227). W przypadku pacjentów z podwyższonymi wartościami AlAT, ujemnymi wynikami badań markerów wirusowych, u których w wywiadzie wykluczono przyjmowanie leków lub spożywanie alkoholu, należy wziąć pod uwagę rzadsze przyczyny przewlekłego uszkodzenia wątroby (Tabela 15).

Tabela 15. Inne przyczyny długotrwałego podwyższenia wartości AlAT i/lub AspAT			
Przyczyna	Główna cecha	Badania przesiewowe	Badania potwierdzające
Niealkoholowe zapalenie wątroby ze stłuszczeniem	Najczęstsza przyczyna poza wirusami i alkoholem	Brak	Biopsja
Hemochromatoza	Cecha autosomalna recesywna; 1:200 przypadków w krajach Europy Północnej	Wysycenie transferyny > 45%; utajona zdolność wiązania żelaza < 28 $\mu\text{mol/l}$ (155 $\mu\text{g/dl}$)	Analiza genu HFE na obecność mutacji C282Y
Choroba Wilsona	Cecha autosomalna recesywna; 1:30 000 osób; niedokrwistość hemolityczna, uszkodzenie nerek	Niskie stężenie ceruloplazminy u 65-95% homozygot i 20% heterozygot	Analiza genetyczna, niskie stężenie miedzi w surowicy, wysokie stężenie miedzi w moczu
Autoimmunologiczne zapalenie wątroby	Do 18% zapaleń wątroby nie wywołanych przez wirusy, głównie u młodych kobiet; podwyższone stężenie γ -globulin	ANA i ASMA; częste fałszywie dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał anti-HCV	Biopsja
Pierwotna marskość żółciowa	Kobiety w wieku średnim; zwykle podwyższone stężenie fosfatazy zasadowej; często połączone z zespołem Sjögrena	Przeciwciała przeciwmitochondrialne	Biopsja
Stwardniające zapalenie dróg żółciowych	Mężczyźni młodzi oraz w wieku średnim; zwykle głównie podwyższenie fosfatazy zasadowej; często połączone z chorobami zapalnymi jelit	Przeciwciała cytoplazmatyczne skierowane przeciwko neutrofilom; możliwość dodatnich wyników oznaczeń ASMA i ANA	Badanie obrazowe przewodu żółciowego
Niedobór α -1-antytrypsyny	Cecha autosomalna recesywna; 1:1000 do 1:2000. Istnieją kontrowersje, czy jest przyczyną przewlekłych schorzeń wątroby u dorosłych	Fenotypowanie α -1-antytrypsyny	

Zalecenia: Wstępna ocena powinna obejmować szczegółowy wywiad dotyczący przyjmowanych leków oraz oznaczenie antygenu HbsAg i przeciwciał anti-HCV. Jeśli wynik badania na obecność przeciwciał anti-HCV jest dodatni, przewlekłe zakażenie powinno być potwierdzone za pomocą jakościowego testu na obecność RNA wirusa HCV (IIB, E).

W przypadku trwale podwyższonych wartości AlAT i ujemnego wyniku badania markerów wirusowych, dalsze postępowanie powinno obejmować oznaczenie przeciwciał przeciwjądrowych, stężenia żelaza, zdolności wiązania żelaza (lub utajonej zdolności wiązania żelaza) (IIB).

U pacjentów w wieku poniżej 40 r.ż. należy również oznaczyć stężenie ceruloplazminy (IIB).

W przypadku pacjentów z ujemnym wynikiem badania tych markerów wykorzystane może być fenotypowanie α -1-antytrypsyny (IIB).

Jeśli wyniki tych testów są ujemne lub nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków, powinna być wykonana diagnostyczna biopsja wątroby (IIB).

Postępowanie w przypadku pacjentów, u których nie stwierdzono oczywistych przyczyn przewlekłego uszkodzenia wątroby

Niealkoholowe zapalenie wątroby ze stłuszczeniem (NASH) – Wystąpienie przewlekłej choroby wątroby przypominającej w obrazie histologicznym poalkoholowe zapalenie wątroby (zwyrodnienie tłuszczowe lub stłuszczenie, odpowiedź zapalna ze strony neutrofilów oraz ciała Mallory'ego) u pacjentów, u których nie stwierdza się uzależnienia od alkoholu, stosujemy termin NASH. Wiele osób z podwyższonym stężeniem AlAT ma stłuszczenie wątroby bez pełnego obrazu histologicznego NASH (227). NASH jest najczęstszą przyczyną przewlekłego uszkodzenia wątroby inną niż wirusy i alkohol, oraz najczęstszą przyczyną skrytopochodnej marskości wątroby (216, 228). Choć występuje najczęściej u kobiet w wieku średnim, z otyłością i/lub cukrzycą, pojawia się również u mężczyzn, a także u osób, u których nie występują te czynniki ryzyka (228). Pacjenci z NASH najczęściej mają nieprawidłowe profile lipidowe, chociaż prawidłowe wartości nie wykluczają choroby. Chorobę tę od poalkoholowego zapalenia wątroby odróżnia wyższa od AspAT aktywność AlAT (z wyjątkiem przypadków marskości) (229). Zmniejszenie wagi ciała może znacząco poprawić wartości enzymów; w jednym z badań redukcja wagi o 1% powodowała średni spadek aktywności AlAT o 8,1% (230). Nie istnieją żadne cechy kliniczne ani testy

laboratoryjne, które pozwalają na ostateczne postawienie rozpoznania NASH; biopsja jest jedyną procedurą diagnostyczną o zadowalającej swoistości.

Zalecenia: W celu postawienia rozpoznania NASH konieczne jest wykonanie biopsji (IIB).

Hemochromatoza – Schorzenie to, będące cechą autosomalną recesywną, jest najczęściej dziedzicznym defektem genetycznym w populacji mieszkańców Europy Północnej (w przybliżeniu 1:200 - 1:300 w Stanach Zjednoczonych) (231). Większość przypadków spowodowana jest mutacją w jednym z dwóch punktów genu HFE w obrębie chromosomu 6. Dominująca grupa (60-90%) dotkniętych tą chorobą osób to homozygoty mutacji C282Y (845A), zaś w pozostałej, mniejszej grupie stwierdza się układ heterozygotyczny dla tej mutacji oraz mutację H63D (187G) (232). Badanie przesiewowe obejmuje wykrycie podwyższonego wysycenia transferyny (wysycenie = zawartość żelaza (Fe) w surowicy * 100/całkowita zdolność wiązania żelaza (TIBC)) (233) lub niskiej zdolności wiązania niewysyczonego żelaza (234). Wartość odcięcia w przypadku wysycenia transferyny $\geq 45\%$, lub w przypadku zdolności wiązania niewysyczonego żelaza $\leq 28 \mu\text{mol/l}$ ($155 \mu\text{g/dl}$) ma czułość 90-100% w przypadku układu homozygotycznego dla mutacji C282Y; jeśli wykorzystywane są próbki krwi pobierane na czczo, swoistość ma wartość 43% (235, 236). Zgodnie z zaleceniami ostatniej konferencji uzgodnień ostateczne rozpoznanie ustalone powinno być na podstawie analizy genetycznej (237). Chociaż w kilku ostatnich publikacjach wykazano możliwość zastosowania pomiarów wysycenia transferyny w badaniach przesiewowych w kierunku hemochromatozy, jednak większość organizacji oraz badaczy nie zaleca obecnie wykonywania tego rodzaju badań z powodu nierozwiązanych problemów dotyczących konieczności przekonania młodych dorosłych osób do wykonania badań, swoistości i powtarzalności badań przesiewowych oraz wątpliwości związanych z naturalnym przebiegiem choroby w przypadkach nie leczonych (237). Badania przesiewowe są popierane przez Kolegium Patologów Amerykańskich (238); oszacowano, że w przypadku każdego badanego dawcy krwi dają one oszczędności około 3,19 \$ (239).

Zalecenia: Wstępne badanie w kierunku hemochromatozy powinno obejmować określenie wysycenia transferyny lub utajonej zdolności wiązania żelaza w surowicy krwi pobranej na czczo (IIB).

W przypadku stwierdzenia wysycenia transferyny $\geq 45\%$ lub utajonej zdolności wiązania żelaza $\leq 28 \mu\text{mol/l}$ ($155 \mu\text{g/dl}$) należy dokonać analizy genu HFE (IIB).

Badania przesiewowe populacji mogą być użyteczne, jednak obecnie ich wykonywanie nie jest zalecane w związku z trwającym procesem wyjaśniania korzyści z nich płynących (IIB, E).

Choroba Wilsona – Choroba Wilsona jest zaburzeniem dziedziczonym autosomalnie recesywnie występującym u 1 na 30 000 osób w Europie i Ameryce Północnej. Wywołana jest ona mutacją genu w obrębie chromosomu 13 kodującego ATP-azę konieczną do transportu miedzi (240). Choroba Wilsona może mieć charakter schorzeń wątroby, problemów neurologicznych lub objawów psychiatrycznych, prawie zawsze przed 40 r.ż. Większość pacjentów, u których doszło do choroby wątroby, nie ma objawów neurologicznych (201). W badaniach laboratoryjnych najczęściej stwierdza się niskie stężenie ceruloplazminy w osoczu. Wartości takie stwierdza się również w niedożywieniu, utracie białek oraz w zaawansowanych chorobach wątroby, natomiast fałszywie prawidłowe wartości mogą pojawić się w ciąży, w przypadku przyjmowania estrogenów oraz w ostrych stanach zapalnych (241). Większość źródeł stwierdza obecność niskich stężeń ceruloplazminy u 95% homozygot i u 20% heterozygot (241). W jednym z badań stwierdzono prawidłowe poziomy ceruloplazminy u 35% pacjentów z przewlekłą chorobą wątroby spowodowaną chorobą Wilsona (potwierdzoną badaniem genetycznym w 80% przypadków), jednak tylko u 15% pacjentów z chorobą Wilsona bez zajęcia wątroby (201). Inne fakty obserwowane w chorobie Wilsona to podwyższenie stężenia wolnej miedzi w surowicy, obniżenie stężenia miedzi całkowitej w surowicy, zwiększone wydalanie miedzi z moczem i zwiększenie zawartości miedzi w wątrobie. Badania te mogą również być źródłem mylących wyników u pacjentów z chorobą Wilsona (201, 242). W celu ustalenia rozpoznania konieczne jest przeprowadzenie wielokrotnych badań.

Zalecenia: Badania stężenia ceruloplazminy w chorobie Wilsona wskazane są u pacjentów w wieku poniżej 40 lat, z przewlekłym uszkodzeniem lub stłuszczeniem wątroby, u których badania na obecność wirusowego zapalenia wątroby, uszkodzenia polekowego i hemochromatozy dały wynik ujemny (IIB).

Nie są wskazane badania przesiewowe w kierunku choroby Wilsona u wszystkich pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby (IIB, E).

Oznaczanie markerów genetycznych może być użyteczne w przypadkach niejednoznacznych, jednak testy powinny umożliwiać wykrywanie kilku mutacji w genie odpowiedzialnym za rozwój choroby Wilsona (IIIB).

Autoimmunologiczne zapalenie wątroby – Autoimmunologiczne zapalenie wątroby (AZW) odpowiedzialne jest za około 18% przypadków przewlekłego zapalenia tego narządu, które nie wynikają z infekcji wirusowej ani działania alkoholu (243). Opisano różne odmiany tego schorzenia (244). Typ 1, stwierdzany głównie u kobiet młodych oraz w wieku średnim, jest najczęstszą postacią AZW; powiązany jest on z wysokim mianem przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) i/lub przeciwciał przeciw mięśniom gładkim (ASMA). Typ 2, stwierdzany głównie u dzieci, jest częsty w Europie Zachodniej, jednak rzadko występuje w Stanach Zjednoczonych; powiązany jest on z obecnością przeciwciał przeciw antygenowi mikrosomalnemu wątroby-nerek (anty-LKM₁), zaś rzadko stwierdza się obecność ANA i ASMA. Wielu pacjentów z typem 2 AZW jest również zakażonych wirusem HCV. Typ 3, stwierdzany głównie u młodych kobiet, w wielu przypadkach powiązany jest ogólnoustrojową chorobą autoimmunologiczną. U większości tych pacjentów nie stwierdza się obecności przeciwciał ANA, ASMA ani przeciwciał przeciw mikrosomom wątroby-nerek, jednak znajdują się przeciwciała przeciwko rozpuszczalnemu antygenowi wątrobowemu (anty-SLA). W ramach międzynarodowego panelu zdefiniowano wystandaryzowane kryteria diagnostyczne oraz system ich oceny (206). Klasyczne cechy najczęściej występującego typu 1 obejmują: podwyższoną aktywność aminotransferaz; minimalny wzrost wartości lub jego brak fosfatazy zasadowej; poliklonalną hipergammaglobulinę (co najmniej 1,5 x wartość górnej granicy normy); brak cech zakażenia wirusowego, czynników ryzyka infekcji wirusowej oraz ekspozycji na leki lub alkohol; dodatni wynik badania na obecność przeciwciał ANA lub ASMA (minimum 1:80) (206). U około 40% pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HCV stwierdza się obecność przeciwciał ANA lub ASMA, zwykle w niskich mianach (244). W przypadku użycia testów drugiej generacji fałszywie dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał anti-HCV stwierdzano u 60% pacjentów z AZW, natomiast przy zastosowaniu testów trzeciej generacji u 20% osób (245); przeciwciała anti-HCV najczęściej zanikają wraz z wdrożeniem odpowiedniego leczenia (246). W przypadkach

niejednoznacznych w ustaleniu diagnozy pomocne może być badanie RNA wirusa HCV (lub test rekombinacyjny typu immunoblot) (245).

Zalecenia: Autoimmunologiczne zapalenie wątroby powinno być podejrzewane u pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby i podwyższonym poziomem immunoglobulin, przy braku markerów zakażenia wirusowego lub czynników ryzyka wirusowego zapalenia wątroby (IIIB).

Rozpoznanie AZW typu 1 może być potwierdzone obecnością przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) i przeciwciał przeciw mięśniom gładkim (ASMA) o wysokich mianach (IIIB).

Pierwotna marskość żółciowa i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych –

Pierwotna marskość żółciowa (PMŻ) i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSZDŻ) są chorobami autoimmunologicznymi powodującymi niszczenie przewodów żółciowych. Pomimo charakterystycznego w tych schorzeniach podwyższenia fosfatazy zasadowej i GGT, u pacjentów stwierdzić można również podwyższenie aktywności AspAT i AlAT, co jest przyczyną podejrzeń o przewlekłe zapalenie wątroby. Pierwotna marskość żółciowa wiąże się ze zniszczeniem wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych; często towarzyszy innym zaburzeniom autoimmunologicznym, szczególnie zespołowi Sjögrena (do 80% przypadków) (247). Marker zaburzeń autoimmunologicznych, przeciwciała przeciwmitochondrialne (AMA), stwierdzane są prawie u wszystkich pacjentów z PMŻ. Chociaż w innych schorzeniach również można stwierdzić obecność przeciwciał przeciwmitochondrialnych (AMA), w PMŻ przeciwciała te skierowane są przeciwko kompleksowi dehydrogenazy pirogronianowej (tzw. typ M2 przeciwciał AMA), w szczególności acetylotransferazie dihydrolipoamidowej (E2) i białku wiążącym E3 (248). U około 5-10% pacjentów stwierdza się cechy zarówno PMŻ jak i AZW (249). PMŻ stwierdzana jest często u osób, u których nie są obserwowane żadne objawy, zaś aktywność fosfatazy zasadowej jest podwyższona. AspAT i AlAT są podwyższone w około połowie przypadków, chociaż wartości 2-krotnie przekraczające górną granicę normy stwierdza się tylko u 20% pacjentów (250). Pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych wiąże się ze zniszczeniem zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych; 70% przypadków towarzyszą choroby zapalne jelit (choroba Crohna lub wrzodziejące zapalenie jelita grubego) (251). W około 2/3 przypadków stwierdza się obecność przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilii (252). W PMŻ przeciwciała skierowane są zwykle przeciw białku ułatwiającemu przenikanie przez ścianę komórkową czynników bakteriobójczych, katepsynie G i/lub laktoferynie. Wydaje się, że różnice swoistości przeciwciał nie mają znaczenia prognostycznego, chociaż u pacjentów z marskością wątroby częściej stwierdza się obecność

przeciwciał przeciwko wielu antygenom oraz antygenom innym niż laktoferyna (253). Przeciwciała przeciwko mięśniom gładkim oraz przeciwciała przeciwjadrowe wykrywane są również w około 70% przypadków (254).

Zalecenia: Pierwotna marskość żółciowa lub pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych powinny być podejrzewane u pacjentów z przewlekle podwyższoną aktywnością fosfatazy zasadowej (IIB).

Rozpoznanie może być potwierdzone klinicznie stwierdzeniem dodatniego wyniku badania na obecność przeciwciał przeciwmitochondrialnych (PMŻ) lub przeciwciał przeciwko cytoplazmie neutrofilii (PSZDŻ) w wysokich mianach (IIB).

Niedobór alfa-1-antytrypsyny (A1AT) – Alfa-1-antytrypsyna jest najważniejszym inhibitorem proteaz; wrodzony niedobór tego czynnika występuje u około 1 na 1000 do 1 na 2000 osób w populacji europejskiej. Gen kodujący A1AT znajduje się na chromosomie 14 (255); niedobór spowodowany jest zwykle zamianą pojedynczego aminokwasu, co zmienia sposób wiązania z węglowodanami i zaburza uwalnianie czynnika z hepatocytów (256). Najpoważniejszy niedobór A1AT spowodowany jest układem homozygotycznym dla odmiany Z, określanym terminem Pi (inhibitor proteazy) ZZ. Niedobór wiąże się z rozedmą oraz zapaleniem wątroby u noworodków (257); opisywano również przewlekłe uszkodzenie wątroby z marskością i rakiem wątrobowokomórkowym (256). Prawie wszystkie noworodki z układem Pi ZZ wykazują objawy uszkodzenia wątroby w chwili urodzenia; zwykle choroba kończy się śmiercią w wieku około 12 lat (257). W przypadku dorosłych, u 50% osób, u których stwierdza się obecność Pi Z (w układzie zarówno homozygotycznym jak i heterozygotycznym) rozwija się marskość, zaś u 31% - rak wątrobowokomórkowy (256). Ponadto stwierdza się zbyt dużo heterozygot Pi Z wśród pacjentów kierowanych do przeszczepu wątroby, szczególnie u osób z marskością skrytopochodną, w przypadku której około 25% pacjentów posiada fenotyp Pi Z (258). Istnieją jednakże dowody, że niedobór A1AT lub układ heterozygotyczny dla fenotypu PiZ może nie być bezpośrednią przyczyną choroby wątroby, ale zwiększa podatność na uszkodzenie wątroby przez inne czynniki, szczególnie wirusy. W dwóch kontrolowanych badaniach stwierdzono tę samą częstość występowania fenotypu Pi Z (zarówno w układzie homozygotycznym jak i heterozygotycznym) u pacjentów ze schorzeniami wątroby oraz w grupie kontrolnej (259). W badaniu przeprowadzonym na 164 pacjentach z Pi Z, u 40% stwierdzono przewlekłą chorobę wątroby, u 87% wykryto przeciwciała anty-HCV lub markery zakażenia wirusem HBV, zaś tylko u 11% osób nie stwierdzono innych czynników ryzyka choroby wątroby (260). Ponieważ A1AT jest czynnikiem ostrej fazy, w zakażeniach lub stanach zapalnych

można stwierdzić fałszywie prawidłowe stężenia, zaś poziomy fałszywie zaniżone występować mogą w niedożywieniu, stanach utraty białek oraz końcowych stadiach choroby wątroby. W jednym z badań prawidłowe poziomy określone metodami ilościowymi stwierdzono u 42% pacjentów z heterozygotycznym układem Pi Z, mających chorobę wątroby (261). Badanie mające na celu wykrycie niedoboru A1AT powinno raczej opierać się na analizie fenotypowej, nie zaś na ilościowych pomiarach stężenia białka w osoczu (256).

Zalecenia: Badanie mające na celu wykrycie niedoboru alfa-1-antytrypsyny może być korzystne w przypadku pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby, u których nie stwierdza się żadnych innych przyczyn choroby, chociaż rola niedoboru A1AT w chorobach wątroby u dorosłych nie jest jasno zdefiniowana (IIB).

Badania takie są szczególnie istotne w przypadku noworodków z objawami uszkodzenia wątroby (IIB).

Badanie w celu określenia odmiany A1AT powinno obejmować określenie fenotypu (IIB).

Nie zaleca się wykonywania badań przesiewowych u pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby w celu wykrycia niedoboru alfa-1-antytrypsyny (IIIB, E).

Inne wirusy

Sugeruje się, że inne dwa wirusy mogą być zaangażowane w patogenezę przewlekłego zapalenia wątroby: wirus zapalenia wątroby typu G (HGV) oraz wirus TT (TTV). Obydwa wirusy mogą być przenoszone w czasie transfuzji; w obu przypadkach stwierdzana jest przewlekła wiremia. Zebrane do chwili obecnej dowody sugerują, że zakażenia tymi wirusami są częste, jednak nie jest jasne, czy odgrywają one jakąkolwiek rolę w uszkodzeniu wątroby. HGV (oraz spokrewniony z nim GBV-C) należą do rodziny flawiwirusów, podobnie jak wirus HCV. Wirusa HGV po raz pierwszy wyizolowano u pacjentów po przetoczeniach krwi, chociaż u większości nie stwierdzono objawów uszkodzenia wątroby (262). Wirus ten wykrywany jest również często w przewlekłych zapaleniach wątroby (263), jednak nie wydaje się, aby był on częstą przyczyną skrytopochodnej przewlekłej choroby tego narządu (264). Może to wynikać z faktu iż RNA wirusa HGV rzadko stwierdzany jest w wątrobie pacjentów z przewlekłą wiriemią (265). Wirus TTV zidentyfikowany został po raz pierwszy u pacjentów z potransfuzyjnym zapaleniem wątroby (266). DNA wirusa TTV wykry-

wany jest u 1-7% dawców krwi w Stanach Zjednoczonych (267, 268). Obecność DNA TTV u osób z zapaleniem wątroby nie-A-nie-E nie jest stwierdzana częściej niż w innych przypadkach ostrego zapalenia wątroby lub u pacjentów z grupy kontrolnej (268, 269).

Zalecenia: Nie zaleca się wykonywania badań na obecność wirusów HGV lub TTV w celach innych niż badawczych (IIIE).

Monitorowanie

Chociaż pomiar stężenia AlAT jest najczęściej wykonywanym badaniem laboratoryjnym wykorzystywanym do monitorowania uszkodzenia wątroby, często obserwowane są znaczące wahania aktywności tego enzymu (szczególnie w przewlekłym zakażeniu wirusem HCV) (217, 270). Istotne jest, aby przed stwierdzeniem prawidłowych wartości AlAT w przewlekłym zakażeniu HCV, wykonać pomiary kilkakrotnie (225); u 43% osób z przewlekłym zakażeniem stwierdza się fluktuacje stężeń AlAT między wartościami prawidłowymi i nieprawidłowymi, zaś w 16% przypadków, w których w pierwszych dwóch badaniach stwierdzono prawidłowe wartości AlAT oraz w 11% przypadków, w których wartości prawidłowe oznaczono w pierwszych trzech badaniach, w późniejszym okresie stwierdza się podwyższenie aktywności tego enzymu (211). W przypadku pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HBV, u których nie stwierdza się podwyższonej aktywności AlAT („przewlekłe nosicielstwo“), u około 10% osób w późniejszym okresie stężenia AlAT ulegną podwyższeniu (224); tak więc aktywność tego enzymu powinna być oznaczana wielokrotnie, nawet jeśli wstępne badanie dało wynik prawidłowy.

Zarówno w przewlekłym zakażeniu wirusem HBV jak i HCV, eliminacja markerów wirusowych jest najpewniejszą metodą pozwalającą na stwierdzenie regresji infekcji. W nie leczonym zapaleniu wątroby typu B, niewielki odsetek pacjentów samoistnie eliminuje antygeny wirusowe; w badaniach długookresowych utrata antygeny HBeAg występuje w 1/3 do 1/2 przypadków (208, 270). Spośród osób, które wyeliminowały antygen HBeAg, 5-10% w ciągu następnych 10 lat wyeliminuje antygen HBsAg (224, 271). Oznaczenia antygeny HBeAg powinny być okresowo powtarzane, jeśli w pierwszym badaniu stwierdzono wynik dodatni. Jeśli wynik badania antygeny HBeAg jest ujemny, wykryto zaś obecność przeciwciał anty-HBe, może to wskazywać zarówno początek procesu eliminacji wirusa z ustroju, jak i wbudowanie DNA wirusa HBV w DNA gospodarza oraz utratę zdolności tworzenia replikujących wirusów. Okresowo powinny być oznaczane HBsAg oraz przeciwciała anty-HBs w celu stwierdzenia eliminacji wirusa, gdyż antygen HBsAg może być stwierdzany

w przypadkach integracji DNA wirusa HBV z DNA gospodarza. W leczeniu zakażenia HBV, prawdopodobieństwo eliminacji wirusa zależy od wyjściowych wartości AlAT; osoby, u których stwierdza się wysoką aktywność tego enzymu lepiej odpowiadają na leczenie niż osoby, u których aktywność AlAT była prawidłowa (272). Skuteczne leczenie wiąże się z zanikiem DNA wirusa HBV, HBsAg i HBeAg. Choć istnieją dowody, iż wyniki ilościowych oznaczeń antygenu HBeAg dobrze korelują z zawartością DNA wirusa HBV (273), tego rodzaju testy ilościowe nie są dostępne w handlu. Antygen HBeAg może być wyeliminowany nawet u pacjentów, którzy nie odpowiadali na leczenie (274). Ponadto stwierdza się zwiększenie częstotliwości pojawiania się mutantów „pre-core“, które nie są w stanie wytwarzać antygenu HBeAg, w szczególności w endemicznych obszarach Azji i regionu Morza Śródziemnego (275). W zakażeniu wywołanym przez zwykłe szczepy, w okresie zdrowienia DNA wirusa HBV jest wykrywalny przez dłuższy okres, niż antygen HBsAg (276). Wraz z wbudowaniem DNA wirusowego do genomu gospodarza, antygen HBsAg jest nadal wytwarzany, chociaż oznaczenia antygenu HBeAg i DNA HBV w osoczu dają najczęściej wynik ujemny (277). W leczeniu z zastosowaniem lamiwudyny produkcja wirusowych kwasów nukleinowych jest hamowana przez odwrotną transkryptazę (277), chociaż stężenia wirusowego DNA w hepatocytach nie ulegają zmianie (278). Dlatego też oznaczanie DNA HBV, antygenów HBeAg i HBsAg może być użyteczne w monitorowaniu pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV, ponieważ żaden pojedynczy test nie może dostarczyć jednoznacznego dowodu na eliminację wirusa.

Większość badań dowiodła, że stężenia RNA wirusa HCV wahają się wraz z upływem czasu, jednak rzadko różnica ta jest większa niż 1 log, zaś w większości wypadków zmienność ta jest mniejsza niż 0,5 log (279). U osób nie leczonych, u których badania są powtarzane w okresie kilku lat, stężenie RNA wirusa HCV wzrasta średnio o 0,25 log/rok (281). W niektórych seriach badań jednakże, różnice rzędu 3 log obserwowano u pacjentów z podwyższonymi wartościami AlAT, gdy oznaczano RNA wirusa HCV w odstępach miesięcznych (282); u około 1/3 przewlekle zakażonych pacjentów ilość wykrywanego RNA wirusa HCV może wahać się od średnio 10^6 kopii/ml do wartości niewykrywalnych (283).

Aktualnie leczenie przeciwwirusowe zalecane jest w przypadku pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, u których stwierdzono podwyższoną aktywność AlAT oraz więcej niż łagodne zmiany zapalne w materiale biopsyjnym. Najskuteczniejsze leczenie, które jest dostępne obecnie to zastosowanie kombinacji rybawiryny i interferonu. Badania laboratoryjne okazały się pomocne w prognozowaniu odpowiedzi na różną długość okresów leczenia oraz w wykrywaniu osób, które nie odpowiadają na leczenie, i u których terapia prawdopodobnie powinna być przerwana. W przypadku pacjentów, u których zastosowano terapię łączoną, zarówno masywność

infekcji wirusowej jak i genotyp pozwalają identyfikować osoby, które mogą odpowiadać lepiej na leczenie trwające 24 tygodnie niż 48 tygodni (284, 285). W łączonej analizie dotyczącej tych dwóch badań, w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie zastosowanie znalazło pięć czynników (Tabela 16).

Tabela 16. Korzystne i niekorzystne czynniki ryzyka w leczeniu zakażenia wirusem HCV z zastosowaniem interferonu i rybawiryny (źródło referencyjne 286)

Czynniki korzystne

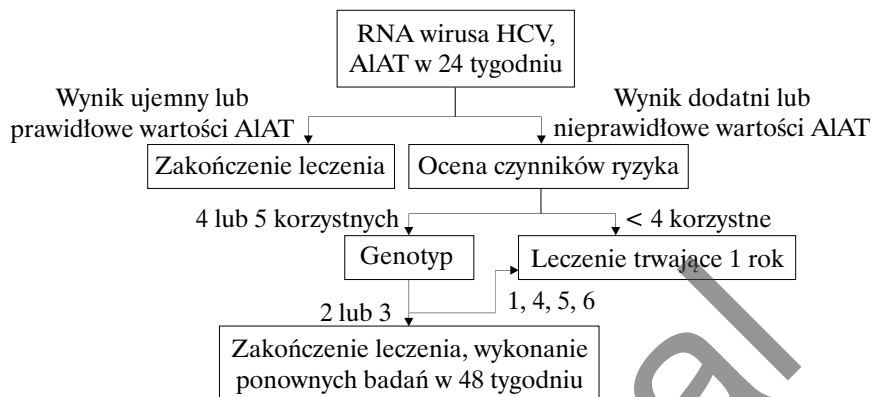
- Genotyp 2 lub 3
- Nasilenie infekcji wirusowej < wartość mediany ($3,5 \times 10^6$ kopii/ml)
- Płeć żeńska
- Wiek < 40 r.ż.
- Brak lub wyłącznie zwłóknienie wrotne

Czynniki niekorzystne

- Genotyp 1, 4, 5, 6
- Masywność infekcji wirusowej > wartość mediany
- Płeć męska
- Wiek 40 lat lub powyżej
- Zwłóknienie przegrodowe lub cięższe

W przypadku osób z genotypem 2 lub 3, u których występują 3 lub 4 inne korzystne czynniki ryzyka, można przeprowadzić skuteczne leczenie trwające tylko 24 tygodnie; wszyscy inni pacjenci lepiej odpowiadają na terapię 48-tygodniową (286). Najlepszym wskaźnikiem eliminacji wirusa jest stwierdzenie trwałego braku RNA wirusa HCV we krwi (oznaczanego za pomocą testów jakościowych). Brak obecności RNA HCV w 6 miesięcy po zakończeniu leczenia wiąże się z mniej niż 10% prawdopodobieństwem nawrotu wirerii HCV (287). Zmniejszenie ilości wirusa przy braku jego eliminacji nie jest pewnym dowodem na skuteczność leczenia; ponadto, brak spadku RNA wirusa HCV do wartości mniejszych niż 400 000 kopii/ml w czasie 12-tygodniowego leczenia wiąże się ze 100% prawdopodobieństwem przetrwania RNA HCV we krwi po zakończeniu leczenia (286). Na Rysunku 9 przedstawiono schemat monitorowania przebiegu leczenia pacjentów zakażonych wirusem HCV, u których zastosowano terapię łączoną.

MONITOROWANIE TERAPII ŁĄCZONEJ



Rysunek 9 – Schemat leczenia zakażenia wirusowego zapalenia wątroby typu C - Wstępnie powinno być oznaczone RNA wirusa HCV (korzystając z testów ilościowych o liniowości co najmniej do 4×10^6 kopii/ml) oraz zebrany materiał w celu oznaczenia genotypu; jeśli warunki techniczne nie pozwalają na przechowywanie próbek w temperaturze -70°C przez minimum 6 miesięcy, badania powinny być wykonane przed rozpoczęciem leczenia. Po sześciu miesiącach leczenia wykonane powinny być oznaczenia aktywności ALAT oraz odpowiednio czule badania RNA wirusa HCV (dolny próg wykrywalności < 1000 kopii/ml). Jeśli wartości ALAT pozostają podwyższone i/lub wykrywalny jest RNA wirusa HCV, leczenie jest przerywane. W przypadku pacjentów odpowiadających na leczenie, wykorzystywane są czynniki ryzyka (Tabela 16) do określania, czy konieczne jest leczenie przez kolejne 6 miesięcy. U pacjentów z genotypem 2 lub 3, u których stwierdza się co najmniej 3 inne korzystne czynniki ryzyka, leczenie może być zakończone.

Część pacjentów nie może przyjmować rybawiryny i wówczas jedyną dostępną alternatywną metodą leczenia jest monoterapia z zastosowaniem interferonu. W przypadku takiego leczenia, brak spadku ilości RNA wirusa HCV do wartości niewykrywalnych lub brak powrotu aktywności ALAT do normy w 12 tygodni po rozpoczęciu leczenia powiązane są z 95% prawdopodobieństwem niepowodzenia terapii i mogą być powodem jej przerwania (288).

Nie określono optymalnej częstotliwości wykonywania badań laboratoryjnych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Europejskie Towarzystwo Badań Wątroby (EASL) w odniesieniu do wirusowego zapalenia wątroby typu C zaleca, aby u nie leczonych pacjentów co 6 miesięcy wykonywać badanie morfologii krwi oraz aktywności enzymów wątrobowych (289). Główne powikłania leczenia interferonem obejmują depresję, trombocytopenię i niedoczynność tarczycy, natomiast niedokrwistość hemolityczna jest głównym powikłaniem leczenia rybawiryną.

Europejskie Towarzystwo Badań Wątroby zaleca cotygodniowe badanie morfologii krwi w czasie pierwszych czterech tygodni leczenia oraz regularne badania po tym okresie. Zalecane jest również oznaczanie TSH co 6 miesięcy w czasie trwania leczenia.

Zalecenia: W wirusowych zapaleniach wątroby markery wirusowe są najpewniejszymi wskaźnikami statusu choroby (IIB).

Oznaczenia ilościowe RNA wirusa HCV oraz określenie genotypu są istotnymi wskaźnikami długości trwania leczenia. W celu zmniejszenia wydatków na badania, jeśli jest to możliwe, próbki krwi powinny być pobierane przed leczeniem i przechowywane w temperaturze -70°C w czasie oczekiwania na wyniki leczenia. Jeśli nie jest to możliwe, badania powinny być wykonane przed rozpoczęciem leczenia (IIB, E).

U pacjentów z zakażeniem HCV leczonych interferonem i rybawiryną, badania jakościowe RNA wirusa powinny być wykonywane po 24 tygodniach od chwili rozpoczęcia leczenia w celu określenia, które osoby mogą potencjalnie odpowiedzieć na terapię. Jeśli nie określono genotypu oraz nie wykonano ilościowych oznaczeń RNA wirusa HCV, zaś próbki krwi zamrożono przed wdrożeniem leczenia w celu wykonania późniejszych badań, powinny one zostać wykonane w przypadku osób z ujemnym wynikiem oznaczenia RNA wirusa oraz korzystnymi czynnikami ryzyka (IB, E).

W przypadku pacjentów z zakażeniem HCV leczonych wyłącznie interferonem, testy jakościowe do oznaczeń RNA HCV oraz badanie aktywności AlAT powinny być wykonane po 12 tygodniach leczenia w celu określenia, które z osób nie odpowiadają na leczenie (IIB).

W przypadku leczenia u osób z ujemnym wynikiem badania na obecność RNA HCV, w 24 tygodniu oznaczenia RNA tego wirusa powinny być przeprowadzane z użyciem czułych testów (aktualnie dotyczy to testów jakościowych) w 6 miesięcy po zakończeniu leczenia, w celu udokumentowania utrzymującej się remisji zakażenia wirusem (IIB).

U nie leczonych pacjentów z zakażeniem wirusem HBV, okresowo monitorowany powinien być antygen HBeAg; gdy wynik tego badania jest ujemny, zaś we krwi stwierdza się obecność przeciwciał anti-HBe, okresowo monitorować należy antygen HBsAg w celu stwierdzenia eliminacji wirusa. W przypadku leczenia przeciwwirusowego, w celu udokumentowania eliminacji wirusa oznaczyć należy również DNA wirusa HBV (IIB).

W przypadku pacjentów leczonych badanie morfologii oraz liczby płytek krwi powinno być wykonywane przez pierwsze cztery tygodnie co tydzień, a następnie co miesiąc. TSH powinno być oznaczane co 3 do 6 miesięcy, lub częściej, jeśli pojawią się objawy nieprawidłowej funkcji tarczycy. Pomiary aktywności AIAT wykonywane powinny być co najmniej raz w miesiącu (IIB).

Aktywność AIAT jest najlepszym dostępnym wykładnikiem stanu zapalnego, jednak parametr ten ma ograniczone zastosowanie w prognozowaniu stopnia zawansowania zapalenia, zaś w szacowaniu ciężkości stopnia zwłóknienia nie znajduje żadnego zastosowania (IIB).

Rozdział V

Marskość wątroby

Główne niebezpieczeństwo przewlekłego zapalenia wątroby polega na możliwości przejścia choroby w stadium marskości wątroby, będącej końcowym etapem procesu bliznowacenia w odpowiedzi na przewlekłe uszkodzenie. Bliznowacenie jest przyczyną zwiększonego oporu dla przepływu krwi przez żyłę wrotną (doprowadzającą do wątroby krew z jelit), co prowadzi do powstania wodobrzusza, żylaków przełyku i zwiększa ryzyko infekcji. Ostatecznie marskość wątroby może powodować niewydolność wątroby i jest główną przyczyną wykonywania przeszczepów tego narządu. Obecnie „złotym standardem“ w ocenie pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby jest biopsja, która pozwala określić ciężkość tego uszkodzenia.

Na obraz przewlekłego zapalenia wątroby składają się dwa czynniki: uszkodzenie zapalne oraz zwłóknienie. O ile rozległość procesu zapalnego odzwierciedla stopień uszkodzenia w danym momencie, o tyle rozległość zwłóknienia w większym stopniu powiązana jest z prawdopodobieństwem rozwinięcia się marskości wątroby. Aktywność aminotransferaz w osoczu nie pozostaje w związku ze stopniem zwłóknienia, zaś między aktywnością ALAT w osoczu (290, 291) lub poziomem RNA HCV (w przewlekłym zakażeniu HCV) (291) i zmianami histologicznymi istnieje słaba korelacja. Poziom ALAT w najlepszym razie koreluje tylko w 30-50% przypadków zmianami histologicznymi, natomiast zauważalne jest znacznego stopnia pokrywanie się wartości ALAT u pacjentów z łagodnymi, umiarkowanymi i znacznymi zmianami histologicznymi (290, 291). Stopień aktywności procesu zapalnego wykazuje słabą korelację z częstością progresji zwłóknienia (292).

Zwłóknienie wątroby jest związane z odkładaniem się w wątrobie wielu białek. Wśród białek wytwarzanych w procesie zwłóknienia stwierdza się obecność kolagenu, lamininy, elastyny i fibronektyny oraz enzymów wytwarzanych przy produkcji kolagenu jak hydroksylaza lizyny i proliny. W procesie zwłóknienia powstają również różne proteoglikany jak hialuronian. Zwłóknienie ulega ograniczeniu w wyniku działania związanych z tym procesem enzymów określanych mianem metaloproteinaz macierzy; enzymy te oraz ich inhibitory produkowane są również w przewlekłym zapaleniu wątroby. Liczne badania dotyczące stężeń proteoglikanów, białek związanych z procesem włóknienia oraz ich prekursorów w osoczu (293, 294) wykazały tylko słabą korelację między poziomami markerów i rozległością zwłóknienia. Poziomy te wskazują na stopień fibrogenyzy w chwili pobierania próbek do badania; natomiast zauważalne jest znacznego stopnia pokrywanie się wartości w różnych stopniach zwłóknienia.

W procesie progresji zmian od przewlekłego zapalenia wątroby do marskości, w wynikach podstawowych badań laboratoryjnych dostrzegalne są liczne zmiany. Kilka badań wykazało, że stosunek wartości AspAT do AlAT jest mniejszy od 1 u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby (z wyjątkiem schorzenia wywołanego przez alkohol), natomiast wraz z postępem zmian w kierunku marskości współczynnik ten wzrasta do wartości >1 . Swoistość dla współczynnika AspAT/AlAT >1 wynosi 75-100%, zaś czułość 32-83% (100, 220). W jednym z badań (220) stwierdzono wzrost współczynnika wraz ze wzrostem stopnia zwłóknienia. Wydaje się to być spowodowane redukcją produkcji AlAT w uszkodzonej wątrobie (295). Inne wyniki rutynowych badań, które wskazują na prawdopodobieństwo wystąpienia marskości, to obecność trombocytopenii i wydłużenie czasu protrombinowego; wskaźnik, obejmujący ocenę tych dwóch zmiennych oraz współczynnika AspAT/AlAT charakteryzuje się czułością 46% i swoistością 98% dla marskości wątroby (100). U pacjentów podejrzewanych o progresję zmian w kierunku marskości oznaczane są najczęściej albuminy. Choć badanie to nie jest tak czułe jak pomiar innych markerów, wykorzystywane jest jako wskaźnik ciężkości schorzenia i stanowi część klasyfikacji marskości wg Child'a-Pugh'a. Podwyższenie stężenia alfa-fetoproteiny (AFP) jest bardziej prawdopodobne wraz ze wzrostem stopnia zwłóknienia wątroby (296), szczególnie w marskości; poziom AFP wyższy niż 17,8 ng/ml charakteryzuje się czułością 35%, swoistością 98,6% oraz dodatnią wartością predykcyjną 97,7% (297).

Zalecenia: Biopsja jest jedynym ostatecznym wskaźnikiem progresji zmian od przewlekłego zapalenia wątroby do marskości (IIB).

Laboratoryjne markery zwłóknienia nie powinny być wykorzystywane z wyjątkiem prac badawczych (IIB, E).

Wskaźniki czynności wątroby mogące wskazywać na zmiany w kierunku marskości (stosunek AspAT/AlAT, poziom albumin, czas protrombinowy, liczba płytek krwi) powinny być oceniane u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby co 3-6 miesięcy (IIB).

Rozdział VI

Rak wątrobowokomórkowy

Pierwotny rak wątroby (rak wątrobowokomórkowy, HCC) jest poważnym późnym powikłaniem przewlekłego uszkodzenia wątroby, szczególnie w marskości spowodowanej przez zakażenie wirusem HBV, HCV lub hemochromatozę. HCC obserwowane jest rzadko u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C oraz u bezobjawowych nosicieli wirusa HBV, u których nie stwierdza się marskości. Nowotwór ten zajmuje piąte miejsce wśród najczęściej występujących nowotworów złośliwych na świecie i jest szczególnie częsty we Wschodniej Azji oraz w Afryce (298). W ciągu ostatnich 20 lat częstość występowania HCC w Stanach Zjednoczonych wzrosła o 70%, szczególnie w grupie młodszych pacjentów (299); wzrasta również w innych częściach świata (298). Ryzyko rozwinięcia się HCC w marskości spowodowanej przewlekłym zakażeniem wirusem HBV lub HCV wynosi 1,5% na rok (300, 301). W badaniu obejmującym 448 przypadków HCC stwierdzono, że 75% z nich dotyczyło pacjentów z marskością wątroby; tylko w 30% przypadków postawiono kliniczne rozpoznanie marskości przed zdiagnozowaniem raka wątrobowokomórkowego (302). Dane te wskazują, iż programy badań przesiewowych, jeżeli zostaną wprowadzone, muszą obejmować grupę pacjentów z przewlekłym uszkodzeniem wątroby oraz pacjentów ze stwierdzoną marskością tego narządu. W jednym z badań stwierdzono jednakże, że rak wątrobowokomórkowy rozwinął się tylko u 325 pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem wątroby lub jej marskością, zaś nie stwierdzono go u żadnego z 800 pacjentów z łagodnym lub umiarkowanym przewlekłym zapaleniem wątroby (303). Ponieważ pacjenci, u których stwierdza się prawidłowe wartości ALAT, na ogół mają łagodne zmiany zapalne w materiale pobranym podczas biopsji (185, 217, 218), uzasadnione jest wykluczenie z badań przesiewowych osób bez marskości i z prawidłowymi wartościami ALAT lub mniejszymi niż ciężkie zmianami zapalnymi w materiale biopsyjnym. Inne czynniki ryzyka to płeć męska i wiek > 55 lat.

Rokowanie u pacjentów, u których stwierdzono HCC na podstawie rozwoju objawów, jest poważne; niewielu pacjentów przeżywa więcej niż 6 miesięcy. Wykrycie niewielkiego guza stwarza możliwość wykonania leczącej resekcji, co czyni uzasadnionym prowadzenie badań przesiewowych. Zgodnie z obecną praktyką sugerowane jest wykonywanie pomiarów stężenia α -fetoproteiny (AFP) i badania ultrasonograficznego wątroby co 6 miesięcy (304). Niestety, interpretacja wyników AFP jest utrudniona przez okresowe wzrosty stężeń u 12-13% pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HBV lub HCV (305), którym często (choć nie zawsze) towarzyszy przejściowy wzrost aktywności ALAT (306). Uzgodnienie Komitetu Ekspertów zaleca wykonywanie badań przesiewowych u nosicieli antygenu HBsAg przynajmniej

raz, a najlepiej dwa razy w roku w postaci oznaczenia wyłącznie AFP, natomiast w przypadku pacjentów z innymi czynnikami ryzyka (zdiagnozowana marskość wątroby, wywiad rodzinny) wykonane powinno być zarówno oznaczenie AFP jak i badanie ultrasonograficzne (307). W przewlekłym uszkodzeniu wątroby wysokie ryzyko rozwoju HCC występuje u pacjentów z hemochromatozą lub z marskością spowodowaną zakażeniem wirusem HBV, HCV lub uszkodzeniem poalkoholowym. Przewlekłe uszkodzenia wątroby oraz marskości powstałe z innych przyczyn charakteryzują się niskim ryzykiem powstania HCC (308).

W krajach zachodnich uznaje się, że AFP ma niską wartość prognostyczną, często rzędu 10-30%, z czułością między 40 a 80% (309, 310). Wśród 147 pacjentów z marskością wątroby, u żadnej z 30 osób z HCC nie stwierdzono AFP w stężeniu > 105 ng/ml w chwili diagnozowania, zaś w 60% przypadków stwierdzono wartości < 20 ng/ml. Częstość występowania HCC u pacjentów z wartościami AFP < 50 ng/ml wynosiła 17% w porównaniu z 42% w przypadku osób z wartościami wyższymi (310). W innym badaniu obejmującym 260 pacjentów z marskością, HCC rozwinął się u 26% osób z wartością początkową AFP < 20 ng/ml, natomiast u 46% osób z wartościami wyższymi. Jednakże u pacjentów, u których nawet przejściowo stwierdzano wartości powyżej 100 ng/ml, ryzyko powstania HCC było znacząco wyższe niż u osób, u których wartości AFP stałe pozostawały na poziomie < 20 ng/ml (311). W analizie opartej na publikacjach dotyczących badań przesiewowych w kierunku HCC u pacjentów z wyrównaną marskością pochodzących z krajów zachodnich stwierdzono, że w przypadku osób, u których prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat wynosi 85%, badania przesiewowe mogą przyczynić się do wydłużenia tego okresu średnio o 3-9 miesięcy przy kosztach rzędu 26 000 - 55 000 \$ na każdy dodatkowy rok życia, co jest porównywalne z badaniami przesiewowymi w raku okrężnicy i sutka (312). U pacjentów z niższym prawdopodobieństwem przeżycia, badanie przesiewowe ma niewielki lub nie ma żadnego wpływu na wydłużenie oczekiwanego okresu przeżycia i nie wydaje się być wskazane. Systematyczna analiza wszystkich opublikowanych prac wskazuje, iż brak jest wystarczających danych do określenia korzyści wykonywania badań przesiewowych w kierunku HCC u pacjentów z przewlekłą chorobą wątroby (313). Jeśli badania takie są wykonywane, częstość wykonywania testów co 6 miesięcy wydaje się być optymalna w związku z faktem, iż okres podwojenia liczby przypadków HCC wynosi średnio 3-5 miesięcy (314).

Sugerowano również wykorzystanie pomiaru stężenia des- γ -karboksyprotrombiny jako testu przesiewowego. Poziomy tej substancji są sporadycznie podwyższone w przewlekłych chorobach wątroby, jednak nakładanie się wartości jest słabsze w przypadku HCC w porównaniu z AFP (315, 316). Sporadycznie podwyższone stężenia stwierdzane są w przerzutach nowotworowych do wątroby, jednak stopień podwyższenia tych wartości jest zwykle minimalny. Chociaż pomiar des- γ -karboksyprom-

trombiny charakteryzuje się mniejszą czułością (50-70%) niż oznaczenie AFP, jest jednak bardziej swoisty. Istnieje słaba korelacja między wartościami AFP i des- γ -karboksyprombiny, zaś niektóre nowotwory wykryte mogą być wyłącznie poprzez oznaczenie tej drugiej substancji (315, 316). Niedobór witaminy K może być również przyczyną znaczącego podwyższenia stężenia des- γ -karboksyprombiny; powtórne badania po podaniu witaminy K wpływają korzystnie na swoistość (315, 316). Ostatnio obiecujące wyniki w wykrywaniu niewielkich zmian o charakterze HCC obserwowano przy zastosowaniu nowej, bardziej czulej metody immunologicznej; wyniki dodatnie stwierdzano w 27% przypadków, w porównaniu z wartością 3% dla testów starszego typu (317). Testy służące do oznaczania des- γ -karboksyprombiny, w porównaniu z testami do pomiarów AFP, nie są powszechnie dostępne. Inne badania laboratoryjne, jak oznaczanie odmian AFP (318) oraz chromatografia powinowactwa z użyciem lecytyny do pomiarów fosfatazy zasadowej (319), oceniane były na zbyt małej grupie pacjentów, aby można było je ostatecznie polecić. W ostatnich badaniach stwierdzano wysokie poziomy nieprawidłowych postaci GGT u 78 spośród 91 pacjentów z HCC, zaś tylko u 2,5% spośród 116 pacjentów z innymi chorobami wątroby (320).

Zalecenia: Korzyści wynikające z wykonywania badań przesiewowych w kierunku raka wątrobowokomórkowego u pacjentów z krajów zachodnich są dyskusyjne (IIB, E).

Badaniami przesiewowymi objęci powinni być wyłącznie pacjenci z grupy wysokiego ryzyka (z ciężkim przewlekłym zapaleniem wątroby lub marskością spowodowaną nadużywaniem alkoholu, zakażeniem HBV, HCV lub hemochromatozą), którzy są kandydatami do leczenia raka wątrobowokomórkowego, jeśli schorzenie takie zostało u nich wykryte (IIIB, E).

Jeśli badania przesiewowe są wykonywane, zalecane odstępy między pomiarami α -fetoproteiny (AFP) i badaniami ultrasonograficznymi nie powinny być krótsze niż 6 miesięcy (IIB).

Obecnie zebrano zbyt mało danych, aby można było polecać użycie innych testów (IIIB).

Bibliografia

1. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al.: The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556-562.
2. Staadatmand F, Stinson FS, Grant BF, Dufour MC: Surveillance Report #49 - liver cirrhosis mortality in the United States, 1970-1995. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health
3. Davis GL, Albright JH, Cook SF, et al.: Projecting the future healthcare burden from hepatitis C in the United States. *Hepatology* 1998;28:390A.
4. El-Serag HB, Mason AC: Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-750.
5. Kaplan LA: Determination and application of desirable analytical performance goals: the ISO/TC 212 approach. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:479-482.
6. Fraser CG: The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:404-415.
7. Westgard JO, Seehafer JJ, Barry PL: European specifications for imprecision and inaccuracy compared with operating specifications that assure the quality required by US CLIA proficiency-testing criteria. *Clin Chem* 1994;40:1228-1232.
8. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al.: Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
9. Skendzel LP, Barnett RN, Platt R: Medically useful criteria for analytic performance of laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 1985;83:200-205.
10. Lott JA, Tholen DW, Massion CG: Proficiency testing of enzymes. Charting the way toward standardization. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:392-398.
11. Ross JW, Lawson NS: Analytic goals, concentration relationships, and state of the art for clinical laboratory precision. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:495-513.
12. Lott JA, Wolf PL: Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST). *Clinical enzymology: a case-oriented approach*. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1986,111-138.
13. Rej R. Measurement of aminotransferases: Part 1. Aspartate aminotransferase. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1984;21:99-106.
14. Price CP, Alberti KGMM: Biochemical Assessment of Liver Function. in Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH (eds.): Liver and Biliary Disease - Pathophysiology, Diagnosis, Management. London: W.B. Saunders, 1979,381-416.
15. Panteghini M: Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin Biochem* 1990;23:311-319.
16. Siest G, Henry J, Schiele F, Young DS: Interpretation of Clinical Laboratory Tests: Reference Values and Their Biological Variation. Foster City, CA: Biomedical Publications, 1985.
17. Siest G, Schiele F, Galteau M-M, et al.: Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities in plasma: statistical distributions, individual variations, and reference values. *Clin Chem* 1975;21:1077-1087.
18. Cordoba J, O'Riordan K, Dupuis J, Borensztajn J, Blei AT: Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. *Hepatology* 1999;28:1724-1725.
19. Fraser, CG: Biological variation in clinical chemistry: an update: collated data, 1988-1991. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:916-923.

21. Manolio TA, Burke GL, Savage PJ, et al.: Sex- and race-related differences in liver-associated serum chemistry tests in young adults in the CARDIA study. *Clin Chem* 1992;28:1853-1859.
22. Salvaggio A, Periti M, Miano L, Tavanelli M, Mazurati D: Body mass index and liver enzyme activity in serum. *Clin Chem* 1991;37:720-723.
23. Piton A, Poynard T, Imbert-Bismut F, et al.: Factors associated with serum alanine aminotransaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C. MULTIVIRC group. *Hepatology* 1998;27:1213-L219.
24. Nuttall FQ, Jones B: Creatine kinase and glutamic oxalacetic transaminase activity in serum: kinetics of change with exercise and effect of physical conditioning. *J Lab Clin Med* 1968;51:257-261.
25. Dufour DR: Effects of habitual exercise on routine laboratory tests. *Clin Chem* 1998;44:136.
26. Ono T, Kitaguchi K, Takehara M, Shiiba M, Hayami K: Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clin Chem* 1981;27:35-38.
27. DiMagno EP, Corle D, O'Brien JF, Masnyk IJ, Go VL, Aamodt R: Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum. *Mayo Clin Proc* 1989;64:1226-1234.
28. Prasad R, Firkins K, Fiorello J: Stability of AST and ALT assays in Tris buffers. *Clin Chem* 1990;36:131-132.
29. Litin S, O'Brien JF, Pruett S, et al.: Macroenzyme as a cause of unexplained elevation of aspartate aminotransferase. *Mayo Clin Proc* 1987;62:681-687.
30. Mifflin TE, Bruns DE, Wrotnoski U, et al.: Macroamylase, macro creatine kinase, and other macroenzymes. *Clin Chem* 1985;31:1743-1748.
31. Nalpas B, Vassault A, Le Guillou A, et al.: Serum activity of mitochondrial aspartate aminotransferase: a sensitive marker of alcoholism with or without alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1984;4:893-896.
32. Pol S, Nalpas B, Vassault A, et al.: Hepatic activity and mRNA expression of aspartate aminotransferase isoenzymes in alcoholic and non alcoholic liver disease. *Hepatology* 1991;14:620-625.
33. Ludwig S, Kaplowitz N: Effect of serum pyridoxine deficiency on serum and liver transaminases in experimental liver injury in the rat. *Gastroenterology* 1980;79:545-549.
34. Zhou S-L, Gordon RE, Bradbury M, Stump D, Kiang C-L, Berk PD: Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in Hep G-2 cells. *Hepatology* 1998;27:1064-1074.
35. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 1978;24:58-73.
36. Vanderlinde RE: Review of pyridoxal phosphate and the transaminases in liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 1986;16:79-93.
37. Allman MA, Pang E, Yau DF, Stewart PM, Tiller DJ, Truswell AS: Elevated plasma vitamers of vitamin B6 in patients with chronic renal failure on regular hemodialysis. *Eur J Clin Nutr* 1992;46:679-683.
38. Dybkaer R, for the International Federation of Clinical Expert Panel on Theory of Reference Values and International Committee for Standardization in Haematology Standing Committee on Reference Values: Approved recommendation (1987) on the theory of reference values part 6. Presentation of observed values related to reference values. *Labmedica* 1988 (Apr/May), 27-30.
39. Lott JA, Tholen DW, Massion CG: Determination of reference ranges for serum enzymes via a large interlaboratory survey. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:9-15.
40. Moss DW: Multiple forms of acid and alkaline phosphatases: genetics, expression and tissue modification. *Clin Chim Acta* 1986;161:123-135.

41. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, et al. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 1988;263:12002-12010.
42. Clubb JS, Neale FC, Posen S. The behavior of infused placental alkaline phosphatase in human subjects. *J Lab Clin Med* 1965;66:493-507.
43. Moss DW. Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane-bound alkaline phosphatase from cells. *Clin Chim Acta* 1997;257:133-140.
44. Schlaeger R, Haux D, Kattermann R. Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholestasis: significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of alkaline phosphatase from rat liver. *Enzyme* 1982;28:3-13.
45. Bayer PM, Hotschek H, Knoth E. Intestinal alkaline phosphatase and the ABO blood group system: A new aspect. *Clin Chim Acta* 1980;108:81-7.
46. Gordon T: Factors associated with serum alkaline phosphatase level. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:187-190.
47. Young DS: *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*, 2nd Ed. Washington, DC: AACC Press, 1997.
48. Yamada N, Kido K, Hayashi S, et al.: Characteristics of blood biochemical constituents of pregnant women. *Acta Obstet Gynaec Jpn* 1977;29:447-450.
49. Dufour, DR: Effects of oral contraceptives on routine laboratory tests. *Clin Chem* 1998;44:137.
50. Bowers GN Jr, McComb RB, Kelley ML. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Sel Meth Clin Chem* 1977;8:31-9.
51. Gomez B, Ardakani S, Ju J, et al. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 1995;41:1551-1553.
52. Anciaux ML, Pelletier AG, Attali P, Meduri B, Liguory C, Etienne JP: Prospective study of clinical and biochemical features of symptomatic choledocholithiasis. *Dig Dis Sci* 1986;31:449-453.
53. Sheeman M, Maythorn P Predictive value of gamma-glutamyl transpeptidase in various liver diseases. In: Goldberg DM, Werner M, eds. *Progress in Clinical Enzymology*, New York, Masson, 1979,184-187.
54. Ratanasavanh D, Tazi A, Gaspart E. Hepatic gamma-glutamyl transferase release: effect of bile salt and membrane structure modification. *Advan Biochem Pharamacol* 1982;3:93-103.
55. Itoh S, Nakajima M: Liver gamma-glutamyl transferase activity in viral liver disease. *Digestion* 1986;33:121-125.
56. Nemesanszky E, Loff JA: Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes: progress and problems. *Clin Chem* 1985;31:797-803.
57. Nilssen O, Helge-Forde O, Brenn T: The Tromso study - distribution and population determinants of gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 1990;132:318-326.
58. Schiele F, Guilmin A-M, Detienne H, et al. Gamma-glutamyltransferase activity in plasma: statistical distributions, individual variations, and reference intervals. *Clin Chem* 1977;23:1023-1028.
59. Combes B, Shore GM, Cunningham FG, Walker FB, Shorey JW, Ware A: Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in viral hepatitis: suppression in pregnancy and by birth control pills. *Gastroenterology* 1977;72:271-274.
60. Young DS: *Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, 4th Ed. Washington, D.C.: AACC Press, 1995.
61. Moussavian SN, Becker RC, Piepmeyer JL, Mezey E, Bozian RC: Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism - influence of alcohol ingestion and liver disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:211-214.

62. Hedworth-Whitty RB, Whitfield JB, Richardson RW. Serum gamma-glutamyltranspeptidase activity in myocardial ischaemia. *Brit Heart J* 1967;29:432-438.
63. Burrows S, Feldman W, McBride F: Serum gamma-glutamyl transpeptidase. Evaluation in screening of hospitalized patients. *Am J Clin Pathol* 1975;64:311-314.
64. Shaw LM, Stromme JH, London JL, Theodorsen L: International Federation of Clinical Chemistry. Scientific Committee, Analytical Section. Expert Panel on Enzymes. IFCC methods for measurement of enzymes. Part 4. IFCC methods for gamma- glutamyltransferase [(gamma-glutamyl)-peptide: amino acid gamma- glutamyltransferase, EC 2.3.2.2]. *Clin Chim Acta* 1983;135:315f-338f.
65. Chowdhury JR, Wolkoff AW, Chowdhury NR, Arias IM. Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, eds., New York, McGraw-Hill, Inc., 1995;2:2161-2208.
66. Berk PD, Martin JF, Blaschke TF, Scharchmidt BF, Plotz PH: Unconjugated hyperbilirubinemia: physiologic evaluation and experimental approaches to therapy. *Ann Intern Med* 1975;82:552-570.
67. Bloomer JR, Berk PD, Vergalla J, Berlin NI. Influence of albumin on the extravascular distribution of unconjugated bilirubin. *Clin Sci Mol Med* 1973;45:517-521.
68. McDonagh AF, Palma AA, Lauff JJ, Wu TW: Origin of mammalian biliprotein and rearrangement of bilirubin glucuronides in vivo in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:763-770.
69. Fevery J, Blanckaert N: What can we learn from analysis of serum bilirubin. *J Hepatol* 1986;2:113-121.
70. Berk PD, Noyer C: Clinical chemistry and physiology of bilirubin. *Sem Liver Dis* 1994;14:346-355.
71. Zimmerman HJ: Intrahepatic cholestasis. *Arch Intern Med* 1979; 139:1038-1045.
72. Van Hootegeem P, Fevery J, Blanckaert N: Serum bilirubins in hepatobiliary disease: comparison with other liver function tests and changes in the portobstructive period. *Hepatology* 1985;5:112-117.
73. Bosma PJ, Chowdhury JR, Gantla BC, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. *N Engl J Med* 1995;333:1171-1175.
74. Persico P, Persico E, Bakker C, et al.: Hyperbilirubinemia in subjects with Gilbert syndrome (GS) mutations is determined by the rate of hepatic uptake of organic anions. *Hepatology* 1999;30:SOLA.
75. Thomsen HF, Hardt F, Juhl E. Diagnosis of Gilbert's Syndrome. *Scand J Gastroent* 1981;16:699-703. 76. Barrett PVD: Bilirubinemia and fasting. *N Engl J Med* 1970;283:823.
77. Dufour, DR: Effects of food ingestion on routine laboratory tests. *Clin Chem* 1998;44:136.
78. Carmel R, Wong ET, Weiner JM, Johson CS. Racial differences in serum total bilirubin levels in health and in disease (pernicious anemia). *JAMA* 1985;253:3416-3418.
79. Ihara H, Shino Y, Hashizume N, et al. Effect of light on total and direct bilirubin by an enzymatic bilirubin oxidase method. *J Anal Bio Sci* 1997;20:349-354.
80. Doumas BT, Wu T W, Jendrzeczak: Delta bilirubin: absorption spectra, molar absorptivity, and reactivity in the diazo reaction. *Clin Chem* 1987;33:769-774.
81. Doumas BT, Wu T W. The measurement of bilirubin fractions in serum. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1991;28:415-446.
82. Kubasik NP, Mayer TK, Bhaskar AG, Sine HE, D'Souza JP: The measurement of fractionated bilirubin by Ektachem film slides - method validation and comparison of conjugated bilirubin measurements with direct bilirubin in obstructive and hepatocellular jaundice. *Am J Clin Pathol* 1985;84:518-523.

83. Dumas BT, Peters T: Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clin Chim Acta* 1997;258:3-20.
84. Dufour, DR: Gender related differences in liver function and integrity tests. *Clin Chem* 1998;44:137.
85. McGinlay JM, Payne RB: Serum albumin by dye-binding: bromeresol green or bromocresol purple? *Ann Clin Biochem* 1988;25:417-421.
86. Beyer C, Boekhout M, van Iperen H: Bromocresol purple dye-binding and immunoturbidimetry for albumin measurement in plasma or serum of patients with renal failure. *Clin Chem* 1994;40:844-845.
87. Bush V, Reed RG: Bromeresol purple dye-binding methods underestimate albumin that is carrying covalently bound bilirubin. *Clin Chem* 1987;33:821-823.
88. Pascucci MW, Grisley DW, Rand RN: Electroimmunoassay of albumin in human serum: accuracy and long-term precision. *Clin Chem* 1983;29:1787-1790.
89. Ts'ao C, Swedlund J, Neofotistos D: Implications of use of low international sensitivity index thromboplastins in prothrombin time testing. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:1183-1187.
90. Taberner DA, Poller L, Thomson JM, Darby KV: Effect of international sensitivity index (ISI) of thromboplastins on precision of international normalised ratios (INR). *J Clin Pathol* 1989;42:92-96.
91. Kovacs MJ, Wong A, MacKinnon K, et al.: Assessment of the validity of the INR system for patients with liver impairment. *Thromb Haemost* 1994;71:727-730.
92. Robert A, Chazouilleres O: Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or International Normalized Ratio? *Hepatology* 1996;24:1392-1394.
93. Blanchard RA, Furie BC, Jorgensen M, Kruger SF, Furie B: Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Engl J Med* 1981;305:242-248.
94. Dufour, DR, Teot, L: Laboratory identification of ischemic hepatitis (shock liver). *Clin Chem* 1988;34:1287.
95. Fuchs S, Bogomolski-Yahalom V, Paltiel O, Ackerman Z: Ischemic hepatitis: clinical and laboratory observations of 34 patients. *J Clin Gastroenterol* 1998;26:183-186.
96. Singer AJ, Carracio TR, Mofenson HC: The temporal profile of increased transaminase levels in patients with acetaminophen-induced liver dysfunction. *Ann Emerg Med* 1995;26:49-53.
97. Willner IR, Uhl MD, Howard SC, Williams EQ, Riely CA, Waters B: Serious hepatitis A: an analysis of patients hospitalized during an epidemic in the United States. *Ann Intern Med* 1998;128:111-114.
98. Mendenhall CL and the VA Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Alcoholic hepatitis. *Clin Gastroenterol* 1981;10:417-441.
99. O'Grady JG, Alexander GJM, Hayllar KM, Williams R: Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989;97:4439-4445.
100. Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL: Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1302-1304.
101. Baglin T, Luddington R: Reliability of delayed INR determination: implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br. J. Haematol* 1997;96:431-434.
102. Adcock DM, Kressen DC, Marlar RA: Effect of 3.2% vs. 3.8% sodium citrate on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997;107:105-110.

103. Cunningham MTA, Johnson GF, Pennell BJ, Olson JD: The reliability of manufacturer-determined, instrument specific international sensitivity index values for calculating the international normalized ratio. *Am J Clin Pathol* 1994;102:128-133.
104. Stevenson KJ, Craig S, Dufty JMK, Taberner DA: System ISI calibration: a universally applicable scheme is possible only when coumarin plasma calibrants are used. *Br J Haematol* 1997;96:435-441.
105. Lassen JF, Kjeldsen J, Antonsen S, Petersen PH, Brandslund I: Interpretation of serial measurements of international normalized ratio for prothrombin times in monitoring oral anticoagulant therapy. *Clin Chem* 1995;41:1171-1176.
106. Poller L: Screening INR deviation of local prothrombin time systems. *J Clin Pathol* 1998;51:356-359.
107. Johnson M, Brigder M: A cross-Canada survey of prothrombin time testing - does the establishment of local ISI values improve the accuracy of International Normalized Ratio reporting? *Am J Clin Pathol* 1998;110:683-690.
108. Miyaji H, Ito S, Azuma T, et al.: Effects of *Helicobacter pylori* eradication therapy on hyperammonemia in patients with liver cirrhosis. *Gut* 1997;40:726-730.
110. Batshaw ML: Inborn errors of urea synthesis. *Ann Neurol* 1994;35:133-141.
111. Heubi JE, Daugherty CC, Partin JS, Partin JC, Schubert WK: Grade 1 Reye's syndrome - outcome and predictors of progression to deeper coma grades. *N Engl J Med* 1984;311:1539-1542.
112. Stahl J: Studies of the blood ammonia in liver disease - its diagnostic, prognostic, and therapeutic significance. *Ann Intern Med* 1963;58:1-23.
113. Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP: Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 1987;6:1-12.
114. Muting D, Kalk JF, Fischer R, Wuzel H, Reikowski J: Hepatic detoxification and hepatic function in chronic active hepatitis with and without cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1988;33:41-46.
115. McClain CJ, Zieve L, Doizaki WM, Gilberstadt S, Onstad GR: Blood methanetriol in alcoholic liver disease with and without hepatic encephalopathy. *Gut* 1980;21:318-323.
116. Jones EA, Basile AS: The involvement of ammonia with the mechanisms that enhance GABA-ergic neurotransmission in hepatic failure. *Adv Exp Med Biol* 1997;420:75-83.
117. Norenberg MD, Itzhak Y, Bender AS: The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. *Adv Exp Med Biol* 1997;420:95-111.
118. Chamuleau RAFM, Vogels BAPM: Hyperammonemia without portal systemic shunting does not resemble hepatic encephalopathy. *Adv Exp Med Biol* 1997;420:173-183.
119. Diaz J, Tornel PL, Martinez P: Reference intervals for blood ammonia in healthy subjects, determined by microdiffusion. *Clin Chem* 1995;41:1048.
120. Huizenga JR, Tangerman A, Gips CH: Determination of blood ammonia in biological fluids. *Ann Clin Biochem* 1994;31:529-543.
121. Derave W, Bouckaert J, Pannier JL: Gender differences in blood ammonia response during exercise. *Arch Physiol Biochem* 1997;105:203-209.
122. da Fonseca-Wollheim F: Preanalytical increase of ammonia in blood specimens from healthy subjects. *Clin Chem* 1990;36:1483-1487.
123. Davies SM, Szabo E, Wagner JE, Ramsay NK, Weisdorf DJ: Idiopathic hyperammonemia: a frequently lethal complication of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:1119-1125.
124. Xu SR, Yao EG, Dong ZR, et al.: Plasma ammonia in patients with acute leukemia. *Chin Med J* 1992;105:713-716.

125. Altunbasak S, Baytok V, Tasouji M, Herguner O, Burgut R, Kayrine L: Asymptomatic hyperammonemia in children treated with valproic acid. *J Child Neurol* 1997;12:461-463.
126. Shepard RL, Kraus SE, Babayan RK, Sirosky MB: The role of ammonia toxicity in the post trans-urethral prostatectomy syndrome. *Br J Urol* 1987;60:349-351.
127. Ammonia. College of American Pathologists, 325 Waukegan Road, Northfield, IL 60093, Chemistry Survey Set C-B, 1999,73. 128. Stapleton JT: Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1995;175(Suppl 1):S9-S 14.
129. Skinhoj P, Mikkelsen F, Hollinger FB: Hepatitis A in Greenland: importance of specific antibody testing in epidemiologic surveillance. *Am J Epidemiol* 1977;105:140-147.
130. Koff RS: Seroepidemiology of hepatitis A in the United States. *J Infect Dis* 1995;171(Suppl 1):S19-S23.
131. Goubau P, Gan Gerven V, Safary A: Effect of virus strain and antigen dose on immunogenicity and reactogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1):S 114-S 118.
132. Totos G, Gizaris V, Papaevangelou G: Hepatitis A vaccine: persistence of antibodies 5 years after the first vaccination. *Vaccine* 1997;15:1252-1253.
133. Hollinger FB, Dreesman GR: Hepatitis viruses. In Rose NR, de Maçario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds.): Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th ed. Washington DC, American Society for Microbiology, 1997
134. Lemon SM, Gates NL, Simms TE, Bancroft WH: IgM antibody to hepatitis B core antigen as a diagnostic parameter of acute infection with hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1981;143:803-809.
135. Czaja AJ, Shiels MT, Taswell HF, Wood JR, Ludwig J, Chase RC: Frequency and significance of immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in corticosteroid-treated severe chronic active hepatitis B. *Mayo Clin Proc* 1988;63:119-125.
136. Seeff LB, Beebe GW, Hoofnagle JH, et al.: A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *N Engl J Med* 1987;316:965-970.
137. Silva AE, McMahon BJ, Parkinson AJ, Sjogren MH, Hoofnagle JH, DeBisceglie AM: Hepatitis B virus DNA in persons with isolated anti body to hepatitis B core antigen who subsequently received hepatitis B vaccine. *Clin Infect Dis* 1998;26:895-897.
138. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Grenzia G, Orlando ME, Raimondo G: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-26.
139. McMahon BJ, Parkinson AJ, Helminiak C, et al.: Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1992;103:590-594.
140. Aoki SK, Finegold D, Kuramoto IK, et al.: Significance of antibody to hepatitis B core antigen in blood donors as determined by their serologic response to hepatitis B vaccine. *Transfusion* 1993;33:362-367.
141. Foutch PG, Carey WD, Tabor E, et al.: Concomitant hepatitis B surface antigen and antibody in thirteen patients. *Ann Intern Med* 1983;99:460-463.
142. Chernesky MA, Gretch D, Mushahwar IK, Swenson PD, Yarbough PO: Cumitech 18A. Laboratory diagnosis of the hepatitis viruses. Coordinating ed. S. Young. Washington DC, American Society for Microbiology, 1998.
143. Hollinger FB, Dienstag JL: Hepatitis B and D Viruses. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 7th Ed. Washington DC, ASM Press, 1999.
144. Hollinger FB, Liang TJ: Hepatitis B virus. In Fields BN, Knipe DM, Hawley PM (eds.): Fields Virology, 4th Edition. Philadelphia, Lippincott-Raven, 2000.

145. Yostuyanagi H, Yasuda K, Iino S, et al.: Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998;27:1377-1382.
146. Lorient MA, Marcellin P, Walker F, et al.: Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg. *J Hepatol* 1997;27:251-258.
147. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, et al.: Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000;31:488-495.
148. Aoyagi K, Ohue C, Iida K, et al.: Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999;37:1802-1808.
149. Alter HJ: New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;15:340-353.
150. Lu RH, Hwang SJ, Chan CY, Chang FY, Lee SD: Quantitative measurement of serum HCV-RNA in patients with chronic hepatitis C: comparison between Amplicor HCV monitor system and branched DNA signal amplification assay. *J Clin Lab Anal* 1998;12:121-125.
151. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, et al.: Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang* 1995;68:15-18.
152. Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, et al.: Persistent hepatitis C viremia after acute self-limited posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1995;21:639-644.
153. Seeff LB, the NHLBI Study Group: Mortality and morbidity of transfusion-associated non-A, non-B hepatitis and type C hepatitis: and NHLBI multi-center study. *Hepatology* 1994;20:204A.
154. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U: Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1 b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 2000;32:91-96.
155. Mast AF, Hwang L-Y, Seto D, Nolte FS, Kelly MG, Alter MJ: Perinatal hepatitis C virus transmission: maternal risk factors and optimal timing of diagnosis. *Hepatology* 1999;30:499A.
156. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, Ades AE, Hall AJ: Use of polymerase chain reaction and antibody tests in the diagnosis of vertically transmitted hepatitis C virus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997;16:711-719.
157. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL: Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999;29:908-914.
158. Pawlotsky J-M, Lonjon I, Hezode C, et al.: What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998;27:1700-1702.
158. Ravaggi A, Biasin MR, Infantolino D, Cariani E: Comparison of competitive and non-competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA. *J Virol Methods* 1997;65A:123-129.
159. Lunel F, Cresta P, Vitour D, et al.: Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA, and Monitor assays. *Hepatology* 1999;29:528-535.
160. Davis GL, Lau JY, Urdea MS, et al.: Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification assay: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology* 1994;19:1337-41.
161. Saldanha J, Lelie N, Heath A: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology assays for HCV RNA. *Vox Sanguinis* 1999;76:149-158.
162. Bukh J, Miller RH, Purcell RH: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995;15:41-63.
163. Reddy KR, Hoofnagle JH, Tong MJ, et al.: Racial differences in response to therapy with interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30:787-893.

164. Forns X, Bukh J: Methods for determining the hepatitis C virus genotype. *Viral Hepatitis* 1998;4: 1-19.
165. Germer JJ, Rys PH, Thorvilson JN, Pershing DH: Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 1999;37:2625-2630.
166. Marshall DJ, Heisler LM, Lyamichev V, et al.: Determination of hepatitis C virus genotype in the United States by cleavage fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:3156-3162.
167. Pawlowsky JM, Prescott L, Simmonds P, et al.: Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:1734-1739.
168. Lau JY, Mizokami M, Kolberg JA, et al.: Application of six hepatitis C genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J Infect Dis* 1995;171:282-289.
169. Rizetto M, Ponzetto A, Forzani I: Epidemiology of hepatitis delta virus: overview. *Prog Clin Biol Res* 1991;364:1-20.
170. Erker JC, Dessai SM, Schlauder GG, Dawson GJ, Mushawar IK: A hepatitis E variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *J Gen Virol* 1999;80:681-690.
171. Yarbrough, PO, Tam AW, Gabor K, et al.: Assay development of diagnostic tests for hepatitis E. In Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds.): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Japan, Springer-Verlag, 1994.
172. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH: Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology* 1998;27:857-861.
173. Thomas DL, Yarbough PO, Vlahov D, et al.: Seroreactivity to hepatitis E virus in areas where the disease is not endemic. *J Clin Microbiol* 1997;35:1244-1247.
174. Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM: Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree. *Am J Clin Pathol* 1978;70:248-258.
175. Rozen P, Korn RJ, Zimmerman HJ: Computer analysis of liver function tests and their interrelationship in 347 cases of viral hepatitis. *Isr J Med Sci* 1970;6:67-79.
- 175a. Hepatitis Surveillance Report No. 56. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1995, 36p.
176. Whitehead MW, Hawkes ND, Hainsworth I, Kingham JGC: A prospective study of the causes of notably raised aspartate aminotransferase of liver origin. *Gut* 1999;45:129-133.
177. Anciaux ML, Pelletier AG, Attali P, Meduri B, Liguory C, Etienne JP: Prospective study of clinical and biochemical features of symptomatic choledocholithiasis. *Dig Dis Sci* 1986;31:449-453.
178. Fortson WC, Tedesco FJ, Starnes EC, Shaw CT: Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. *J Clin Gastroenterol* 1985;7:502-505.
179. Mihas AA, Doos WG, Spenny JG: Alcoholic hepatitis - a clinical and pathological study of 142 cases. *J Chronic Dis* 1978;31:461-472.
180. Goldberg S, Mendenhall C, Anderson S, et al.: VA Cooperative Study on Alcoholic Hepatitis. IV. The significance of clinically mild alcoholic hepatitis - describing the population with minimal hyperbilirubinemia. *Am J Gastroenterol* 1986;81:1029-1034.
181. Stewart JS, Farrow LJ, Clifford RE, et al.: A three-year survey of viral hepatitis in West London. *Q J Med* 1978;47:365-84.
182. Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW: Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol* 1985;122:226-233.

183. Gitlin N: Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clin Chem* 1997;43:1500-1506.
184. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, et al.: Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis* 1985;151:599-603.
185. Hoofnagle JH: Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(Suppl 1):155-20S.
186. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum VA Cooperative study of post-transfusion hepatitis, 1969-1974: incidence and characteristics of hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-362.
187. Borsch G, Baier J, Glocke M, Nathusius W, Gerhardt W: Graphical analysis of laboratory data in the differential diagnosis of cholestasis: a computer-assisted prospective study. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988;26:509-519.
188. Kenny-Walsh E, for the Irish Hepatology Research Group: Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *N Engl J Med* 1999;340:1228-1233.
189. Vogt M, Lang T, Frosner G, et al.: Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood donor screening. *N Engl J Med* 1999;341:866-870.
190. Gitlin N, Serio KM: Ischemic hepatitis: widening horizons. *Am J Gastroenterol* 1992;87:831-836.
191. Tygstrup N, Ranek L: Assessment of prognosis in fulminant hepatic failure. *Semin Liv Dis* 1986;6:129-137.
192. Harrison PM, O'Grady JG, Keays RT, Alexander GJ, Williams R: Serial prothrombin time as prognostic indicator in paracetamol induced fulminant hepatic failure. *BMJ* 1990;301:964-968.
193. Noskin GA: Prevention, diagnosis, and management of viral hepatitis: a guide for primary care physicians. *Arch Fam Med* 1995;4:923-934.
194. Lemon SM, Brown CD, Brooks DS, Simms TE, Bancroft WH: Specific immunoglobulin M response to hepatitis A virus determined by solid phase radioimmunoassay. *Infect Immun* 1980;28:927-936.
195. Gretch DR, dela Rosa C, Carithers RL, Wilson RA, Williams B, Corey L: Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Intern Med* 1995;123:3211-329.
196. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al.: The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
197. London WT, Evans AA: The epidemiology of hepatitis viruses B, C, and D. *Clin Lab Med* 1996;16:251-171.
198. Zimmerman HJ: *Hepatotoxicology: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver*, 2nd Edition. Philadelphia: J. B. Lippincot, 1999.
199. Fry SW, Seeff LB: Hepatotoxicity of analgesics and antiinflammatory agents. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24:875-905.
200. Zimmerman HJ, Maddrey WC: Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology* 1995;22:767-773.
- 200a. Johnson RD, O'Connor ML, Kerr RM: Extreme serum elevations of aspartate aminotransferase. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1244-1245.
201. Shilsky ML: Wilson disease: genetic basis of copper toxicity and natural history. *Semin Liv Dis* 1996;16:83-95.
202. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, et al.: Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997;113:212-218.

203. Berman DH, Leventhal RI, Gavalier JS, Cadoff EM, Van Thiel DH: Clinical differentiation of fulminant Wilsonian hepatitis from other causes of hepatic failure. *Gastroenterology* 1991;100:1129-1134.
204. Crapper RM, Bhathal PS, Mackay IR, Frazer IH: "Acute" autoimmune hepatitis. *Digestion* 1986;34:216-225.
205. Amontree JS, Stuart TD, Bredfeldt JE: Autoimmune chronic active hepatitis masquerading as acute hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 1989;11:303-307.
206. Johnson PJ, McFarlane IG, Alvarez F, et al.: Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993;18:998-1008.
207. Horwitz CA, Burke MD, Grimes P, Tombers J: Hepatic function in mononucleosis induced by Epstein-Barr virus and cytomegalovirus. *Clin Chem* 1980;26:243-246.
208. Liaw YF, Chu CM, Su IJ, Huang MJ, Lin DY, Chang-Chien CS: Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology* 1983;84:216-219.
209. Yuki N, Hayashi N, Moribe T, et al.: Relation of disease activity during chronic hepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. *Hepatology* 1997;25:439-444.
210. Tong MJ, el-Farra NS, Crew MI: Clinical manifestations of hepatitis A. Recent experience in a community teaching hospital. *J Infect Dis* 1995;171 Suppl 1:S 15-S 18.
211. Inglesby TV, Rai R, Astemborski J, et al.: A prospective community-based evaluation of liver enzymes in individuals with hepatitis C after drug use. *Hepatology* 1999;29:590-596.
212. de Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, et al.: The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 1993;118:191-4.
213. Weiss JS, Gautman A, Lauff JJ, et al.: The clinical importance of a protein-bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 1983;309:147-150.
214. Van Hooft P, Fevery J, Blanckaert N: Serum bilirubins in hepatobiliary disease: comparison with other liver function tests and changes in the postobstructive period. *Hepatology* 1985;5:112-117.
215. Gordon SC, Reddy KR, Schiff L, Schiff ER: Prolonged intrahepatic cholestasis secondary to acute hepatitis A. *Ann Intern Med* 1984;101:635-637.
216. Van Ness MM, Diehl AM: Is liver biopsy useful in the evaluation of patients with chronically elevated liver enzymes? *Ann Intern Med* 1989;111:473-478.
217. Mathurin P, Moussali J, Cadranet J-F, et al.: Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase activity. *Hepatology* 1998;27:568-572.
218. Centers for Disease Control and Prevention: Recommendations for the prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV related chronic disease. *MMWR* 1998;47(No.RR-19), 1-39.
219. Quinn PG, Johnston DE: Detection of chronic liver disease: costs and benefits. *Gastroenterologist* 1997;5:58-77.
220. Sheth SG, Glamm SL, Gordon FD, Chopra S: AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998;93:44-48.
221. Hultcrantz R, Glaumann H, Lindberg G, Nilsson LH: Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. *Scand J Gastroenterol* 1986;21:109-113.
222. Friedman LS, Dienstag JL, Watkins E, et al.: Evaluation of blood donors with elevated serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 1987;107:137-144.

223. Kundrotas LW, Clement DJ: Serum alanine aminotransferase (ALT) elevation in asymptomatic US Air Force basic trainee blood donors. *Dig Dis Sci* 1993;38:2145-2150.
224. de Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, et al.: The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 1993;118:191-4.
225. McMahon BJ, Christensen C, Gretch D, et al.: Alanine aminotransferase (ALT) levels over time in anti-HCV-positive persons who are HCV RNA positive compared with persons who are HCV RNA negative but RIBA positive. *Hepatology* 1999;30:358A.
226. Cauza E, Maier-Dobersberger T, Polli C, Kaserer K, Kramer L, Ferenci P: Screening for Wilson's disease in patients with liver diseases by serum ceruloplasmin. *J Hepatol* 1997;27:358-362.
227. Mathiesen UL, Franzen LE, Fryden A, Foberg U, Bodemar G: The clinical significance of slightly to moderately increased liver transaminase values in asymptomatic patients. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:85-91.
228. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S: Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997;126:137-145.
229. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CJ, Neuschwander-Tetri BA: Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-1109.
230. Palmer M, Schaffner F: Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 1990;99:1408-1413.
231. McLaren CE, Gordeuk VR, Looker AC, et al.: Prevalence of heterozygotes for hemochromatosis in the white population of the United States. *Blood* 1995;86:2021-2027.
232. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al.: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996;13:399-408.
233. Milman N, Albeck MJ: Distinction between homozygous and heterozygous subjects with hereditary haemochromatosis using iron status markers and receiver operating characteristic (ROC) analysis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:95-98.
234. Witte DL: Mild liver enzyme abnormalities: eliminating hemochromatosis as cause. *Clin Chem* 1997;53:1535-1538.
235. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW: A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999;341:718-724.
236. Adams PC, Kertesz AE, McLaren CE, Barr R, Bamford A, Chakrabarti S: Population screening for hemochromatosis: a comparison of unbound iron binding capacity, transferrin saturation, and C282Y genotyping in 5,211 blood donors. *Hepatology* 2000;31:1160-1164.
237. Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH: Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 1999;116:193-207.
238. Witte DL, Crosby WH, Edwards CQ, Fairbanks VG, Mitros FA: Practice guideline development task force of the College of American Pathologists. Hereditary hemochromatosis. *Clin Chim Acta* 1996;245:139-200.
239. Adams PC, Gregor JC, Kertesz AE, Valberg LS: Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model based on a 30-year database. *Gastroenterology* 1995;109:177-188.
240. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW: The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATP-ase similar to the Menkes gene. *Nature Genet* 1993;5:327-337.
241. Gibbs K, Walshe JM: A study of the caeruloplasmic concentrations found in 75 patients with Wilson's disease, their kindreds, and various control groups. *Q J Med* 1979;48:447-463.
242. Dufour J-F, Kaplan MM: Muddying the water: Wilson's disease challenges will not soon disappear. *Gastroenterology* 1997;113:348-350.

243. Czaja AJ, Carpenter HA, Manns MP: Antibodies to soluble liver antigen, P450I15, and mitochondrial complexes in chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1993;105:1522-1528.
244. Czaja AJ: Autoimmune hepatitis: evolving concepts and treatment strategies. *Dig Dis Sci* 1995;40:435-456.
245. Czaja AJ, Magrin S, Fabiano C, et al.: Hepatitis C virus infection as a determinant of behavior in type I autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40:33-40.
246. Czaja AJ, Taswell HF, Rakela J, Rabe D: Duration and specificity of antibodies to hepatitis C virus in chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1992;102: 1 675-1679.
247. Neuberger J: Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1997;350:875-879.
248. Yeaman SJ, Fussey SPM, Danner DJ, James OFW, Mutimer DJ, Bassendine MF: Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet* 1988;I:1067-1070.
249. Chazouilleres O, Wendum d, Serfaty L, Montembault S, Rosmordue O, Poupon R: Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy. *Hepatology* 1998;28:296-301.
250. Lohse AW, Meyer zum Buschenfelde K-H, Franz B, Kanzler S, Gerken G, Dienes H-P: Characterization of the overlap syndrome of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis: evidence for it being a hepatitis form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 1999;29:1078-1084.
251. Ponsioen CI, Tytgat GN: Primary sclerosing cholangitis: a clinical review. *Am J Gastroenterol* 1998;93:515-523.
252. Mudder AHL, Horst G, Haagsma EB, et al.: Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 1993;17:411-417.
253. Chapman RW, Cottone M, Selby WS, et al.: Serum autoantibodies, ulcerative colitis, and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1986;27:86-91.
254. Roozendaal C, Van Milligen de Wit M, Haagsma EB, et al.: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis: defined specificities may be associated with distinct clinical features. *Am J Med* 1998;105:393-399.
255. Carell RW, Jeppson JQ, Laurell CB: Structure and variation of human alpha-1-antitrypsin. *Nature* 1982;298:239-334.
256. Propst T, Propst A, Dietze O, Judmaier G, Braunsteiner H, Vogel W: Alpha-1-antitrypsin deficiency and liver disease. *Dig Dis* 1994;12:139-149.
257. Sveger T: The natural history of liver disease in alpha-1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:847-851.
258. Graziadel IW, Joseph JJ, Wiesner RH, Therneau TM, Batts KP, Porayko MK: Increased risk of chronic liver failure in adults with heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* 1998;28:1058-1063.
259. Fisher RL, Taylor L, Sherlock S: alpha-1-antitrypsin deficiency in liver disease: the extent of the problem. *Gastroenterology* 1976;71:646-651.
260. Propst T, Propst A, Dietze O, Judmaier G, Braunsteiner H, Vogel W: High prevalence of viral infection in adults with homozygous and heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency and chronic liver disease. *Ann Intern Med* 1992;117:641-645.
261. Hodges JR, Millward-Sadler GH, Baarbats C, Wright R: Heterozygous MZ alpha-1-antitrypsin deficiency in adults with chronic active hepatitis and cryptogenic cirrhosis. *N Engl J Med* 1981;304:557-560.
262. Linnen J, Wages J, Zhang-Keck Z, Fryk KE, Krawczynsky KZ, Aher H: Molecular clone in disease association of hepatitis G virus. A transmissible agent. *Science* 1996;271:505-508.

263. Brandhagen DJ, Gross JB, Poterucha JJ, et al.: The clinical significance of simultaneous infection with hepatitis G virus in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1000-1005.
264. Hollingsworth RC, Minton EJ, Fraser-Moodie C, et al.: Hepatitis G infection: role in cryptogenic liver disease and primary liver cancer in the UK. Trent hepatitis C virus study group. *J Viral Hepat* 1998;4:165-169.
265. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J: Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J Virol* 1997;71:7804-7806.
266. Nishizawa AT, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M: A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-97.
267. Charlton M, Adjei P, Poterucha J, et al.: TT virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:839-842.
268. Matsumoto A, Yeo AET, Shih JWK, Tanaka E, Kiyosawa K, Alter HJ: Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* 1999;30:283-288.
269. Kanda T, Yokosuka O, Ikeuchi T, et al.: The role of TT virus infection in acute hepatitis. *Hepatology* 1999;29:1905-1908.
270. Alter HJ, Conry-Cantilena C, Melpolder J, et al.: Hepatitis C in asymptomatic blood donors. *Hepatology* 1997;26(Suppl 1):295-33S. 270. Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Jones EA, Waggoner JG, Bales ZB: Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1981;94:744-748.
271. Brown SD, Barbara AJ, Lambert T, Wilson DV: Spontaneous loss of HBeAg and development of anti-HBe during long-term follow-up of blood donors found to be HBsAg positive. *Br J Biomed Sci* 1995;52:106-109.
272. Lok AS, Ghany MG, Watson G, Ayola B: Predictive value of aminotransferase and hepatitis B virus DNA levels on response to interferon therapy for chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 1998;5:171-178.
273. Bernard F, Raymond G, Willems B, Villeneuve JP: Quantitative assessment of serum hepatitis B e antigen, IgM hepatitis B core antibody and HBV DNA in monitoring the response to treatment in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 1997;4:265-272.
274. Dienstag JL, Perillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M: A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995;333:1704-1705.
275. Shobokshi OA, Serebour FE, Skakni L: Hepatitis B surface gene mutants and their emerging role in the efficacy of HBV vaccination programs. *Ann Saudi Med* 1999;19:87-92.
276. Lorient MA, Marcellin P, Walker F, et al.: Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg. *J Hepatol* 1997;27:251-258.
277. Omata M: Treatment of chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1998;339:114-115.
278. Lai C-L, Chien R-N, Leung NWY, Chang T T, Guan R, Tai D-I, et al.: A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998;339:61-68.
279. Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, et al.: Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 1996;3:75-78.
281. Fanning L: Natural fluctuations of hepatitis C viral load in a homogeneous patient population: a prospective study. *Hepatology* 2000;31:225-229.
282. Pontisso P, Bellati G, Brunetto M, et al.: Hepatitis C virus profiles in chronically infected individuals: do they relate to disease activity? *Hepatology* 1999;29:585-589.

283. Beld M, Penning M, McMorro M, Gorgels J, van den Hoek A, Goudsmit J: Different hepatitis C virus (HCV) RNA load profiles following seroconversion among injecting drug users without correlation with HCV genotype and serum alanine aminotransferase levels. *J Clin Microbiol* 1998;36:872-877.
284. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al.: Interferon alfa-2b or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998;339:1485-1492.
285. Poynard T, Marcellin S, Lee SS, et al.: Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-1432.
286. Poynard T, McHutchison J, Goodman Z, Ling M-H, Albrecht J for the ALGOVIRC Project Group: Is an "A la Carte" combination interferon alfa-2b plus ribavirin regimen possible for first line treatment in patients with chronic hepatitis C? *Hepatology* 2000;31:211-218.
287. Camma C, Giunta M, Pinzello G, Morabito A, Verderio P, Pagliaro L: Chronic hepatitis C and interferon alpha: conventional and cumulative meta-analyses of randomized clinical trials. *Am J Gastroenterol* 1999;94:581-595.
288. Management of Hepatitis C. NIH Consensus Statement 1997 Mar 24-26: 15(3):1-41.
289. Consensus Statement: EASL international consensus conference on hepatitis C. *J Hepatol* 1999;30:956-961.
290. Haber MM, West AB, Haber AD, Reuben A: Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1250-1257.
291. McCormick SE, Goodman ZD, Maydonovitch CL, Sjogren MH: Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1516-1522.
292. Poynard T, Bedossa P, Opolon P: Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825-832.
293. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, et al.: Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-1616. 294. Trinchet J-C: Clinical use of serum markers of fibrosis in chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(Suppl 2):89-95.
295. Schmidt E, Schmidt FW: Progress in the enzyme diagnosis of liver disease: reality or illusion. *Clin Biochem* 1990;23:375-283.
296. Goldstein NS, Blue DE, Hankin R, et al.: Serum α -fetoprotein levels in patients with chronic hepatitis C - relationship with serum alanine aminotransferase values, histologic activity index, and hepatocyte MIB-1 scores. *Am J Clin Pathol* 1999;111:811-816.
297. Bayati N, Silverman AL, Gordon SC: Serum alpha-fetoprotein levels and liver histology in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2452-2456.
298. Bosch FX, Ribes J, Borrás J: The epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liv Dis* 1999;19:271-285.
299. El-Serag HB, Mason AC: Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-750.
300. Fattovich F, Giustina G, Schalm SW, et al.: Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. *Hepatology* 1995;21:77-82.
301. Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al.: Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463-472.
302. Zaman SN, Johnson PJ, Williams R: Silent cirrhosis in patients with hepatocellular carcinoma. Implications for screening in high-incidence and low-incidence areas. *Cancer* 1990;65:1607-1610.

303. Izzo F, Cremona F, Ruffolo F, Palaia R, Parisi V, Curley SA: Outcome of 67 patients with hepatocellular carcinoma detected during screening or 1125 patients with chronic hepatitis. *Ann Surg* 1998;227:513-518.
304. Chalasani N, Said A, Ness R, Hoen H, Lumeng L: Screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis in the United States: Results of a national survey. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2224-2229.
305. Tong MJ, Blatt LM, Kao VW: Screening and surveillance of chronic viral hepatitis patients for hepatocellular carcinoma: a seven year study using serum alfa-fetalprotein and abdominal ultrasound. *Hepatology* 1999;30:209A.
306. Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH: Elevations in serum alpha-fetoprotein in patients with chronic hepatitis B. *Cancer* 1989;64:2117-2110.
307. McMahon BJ, London T: Workshop on screening for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:916-919.
308. Riegler JL: Preneoplastic conditions of the liver. *Sem Gastrointest Dis* 1996;7:74-87.
309. Pateron D, Ganne N, Trinchet JC, et al.: Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1995;22:708-709.
310. Cottone M, Turri M, Caltagirone M, et al.: Screening for hepatocellular carcinoma in patients with Child's A cirrhosis: an 8 year prospective study by ultrasound and alphafetoprotein. *J Hepatol* 1994;21:1029-1034.
311. Oka H, Tamori A, Kuroki T, Kobayashi K, Yamamoto S: Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;19:61-66.
312. Sarasin FP, Giostra E, Hadengue A: Cost-effectiveness of screening for detection of small hepatocellular carcinoma in western patients with Child-Pugh class A cirrhosis. *Am J Med* 1996;101:422-434.
313. Collier J, Sherman M: Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27:273-278.
314. Sheu JC, Sung JL, Chen DS, et al.: Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Gastroenterology* 1983;89:259-266.
315. Fujiyama S, Morishita T, Hashiguchi O, Sato T: Plasma abnormal prothrombin (des- γ -carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1621-1628.
316. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, et al.: Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984;310:1427-1431.
317. Nomura F, Ishijima M, Kuwa K, Tanaka N, Nakai T, Ohnishi K: Serum des-gamma-carboxy prothrombin levels determined by a new generation of sensitive immunoassays in patients with small-sized hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999;94:650-654.
318. Shiraki K, Takase K, Tameda Y, et al.: A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Hepatology* 1995;22:802-807.
319. Lu Y, Lu Q, Chen HL: Diagnosis of primary liver cancer using lectin affinity chromatography of serum alkaline phosphatase. *Exp Clin Cancer Res* 1997;16:75-80.
320. Yao D-F, Huang Z-W, Chen S-Z, et al.: Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum γ -glutamyltransferase. *Am J Clin Pathol* 1998;110:743-749.

Dodatek

Podziękowania

Sponsorzy korporacyjni

Prace nad niniejszymi wytycznymi oraz ich publikacja dotowane były przez:

Abbott Diagnostics

Diasorin, Inc.

Bayer Corporation, Diagnostics Division (dawniej Chiron Diagnostics)

Innogenetics, Inc.

Ortho-Clinical Diagnostics.

Współpracownicy

Wymienione osoby zapoznały się z niniejszymi wytycznymi na różnych etapach ich powstawania i podzieliły się z autorami pomocnymi komentarzami oraz zaproponowały zmiany dotyczące tekstu: Miriam Alter, Henry C. Bodenheimer, Thomas D. Boyer, Max A. Chernesky, Gary L. Davis, Jean C. Edmond, Stuart C. Gordon, Norman D. Grace, Lawrence E. Kaplan, Jacob Korula, Karen Lindsay, Brian J. McMahon, James R. Spivey, Thomas A. Shaw-Stiffel i Myron Warshaw. Autorzy w szczególności pragną podziękować F. Blaine Hollinger oraz Donaldowi Jensenowi za wielokrotne przejrzanie rękopisów oraz za liczne cenne sugestie.

Poszczególne komentarze sformułowane zostały podczas otwartej dyskusji na w ramach spotkania AACC Annual Meeting przez następujące osoby: Ed Ashwood, Bill Brock, Thomas Burgess, Jack Goldberg, Ajit Golwkar, Neal Greenberg, Michael Heinz, Richard Horowitz, Graham Johns, Ronald Lee, Steve Lobell, Greg Post, Phil Rosenthal, Norbert Tietz, Mark Walter, Earl Weissman, William Winter i Jeffrey Young.

Publikacje NACB Laboratory Medicine Practice Guidelines

Recommendations for Use of Cardiac Markers in Coronary Artery Diseases

(Zalecenia dotyczące wykorzystania markerów kardiologicznych w chorobach tętnic wieńcowych)

Redakcja: Alan H.B. Wu, Fred S. Apple i Myron M. Warsaw

W ostatnich latach wraz z rozwojem nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych w praktyce kardiologicznej dokonały się znaczące zmiany. Markery kardiologiczne w dalszym ciągu odgrywają znaczącą rolę w diagnozowaniu i postępowaniu z pacjentami z ostrymi zespołami wieńcowymi. Omawiana monografia przedstawia zalecenia dotyczące wykorzystania markerów kardiologicznych w celu wykluczenia choroby wieńcowej na oddziałach przypadków nagłych, u pacjentów z bólem w obrębie klatki piersiowej oraz w diagnostyce i rokowaniu u pacjentów z niestabilną dusznicą bolesną i ostrym zawałem mięśnia sercowego. Przedstawiono również kryteria dotyczące ustalania stężeń odcięcia, precyzji testów oraz raportów dotyczących czasów trwania cykli, a także zalecenia odnośnie oznaczania markerów kardiologicznych za pomocą przyłóżkowych urządzeń diagnostycznych.

1999, 44 strony, miękka okładka, 20\$, nr produktu 510

Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring Services

(Wytyczne dotyczące usług monitorowania substancji leczniczych)

Redakcja: Ann Warner i Thomas Annesley

Wiele zaleceń zawartych w tej monografii ma na celu dostarczenie pracownikom naukowym laboratoriów klinicznych niezbędnych informacji pozwalających na rozwinięcie ważnych klinicznie, ekonomicznych usług monitorowania substancji leczniczych. Omówiono dziewięć klas leków pod względem użyteczności klinicznej oraz wskazań do ich monitorowania, celów stosowania; poruszono również kwestie dotyczące fazy przedanalizycznej oraz samej analizy. Przedstawiony materiał stanowi szeroką kompilację informacji, które zostały zrecenzowane przez ekspertów oraz przez specjalistów w ramach consensusu w Atlancie w lipcu 1997 roku.

1999, 110 stron, miękka okładka, 20\$, nr produktu 508

Inne publikacje LMPG

Guidelines for the Evaluation & Management of the Newborn Infant
(Wytyczne dotyczące oceny stanu oraz postępowania z noworodkami)

Redakcja: Lawrence A. Kaplan i Susan M. Tange

1998, 84 strony, miękka okładka, 20\$, nr produktu 501

Laboratory Support for the Diagnosis & Monitoring of Thyroid Disease
(Rola laboratorium w diagnozowaniu i monitorowaniu chorób tarczycy)

Redakcja: Lawrence A. Kaplan i Clark T. Sawin

1996, 64 strony, miękka okładka, 20\$, nr produktu 509

Laboratory Support in Assessing and Monitoring Nutritional Status
(Rola laboratorium w ocenie i monitorowaniu stanu odżywienia)

Redakcja: Lawrence A. Kaplan

1994, 28 stron, miękka okładka, 20\$, nr produktu 1175