

Вирусни хепатити А-Е: етиология и специфична диагностика

П. Теохаров*

Национален център по заразни и паразитни болести – София

Key words:

viral hepatitis,
hepatitis viruses A-E,
specific diagnosis

Ключови думи:

Вирусен хепатит,
хепатитни вируси
А-Е, специфична
диагностика

VIRAL HEPATITIS A-E: ETIOLOGY AND SPECIFIC DIAGNOSIS

P. Teoharov

National Reference Laboratory of Viral Hepatitis, National Centre of Infectious and Parasitic Diseases – Sofia

Summary. The five hepatotropic viruses with clinical significance in the countries throughout the world are as follows: hepatitis A virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), hepatitis D virus (HDV), and hepatitis E virus (HEV). Despite of similar clinical presentation these widespread viral pathogens differ substantially in their taxonomic, immunologic and epidemiologic characteristics, and the respective measures required to control and prevent their transmission vary greatly. Aiming at elucidation of current methods for specific diagnosis of viral hepatitis A, B, C, D and E a short review of laboratory tests and their interpretation is presented. The dynamics of different serologic markers during the course of infection and/or vaccination is outlined. The importance of routine and molecular methods (mostly PCR) for the early diagnosis of patients and especially for the purposes of surveillance and epidemiologic investigation (tracing of sources and routes of infection) of nosocomial hepatitis B and C is also discussed.

Пет хепатотропни вируса причиняват вирусен хепатит и те са обозначени с първите букви от латинската азбука, както следва: хепатитен А Вирус (HAV), хепатитен В Вирус (HBV), хепатитен С Вирус (HCV), хепатитен D Вирус (HDV) и хепатитен Е Вирус (HEV). Те са представители на различни вирусни семейства. Освен тях и други вируси, като цитомегаловирус (CMV) и Епщайн-Бар (EBV), макар и значително по-рядко, могат да предизвикат вирусен хепатит наред с основното заболяване, което причиняват. След 1995 г. са описани други вируси като хепатитен G Вирус (HGV), TTV Вирус, SEN Вируси и NV-F агент, но тяхната патогенност за хората не е доказана и

те не могат да се причислят към горепосочената група. Обсъжда се значението на рутинните и молекулярни методи (PCR) за ранната диагностика на пациентите, както и за надзора при вътрешболничното разпространение на хепатит В и С.

Предаване от пациент на пациент на вирусен хепатит А, В и С се установява в условията на здравната практика, както в развиващите се, така и в индустриализираните държави. В тези случаи предаването се осъществява чрез индиректен контакт, в резултат от неспазване на стандартните предпазни мерки при грижите за пациента и почти винаги се касае за нозокомиално разпространение на инфекцията, което е могло да бъде предотвратено [1, 32].

*Email: teoharov.pavel@gmail.com

В световен мащаб експозицията, свързана със здравните грижи, води до голям брой нови случаи на HBV и HCV инфекция. Според статистическите данни правилното приложение на правилата за безопасна инжекционна практика при честите и не винаги обосновани терапевтични процедури може да спести над 21 млн случаи на HBV инфекция и около 2 млн случаи на HCV инфекция ежегодно. Показателни са литературните данни за проучването на един голям взрив от HBV и HCV инфекция, възникнал в педиатрично онкологично отделение, както и в урологично отделение, при които се установява, че вътреболничното предаване на инфекцията се дължи на системни пропуски: неспазване на правилата за хигиена на ръцете и смяна на ръкавиците, както и употреба на многоразови флакони с физиологичен разтвор за промиване на интравенозните канюли и приготвяне на парентерални инфузии [1,2,32].

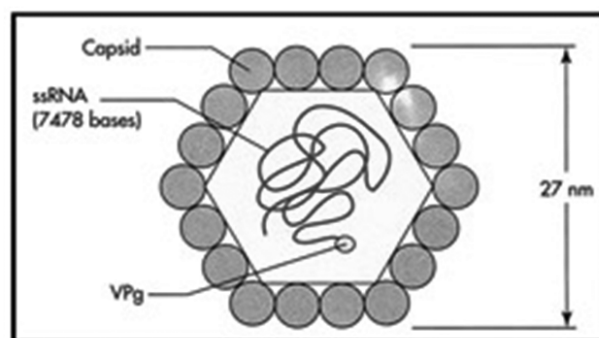
Етиология на вирусните хепатити А-Е

Петте хепатотропни вируса HAV, HBV, HDV, HCV, HEV са представители на пет различни вирусни семейства, като основно свързващо звено е техният тропизъм към черния дроб на човека, както и сходната, а в редица случаи и почти еднаква, клинична симптоматика, съобразно вида на инфекциозния процес (остър или хроничен).

Хепатитният А вирус е визуализиран едва през 1973 г. чрез електронна микроскопия, но още през 40-те години на XX-ти век е въведен терминът хепатит А, за да се характеризира описваният дотогава „инфекциозен“ хепатит за разлика от хепатит В, отнасящ се за т.нар. „серумен“ хепатит. Открояват се два начина на разпространение на тези вируси в човешката популация: парентерален за хепатит В и ентерален за хепатит А.

Хепатитният А вирус, съобразно генома, морфологията и молекулярната структура, е класифициран в семейство Picornaviridae, първоначално в рода Enterovirus, а впоследствие като отделен род Hepatovirus [11,12]. Независимо от редица сходни характеристики на HAV с останалите членове на семейство Picornaviridae, той се различава предимно по своите физико-химични и антигенни свойства, както и с по-слабата си

възможност за размножаване в клетъчни култури. Хепатитният А вирус има сферична форма с диаметър 27-28 nm (Фиг.1). Вирсионът се формира от три протеина, като вирусната популация се представя както от пълни, така и от празни (без РНК) частици. Имунодоминантните, неутрализиращи епитопи се намират на повърхността на вируса, предимно на структурните протеини VP1 и VP3. Геномът на HAV се състои от едновезрижна, линейна молекула РНК с големина 7.5 kb. Той се разделя на три части: некодиращ участък, обхващащ около 10% от генома, участък, кодиращ вирусните протеини, разделен на три и къс, некодиращ участък. Въпреки, че дължината на геномните участъци е подобна на тази при ентеровирусите, подредбата на нуклеотидните последователности при HAV се различава значително от тях [19,27,34]. Хепатит А вирусната инфекция е доброкачествена и в преобладаващия брой случаи, независимо от тежестта на клиничната картина, завършва с оздравяване [3,4].



Фиг.1. Схематична структура на HAV

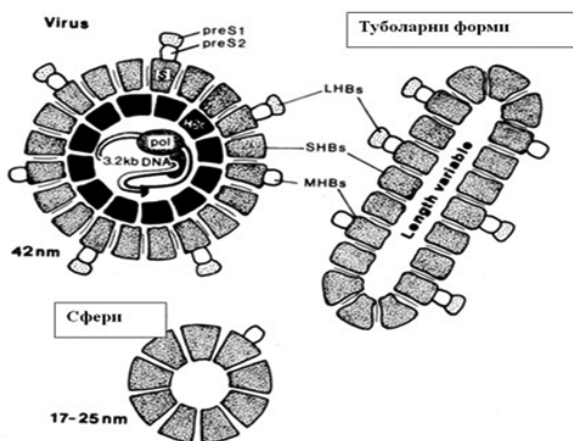
Хепатитният В вирус се обособява като отделен инфекциозен агент с откриването от Блумберг и кол. на т.нар. Австралийски антиген през 1965 г., който представлява повърхностната му обвивка. Малко по-късно е идентифициран целият вирион с големина 42 nm, наречен още частица на Дейн, по името на своя откривател.

Зрелият вирион на HBV е с големина 40-42 nm и се състои от липопротеинова обвивка и ядро (нуклеокапсид), съдържащо вирусната ДНК (Фиг. 2) [9,14]. Геномът на HBV представлява двойно верижна ДНК с големина 3.2 kb [22,40].

Има четири гена (S,C,P и X), кодиращи структурните и неструктурни белтъци на вируса. **Основна съставна част на обвивката на вируса е повърхностният антиген (HBsAg),** кодиран от S гена, който има три кодиращи региона – S, pre S1 и pre S2. Всеки участък от гена кодира протеини, съществуващи в гликозилирана и негликозилирана форма. И трите протеина – голям, среден и малък (L, M и S), участват във формирането на обвивката на вируса в различно съотношение, съобразно зрелостта на вирусната частичка [5,6]. **Нуклеокапсидът се формира от 180 копия на протеина HBcAg,** кодиран от C гена на HBV ДНК. Той представлява сферична структура с големина 27 nm, съдържаща вирусната ДНК. Същият ген кодира от pre-C участъка си **протеин, наречен HBe антиген (HBeAg),** който въпреки че е сходен по аминокиселинен състав с HBcAg, **не участва във формирането на вириона, но се открива при активна вирусна репликация.** Останалите два гена (P и X) от HBV ДНК кодират протеини, които не участват във формирането на вириона (неструктурни белтъци), като единият – Pol, има ензимна функция (полимеразна активност), а другият – X протеин, има регулаторна функция при вирусното размножение [15,17,25].

Характерно за HBV инфекцията е наличието в кръвта, както на зрели вириони, така и на голям брой субвирусни частици с диаметър около 20 nm, които могат да формират сферични и тубуларни образувания, съставени само от HBsAg без нуклеокапсид [9,14]. Субвирусните частици са в съотношение 103-106 към един вирион.

Проучване на общата популация от цялата страна, проведено през 1999-2001г. за определяне разпространението на хепатит В вирусната инфекция в България, показва чрез тестиране на няколко вирусни маркера, че населението е засегнато средно в 3.8% при определяне на HBsAg като основен маркер на HBV и в 28% – при определяне на anti-HBc и anti-HBs антитела като маркери за минала инфекция, приключила с оздравяване [30].

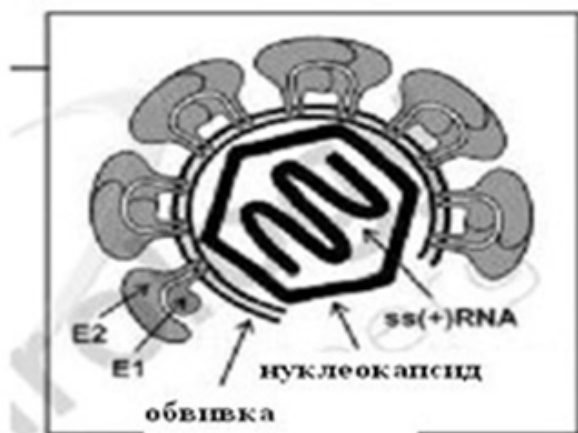


Фиг. 2. Схематична структура на HBV

Откриването на двата основни хепатотропни вируса, HAV и HBV, отговорни за над половината от случаите на вирусен хепатит у нас и по света, е последвано от идентифициране на още три вирусни агента, попадащи в категорията на причинителите на не-А, не-В вирусни хепатити. Такъв се явява хепатитният D вирус, открит през 1977 г. Той е дефектен вирус, изискващ наличие на HBV, за да може да се осъществи продуктивна инфекция. Поради малкия размер на РНК, състояща се от 1700 нуклеотида, вирусът е в състояние да кодира само един антиген в две форми. За да се осъществи ефективна инфекция в човешкия организъм е необходим повърхностният антиген (HBsAg) на HBV, за да се формира цялостният вирион на хепатитния D вирус с големина 36 nm. **Следователно са възможни две форми на инфекция: едновременно заразяване с двата вируса – коинфекция и заразяване на фона на съществуваща хронична хепатит В вирусна инфекция – суперинфекция [7].**

Хепатит С вирус. Третият хепатотропен вирус, предаван по парентерален начин и отговорен за преобладаващия брой случаи на не-А, не-В вирусен хепатит, е открит през 1989 г. и е наречен хепатит С вирус (Фиг.3). Идентифициран е целият вирусен геном, който по своята организация е напълно сходен с тази на РНК генома при сем. Flaviviridae. Той кодира структурните проте-

ини, формиращи ядрото и обвивката на вируса, както и пет неструктурни протеина с различни функции, включително и полимеразна активност. Геномът на вируса показва значителна вариабилност с наличието на 6 различни генотипа и многобройни субгенотипове. **Някои от генотиповете са разпространени по целия свят, докато други са характерни само за определени региони.** Освен това, инфекцията се характеризира с голяма честота на мутациите в инфектирания индивид, както поради начина на репликация на вирусната РНК, така и под влияние на имунната преса, най-вече от страна на хуморалния имунитет. Някои първоначални твърдения за различна патогенност на отделните генотипове не се оправдаха, **но има достатъчно данни за различия в ефективността на лечението на HCV в зависимост от генотипа** [22,36,38]. Хепатит С вирусната инфекция е разпространена средно при 1.3 % от населението на страната [30].



Схематична структура на HCV

Фиг. 3. Схематична структура на HCV
Петият хепатотропен вирус е хепатитния Е вирус (HEV); заедно с HAV те формират групата на ентерално предаваните вирусни хепатити. Еднаквият механизъм на предаване на инфекциите, причинени от тези два вируса, обуславя разпространението им в почти равни пропорции в някои обширни региони от земното кълбо като Централна Америка, Екваториална Африка и Югоизточна Азия. **Извън тези региони, обаче, включително и в България, хепатит Е вирусната инфекция се среща рядко, има ограничено разпространение и се представя само като спорадични случаи с предимно субклинично протичане.** Хепатитния Е вирус е необлечен, със сферична форма и големина 30–40 nm.

Вирионът съдържа РНК геном с позитивна полярност и 7.5 KB дължина. Кодират се три протеина – неструктурен с ензимна функция, протеин, формиращ вирусния капсид и трети най-малък протеин с още неизяснена функция. На базата на генетичен анализ на вирусни изолати от целия свят са обособени 4 основни генотипа и 24 субтипа. **Независимо от генотипното разнообразие, данните говорят за наличие само на един серотип** [10,43].

Специфична лабораторна диагностика на вирусните хепатити А–Е
Острите вирусни хепатити трудно могат да бъдат диференцирани, изследвайки само неспецифичните маркери, характерни за възпалителен процес и клетъчно увреждане на черния дроб. **В България три от петте хепатотропни вируса са основните етиологични агенти на острите вирусни инфекции на черния дроб – HAV, HBV и HCV.** Отличителна черта на острия хепатит С вирусна инфекция обаче е, че клинически проявените случаи са около 20%.

Специфична лабораторна диагностика на вирусните хепатити А–Е

Съществуват разнообразни диагностични методи за откриване на хепатотропните вируси, но най-масово се прилага имуноензимният метод за откриване както на директни (антигени), така и на индиректни (антитела) вирусни маркери в кръвта. Молекулярно-биологичните методи за диагностика, преди всичко за амплификация на вирусния геном, също намират приложение [13]. И двата вида методи се използват, както за диагностика (откриване и проследяване на случаите), така и за целите на надзора и епидемиологичното проучване – установяване на източника и пътищата на предаване при епидемични взривове в болнични условия и в обществото [2].

Основният специфичен серологичен маркер на хепатит А вирусна инфекция, независимо от това дали е клинически проявена или не, са антителата срещу вируса от класа IgM (anti-HAV

Основният специфичен серологичен маркер на хепатит А вирусна инфекция, независимо от това дали е клинически проявена или не, са антителата срещу вируса от класа IgM (anti-HAV

IgM). Те се появяват заедно с първите клинични симптоми, в края на инкубационния период (средно 30 дни след заразяването), достигайки бързо пикова стойност, която се задържа за период от около 2-3 месеца [8,18,23]. В преобладаващия брой случаи anti-HAV IgM изчезват след шестия месец. Антителата срещу HAV от класа IgG (anti-HAV IgG) достигат максимално равнище малко след това на ранните антитела, като практически ги заместват напълно след шестия месец от началото на заболяването [33,37].

Основен диагностичен маркер на острата HBV инфекция е повърхностният антиген на вируса (HBsAg), който се явява в кръвта още по време на инкубационния период и заедно с вирусната ДНК, откривана в серума, са първите директни маркери [15]. Следващият маркер е „е“ антигенът на HBV (HBeAg), който без да участва във формирането на вириона се открива при активно вирусно размножаване. **Задържането на HBsAg и HBV ДНК за повече от 6 месеца е показател за хронифициране на HBV инфекция** [24,45]. Останалите маркери на HBV са индиректни и представляват имунния отговор на организма срещу отделните белтъчни компоненти на HBV. **Характерен маркер на острата HBV инфекция са антителата срещу ядрения антиген на вируса от класа IgM (anti-HBc IgM)**. Появата им съпровожда първите клинични симптоми, като до 6 месеца от началото на инфекцията те намаляват до неоткриваемо равнище. Малко след тях, в острата фаза на заболяването могат да бъдат открити и антитела срещу същия антиген от класа IgG (anti-HBc IgG), които след 6-ия месец напълно заместват ранните антитела [28,29,35]. Освен в острата фаза на инфекцията, те се откриват при евентуално възникнала хронична инфекция, както и след оздравяването. **Anti-HBc IgG се задържат за дълъг период от време и са маркер за осъществена в миналото клинично проявена или субклинична форма на инфекция, дори при липса на останалите маркери** [16,21]. При благоприятно приключила HBV инфекция, още по време на острата фаза, синтезът на HBsAg рязко намалява и след период от 3 до 6 месеца се появяват неутрализиращи антитела (anti-HBsAg) срещу него. **Те представ-**

яват маркери на хуморалния имунитет и се откриват, както след преболеждането, така и след успешна ваксинация срещу HBV (Табл. 1).

Табл. 1. Серологични маркери на HBV и тяхното диагностично значение/интерпретация

HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc IgM/ IgG	HBeAg	Anti-HBe	Значение/ интерпретация
+	-	+ / +	+	-	Остра инфекция
+	-	- / +	- / +	+	Хронична инфекция
-	-	+ / +	-	-	Прозоречен период
-	+	- / +	-	+ / -	Имунитет след заболяване
-	+	- / -	-	-	Постваксинален имунитет

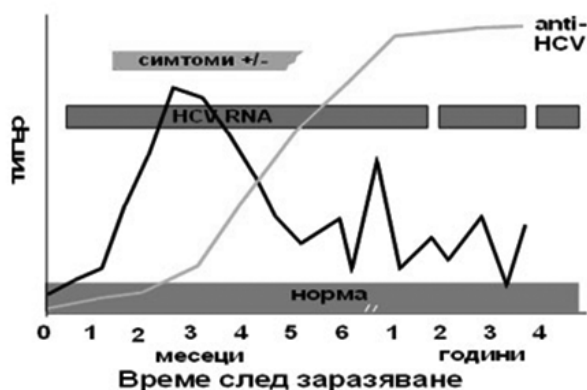
Най-често срещаната форма на хронична HBV инфекция в България е «неактивното носителство», което се характеризира с липса на симптоматика и наличие на HBsAg и anti-HBe антитела, стойности на HBV DNA < 100 000 IU/ml и нормални стойности на чернодробните ензими (ALT, AST). Прогнозата на тази хронична форма най-често е благоприятна [26].

Хепатит С вирусната инфекция относително рядко се представя с клинически проявена остра фаза, като при болшинството от случаите липсва симптоматика за период от няколко десетилетия (20–30) години.

Първият маркер на HCV е появата на неговата РНК в кръвта, около две седмици от началото на заразяването. Предвид естеството на заболяването (предимно субклинично протичане) и вида на използвания диагностичен метод (амплификация на вирусния геном) откриването на този маркер в ранната фаза на заболяването не намира широко приложение в диагностиката на хепатит С вирусната инфекция [41,42]. Само няколко дни след това (5–8 дни) с помощта на имуноензимния метод се установява наличието на хепатит С вирусните антигени. **Откриването на антитела срещу HCV (anti-HCV) е основен метод, претърпял съществен прогрес по отношение на чувствителност и специфичност** в годините след откриването на

Вируса, като съществено беше съкратен (до 35-50 дни) прозоречния период между началото на инфекцията и откриването на anti-HCV антителата. Липсата на специфичен маркер за ранната фаза на HCV инфекцията, подобен на този при HBV, съществено затруднява нейното точно определяне.

Наличието на HCV РНК, тестирана с амплификационни методи (най-често PCR), при липса на anti-HCV при имунокомпетентни лица 10-14 дена след заразяването, с последваща поява на антитела, е най-съществената параклинична характеристика на острата HCV инфекция. Установената сероконверсия на anti-HCV антителата за период от 2-3 месеца след заразяването, също е характеристика на остра HCV инфекция, особено при наличие на анамнестични данни за рискови фактори за това заболяване. Изчезването на HCV РНК скоро след първоначалната инфекция (за 2-3 месеца) е основен индикатор за оздравяване, като антителата срещу вируса остават все още във високи титри [31,32]. **Наличието на вирусна РНК, откривана с амплификационни методи (предимно с PCR) за период, по-голям от 6 месеца, често без клинична симптоматика, е показател за преминаването към хронична фаза на инфекцията** (Фиг. 4) [38].



Фиг. 4. Серологичен профил при HCV инфекция с хронифициране

При острата хепатит D вирусна инфекция най-широко приложение има откриването на anti-HDV антитела в серума на инфектираното лице. Антителата от клас IgM не са строго специфични за острата фаза, затова имайки предвид естеството на HDV (дефектен вирус, изискващ наличие на HBV) маркерът за ранна HBV инфекция (anti-HBc IgM) в случаите на ко-инфекция или суперинфекция дава информация и за фазата на HDV инфекция. Наличието на anti-HDV от класа IgG се открива малко по-късно (до 2 седмици) след маркерите за остра HBV инфекция, като при оздравяване тези антитела намаляват и в някои случаи могат да изчезнат напълно. Хепатит D антигенът (HDAg) също може да бъде открит в серума на болния, като неговото наличие не е задължително. Заразяване с HDV на фона на съществуващ хроничен хепатит тип B (суперинфекция), в почти всички случаи води и до хронична HDV инфекция с наличие на HDV RNA [39].

Хепатит Е вирусната инфекция е рядко срещана в България, като в основата на нейната лабораторна диагностика стои откриването на индиректните специфични маркери – антитела от класовете IgM, IgG (anti-HEV IgM и anti-HAV IgG). Клинически тя е трудно различима от другите остри заболявания, причинени от хепатотропни вируси. Определянето на HEV RNA се извършва главно за изследователски цели [44].

Книзопус

1. AL Panlilio, IT Williams, DM Cardo. Hepatitis viruses. In: CG Mayhall ed., Hospital epidemiology and infection control. 3rd ed., 2004 Lippincott Williams & Wilkins; 744-754.
2. Viral Hepatitis. In: J Chin ed., Control of communicable diseases Manual, 2000; 238-257.
3. Bloch A, Stramer S, Smith D et al. Recovery of hepatitis A virus from a water supply responsible for a common source outbreak of hep. A. *Am J Public Health*. 1990, **80**:428-30.
4. BrussV, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88**:1059-1063.
5. Barker LF, Maynard JE, Purcell RH. Hepatitis B virus infection in chimpanzees: titration of subtypes. *J Infect. Dis* 1975; **132**:451-458.
6. Bonino F, K H Heerman, M Rizzetto. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol* 1986, **58**:945-950.
7. Dvomeyer W, Wielaard F, Jvan van der Veen. A new principle for the detection of specific IgM antibodies applied in ELISA for hep. A. *J Med Virol* 1979, 425-32.
8. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in the serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; **1**: 695-698.
9. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol* 2003; **13**:145-154.
10. Feinstone S, Kapikian A and Purcaell R. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of virus like particle associated with acute illness. *Science* 1973, **182**:1026-28.
11. Franki R, Fauguet C, Knudson D. Classification of nomenclature of viruses. *Arch. Virol* 1991; suppl 2: 320-26.
12. Galli C, Orlandini E, Penso L et al. What is the role of serology for the study of chronic hep B virus infection in the age of molecular biology? *J Med Vir* 2008 Jun; **80** (6): 974-9.
13. Ganem D, Schneider RJ. Hepadnaviridae: the virus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology, 4th ed. Vol 2 Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 2923-69.
14. Han Y, Tang Q, Zhu W et al. Clinical, biochemical, immunological and virological profiles and differential diagnosis between patients with acute hep. B and chronic hep. B with acute flare. *J Gastroenterol. Hepatol* 2008 Nov; **23** (11): 1728-33.
15. Hayashi J, Kashiwagi S, Noguchi A et al. Prevalence of IgM anti-HBc among HBsAg carriers in Okinawa, Japan. *Gastroenterology Jpn*. 1990 Feb **25** (1): 36-40.
16. H Okamoto, Yotsumoyo S, Akane Y et al. Hepatitis B virus with pre-core defects prevail in persistently infected hosts. *J Virol* 1990; **64**: 1298-1303.
17. Harita R, Hoshino Y, Saki H. et al Patients with hepatitis A with negative IgM-HA antibody at early stages. *Am J Gastroenterology* 1995, **90**: 1168-69.
18. Hollinger FJ. Ticehurst. 1996 Hepatitis A virus p735-782, Fields Virology 3th ed Philadelphia, pa.
19. Hwang SJ, Lee SD, Lu RH et al. Hepatitis C viral genotype influences the clinical outcome of patients with acute posttransfusion hepatitis C. *J Med Virol* 2001; **65**: 505-509.
20. Kao JH, Chen PJ, Lai MY; Acute exacerbations of chronic hep. B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. *Hepatology*. 2001 Oct; **34** (1): 817-23.
21. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical and immunological types of infection. *JAMA* 1967; **200**: 365-373.
22. Lemon S, C Brown, D Brooks, et al. Specific IgM response to HAV determined by RIA. *Infect. Immun* 1980; **28**: 927-936.
23. Lee HC. Acute liver failure relates to hepatitis B virus. *Hepatology Res*. 2008 Nov **38**: S9-13.
24. Lutwick L, Robinson WS, The virus of hepatitis, type B. *N Engl. J Med* 1976; **295**: 1168-1175.
25. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Sevastianos V et al. Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative PCR assay in patients with chronic hepatitis B antigen-negative chronic hepatitis B virus infection; *Am. J Gastroenterol* 2003 Oct; **98** (10): 2261-7.
26. Melnick J. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* 1992; **10**, S24-S26.
27. Niermaeijer P, Gips CH, Huizenga JR, Anti-HBc titers and anti-HBc IgM classes in acute, chronic and resolved hep B. *Hepatogastroenterology* 1980 Aug; **27** (4): 271-274.
28. Nowicki MJ, Tong MJ, Nair PV. Detection of anti-HBcIgM following treatment in patients with chronic active hep. B infection. *Hepatology* 1984 Nov; **4** (6): 1129-33.
29. Petrunov B, M Kojouharova, P Teoharov et al. EU Project Interreg II: Seroepidemiology study on hepatitis C and B viral infection prevalence in Bulgaria and northern Greece. *Journal of Hepatology* 2002; **36** Suppl. No1: 138-39.

30. Peters T, Mohr L, Scheiffle F et al. Antibodies and viremia in acute post-transfusion hepatitis C: A prospective study. *J Med Virol* 1990;**42**: 420 – 427.
31. Pekova L, P Teoharov, A Sakarev, Clinical course and outcome of a nosocomial outbreak of hepatitis C in a urology ward. *Journal of Hosp. Infection*, 2007;**67** (1):86-91.
32. Provost J, O Ittenson, V Villarjos et al. A specific complement –fixation test for human hep.A. *Pro Soc Exp Biol Med* 1975;**148**:962-968.
33. Raymonds S Koff. Hepatitis A. *Lancet* 1998; **341**:1643-49.
34. Rodella A, Galli C, Terlenghi L, Perandin F et al. Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2006 Nov;**37** (3):206-12.
35. Robertson B, Myers, Howard C et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposal for standardization. *Arch. Virol* 1998;**143**: 2493-2503.
36. Sata M, Nakano N, Tanaka B, Analysis of serum hep. A virus antibody response in different courses of hep. A virus infection. *J Gastroenterology* 1996;**31**: 812-817.
37. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; **36**: S35–S46.
38. Shattock A, M Morris, K Kinnane and C Fagan. The serology of delta hepatitis and the detection of IgM anti-HD by EIA using serum derived delta antigen. *J Virol. Methods* 1989; **23**: 233-240.
39. Tuttleman JS, Pourcalc, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 1986;**47**: 451-460.
40. Thimme R, Oldach D, Chang KM, et al. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; **194**: 1395–1406.
41. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, et al. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999; **29**: 908-914.
42. Wang Y, H Zhang, R Ling. The complete sequencing of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of ORF 2 and 3. *J Gen Virol* 2000; **81**:1675-1686.
43. Yarbough P, W Tam, K Gabor et al. Assay development of diagnostic tests for hepatitis E, p.367-370 In K Nishioka, H Susuki and T Oda (ed)1996 Viral hepatitis and liver diseases. Springer-Verlag, Tokio, Japan.
44. Zavaglia C, Mondazzi L, Maggi G et al. Are alanine aminotransferase, HBV DNA or IgM antibody to hepatitis B core antigen serum levels predictors of histological grading in chronic hepatitis B? *Liver* 1997 Apr; **17** (2):83-7.