

3/2010

СУЧАСНІ ІНФЕКЦІЇ

ТЕМА НОМЕРА

Нові та забуті інфекції
вимагають уваги



УДК: 616.36-002.1-022.7:578.891]-07

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ГЕПАТИТА С

О.А. ГОЛУБОВСКАЯ

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев

ключевые слова:

вирусный гепатит С, строение вируса, специфическая лабораторная диагностика, экспресс-методы, иммунохроматографический анализ

Открытие вируса гепатита С (ВГС) явилось особым событием в вирусологии: он был идентифицирован не как вирусная частица (вирион), а как геномная (РНК) молекула, фрагмент которой удалось транслировать после клонирования ДНК-копии (кДНК). Это случилось в 1988 году, когда группа исследователей во главе с М. Houghton и Choo Q.L., применив новые молекулярно-генетические методы исследования, секвенировала геном вируса. Несмотря на неоднократные сообщения об обнаружении вирусоподобных частиц в сыворотке HCV-инфицированных людей и шимпанзе, никто не может с уверенностью сказать, что видел этот вирус, но, опираясь на данные молекулярной генетики, известно, что он из себя представляет. Лишь недавно появились сообщения о получении культуры клеток

человеческой гепатомы HepG2, поддерживающей репликацию генома ВГС и даже сборку вирусоподобных частиц. Однако до сих пор единственной моделью, наиболее полно воспроизводящей HCV-инфекцию, является заражение шимпанзе [1, 2].

В настоящее время в мире наблюдается пандемия ВГС. По самым скромным оценкам эпидемиологов, количество инфицированных превышает в 5 – 6 раз количество ВИЧ-инфицированных. В Украине официальная регистрация гепатита С введена с 2003 года [3, 4]. Количество зарегистрированных больных представлено в следующей таблице.

Как видно из таблицы, снижается количество выявленного гепатита С в последние годы, что может быть связано с отсутствием четких критериев диагностики острого гепатита С.

Табл. 1

**Заболеваемость гепатитом С в Украине
(по материалам официальной статистики МЗ Украины 2003 – 2008 рр. – период регистрации) ***

Группы населения	Показатели на 100 тыс. населения / годы					
	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Все население	2,78	2,35	2,55	2,18	1,94	1,88
Взрослые	3,19	2,67	2,92	2,51	2,25	2,18
Дети до 14 лет, в т.ч.:	0,56	0,55	0,51	0,29	0,10	0,08
7-14 лет	0,46	0,49	0,29	0,14	0,10	0
3-6 лет	0,18	0,19	0,31	0,06	0	0
0-2 лет	1,54	1,29	1,63	1,07	0,24	0,38
Городское население	3,72	3,11	3,38	5,00	2,49	2,39
Сельское население	0,86	0,79	0,86	0,44	0,79	0,80

Примечание. * – данные предоставлены ДУ "Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины им. А.Г. Громашевского".

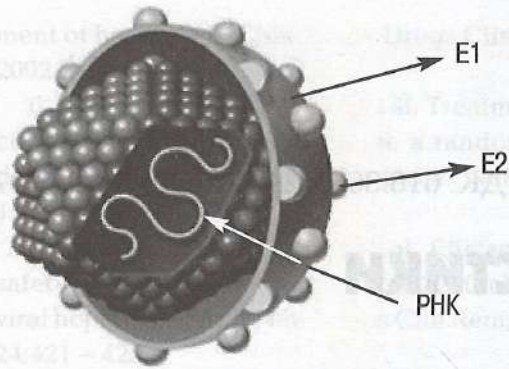


Рис. 1. Стрoение вируса гепатита С

Учитывая то, что гепатит С не имеет острого дебюта и в подавляющем большинстве случаев диагностируется уже на стадии хронического процесса, решающее значение в выявлении различных форм этого заболевания приобретает скрининговое обследование населения, направленное на выявление факта инфицирования. Оптимальным, простым в использовании, а значит, наиболее реализуемым на практике методом скрининговой диагностики являются экспресс-тесты, основанные на методе иммунохроматографического анализа (ИХА). При помощи тестов выявляют наличие суммарных антител к вирусу гепатита С. В случае положительного результата пациента направляют на более детальное обследование к соответствующим специалистам.

ВГС представляет собой сферическую частицу диаметром около 50 нм. Схема строения вируса гепатита С может быть представлена следующим образом (рис. 1). Нуклеокапсид содержит однонитчатую линейную молекулу РНК положительной полярности, протяженностью около 9600 нуклеотидов; сверху он покрыт липидной оболочкой, в которую "утоплены" оболочечные белки — E1 и E2, синтез которых кодируется РНК ВГС.

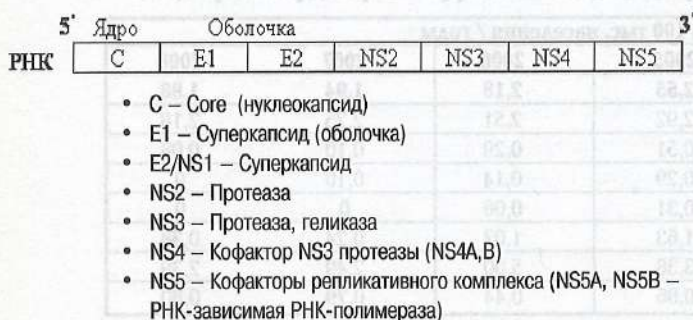


Рис. 2. Организация генома вируса гепатита С

В геноме вируса выделяют две зоны, кодирующие структурные и неструктурные (функциональные) белки. Три белка вируса, участвующие в формировании вирусной частицы, называются структурными, остальные 6 белков выполняют разные ферментативные функции и называются неструктурными.

Одна из ярких особенностей генома ВГС — существование нестабильных участков, которые подвержены частым мутациям. Мутации оказывают воздействие на свойства вирусных белков, особенно оболочечных. Это приводит к тому, что формирующиеся антитела не распознают измененные оболочечные белки и не могут уничтожить вирус. Такая способность существовать в организме в нескольких близкородственных вариантах (квазивидах), не вызывающих перекрестного иммунитета, у вирусов встречается довольно редко. В каждом наборе квазивидов есть главный вариант, который чаще инфицирует клетку, и второстепенные варианты. Когда иммунной системе удастся уничтожить преобладающий вирус, второстепенный занимает его место. Предпочтение всегда получает недоступный для существующих антител вариант.

Специфическими лабораторными диагностическими критериями является выявление структурных частей вируса и антител к ним. Структура вируса гепатита С представлена на следующем рисунке.

Диагностика гепатита С основана на выявлении как структурных компонентов вируса, так и антител к структурным и неструктурным зонам HCV. Применяются молекулярно-генетические методы, направленные на выявление генетического аппарата вируса, и серологические методы, направленные на выявление антител к структурным и неструктурным областям генома. В нашей статье речь пойдет о значении различных маркеров ВГС, представленных в таблице 1.

Одной из главных задач лабораторной диагностики гепатита С является постановка диагноза и разграничение **острого от хронического гепатита С** при помощи выявления серологических маркеров инфицирования. У больных хроническим гепатитом С в различные периоды инфекционного процесса (обострение и вне обострения) в крови могут появляться различные сероло-

гические маркеры, поэтому их диагностическая ценность для разграничения острого и хронического гепатита С сомнительна, о чем пойдет речь ниже.

Основным методом, применяемым для детекции анти-ВГС, стал твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay). ИФА-диагностикумы высокочувствительны (не менее 96%) и специфичны (не менее 98%). В настоящее время во всем мире применяются диагностические препараты 3-го поколения. Для детекции суммарных анти-НСV также хорошо зарекомендовали себя методы экспресс-диагностики (CITO TEST HCV) на основе иммунохроматографического анализа (ИХА). Эти тесты довольно чувствительны, просты в использовании, не требуют специальной подготовки персонала и оборудования, недороги. Такие качества делают их весьма ценными для проведения массового скринингового обследования людей. Пациент получает результат тестирования уже через 10 минут [6, 7, 8].

Различные области генома вируса гепатита С и их значение представлены в следующей таблице.

В процессе диагностики вирусного гепатита С определяют антитела к указанным областям генома вируса.

Считается, что первыми удается определить антитела, кодированные Core и NS5 зоной РНК ВГС. Анти-НСV определяется на 20-й – 150-й день от момента инфицирова-

ния. По аналогии с лабораторной диагностикой гепатита А и В ожидали, что определение анти-НСV класса IgM будет иметь такое же диагностическое значение, как IgM анти-ВГА и IgM анти-НВс. Однако данные тестирования сывороток крови больных острым и хроническим гепатитом С на наличие анти-НСV IgM показали практически одинаково частое их выявление у данной категории больных – 93% и 70% соответственно. Эти результаты свидетельствуют, что обнаружение IgM анти-НСV не может быть использовано как маркер острой инфекции. Еще одной важной проблемой при проведении исследований на наличие анти-НСV являются ложнопозитивные результаты, уровень которых может достигать 10 – 20%. Связано это с несколькими причинами: неспецифическое взаимодействие компонентов реакции, перекрестные реакции с другими вирусными частицами, наличие таких патологических состояний, как онкозаболевание различного генеза и локализации, криоглобулинемический синдром и другие аутоиммунные процессы, иммунодефицитные состояния, сифилис [5, 6, 9, 10].

В связи с вышесказанным стоит остро проблема разграничения ложнопозитивных результатов детекции анти-НСV с истинным фактом инфицирования. Для этого используют метод обнаружения РНК ВГС в крови методом ПЦР. Следует помнить, что отрицательный результат обнаружения РНК ВГС может свидетельствовать о следу-

Табл. 1

Структурная и неструктурная области генома ВГС и их значение

Core-белок капсида	анти HCV. Считается, что первыми удается определить антитела, кодированные Core и NS5 зоной РНК ВГС. Не могут быть использованы
E1, E2/ NS1 – envelope proteins, p7 – гликопротеины оболочки. Обеспечивают связывание вируса с клеткой и проникновение в нее.	E2 регион наиболее вариабельный. Образующиеся мутанты (квазивиды) уклоняются от действия антител.
NS2 – цинк-зависимая протеаза	Является аутопротеазой, разрезающей NS2 и NS3 белки.
NS3 – сериновая протеаза, хеликаза, нуклеотидтрифосфатаза	Отщепляет от полипротеина все неструктурные белки. Длительное присутствие NS3 протеина в клетке может привести к злокачественной трансформации гепатоцитов и развитию ГЦК.
NS4A – кофактор NS3	Является кофактором для NS3 и NS3 5A. Принимает участие в формировании репликативного комплекса.
NS4B	Функция NS4B протеина остается неясной, однако предполагается, что он принимает участие в формировании репликативного комплекса.
NS5A – определяет устойчивость клеток к интерферону	Взаимодействует с протеинкиназой, активность которой индуцируется интерфероном. Результатом взаимодействия является ингибирование молекулярных механизмов ответа инфицированных клеток на интерферон.
NS5B – РНК-зависимая РНК-полимераза	Высоко консервативен и является функционально наиболее важным компонентом репликации вирусной РНК.

ющем: это спонтанное выздоровление (что встречается приблизительно у 15% больных), проведен эффективный курс противовирусной терапии и, наконец, возможна субпороговая концентрация вируса в крови, недоступная для детекции данными тест-системами. Все это затрудняет разграничение ложнопозитивных и истинно позитивных результатов исследования [5-8].

В связи с этим в последующие годы для разграничения ложноположительных результатов анти-HCV были разработаны дополнительные (Supplemental) тесты, основанные на принципе иммуноблоттинга. Ниже мы приводим диагностическую значимость антител, синтезируемых к различным областям генома.

Антитела к антигенам E2/NS1 выявляются в ранние сроки заболевания и чаще определяются у выздоровевших пациентов. На практике их обнаружение используется редко, вероятно, в связи с отсутствием тест-систем [5].

Диагностическая ценность выявления анти-NS2 и анти-NS3 в настоящее время изучается. Известно, что при наличии в крови анти-HCV core IgM также определяются и антитела к NS3-, NS4- и NS5-белкам вируса, что свидетельствует только об его активной репликации, но ни коем образом не может служить маркерами *острого* процесса. Некоторые авторы считают, что уровень анти-NS3 коррелирует с уровнем виремии, что может быть использовано для мониторинга как естественного течения HCV-инфекции, так и для эффективности ПВТ [9].

Длительное время считалось, что анти-ВГС к белкам, кодированным NS4-зоной, в острую фазу гепатита С отсутствуют. Однако в настоящее время доказано, что эти антитела могут не выявляться и при хроническом гепатите С в достаточно большом проценте случаев (40-50%).

Известно, что анти-NS4 косвенно подтверждают лишь факт активной репликации вируса, а выявление их при остром гепатите С свидетельствует о высоком риске хронизации процесса. В настоящее время считается, что это наиболее иммуногенный белок вируса и его экспрессия мало изменяется при всех формах инфекционного процесса (острый, хронический), вследствие чего определение анти-NS4 используется

для подтверждения положительного результата анти-HCV. Однако этот маркер также не может быть использован для разграничения острого и хронического гепатита С.

Таким образом, в настоящее время даже использование новой версии иммуносорбентного анализа (ELISA) и определение всех выше указанных маркеров не позволяет подтвердить или исключить острую фазу HCV-инфекции. Различные сочетания антител могут свидетельствовать лишь об обострении процесса (усиление репликации вируса) и не могут свидетельствовать о первичном процессе (острый гепатит). Таким образом, специфическая диагностика острого гепатита С на сегодняшний день крайне затруднена, и при постановке диагноза острый гепатит С необходимо учитывать множество различных факторов, в т.ч. данные эпидемиологического анамнеза. Результаты первичного тестирования должны быть подтверждены более углубленными исследованиями (молекулярно-генетическими методами, иммуноблоттингом).

Проведенные многочисленные исследования, направленные на определение маркеров острого гепатита С, не увенчались успехом, и большинство исследователей считают, что на сегодняшний день *не существует методов детекции антител со 100 % чувствительностью и специфичностью и не существует "золотого стандарта" в диагностике острого гепатита С.*

Учитывая отсутствие на сегодняшний день лабораторного "золотого стандарта" при диагностике острого ГС, на практике реально постановка диагноза только при развитии желтушных форм заболевания. При этом сохраняются все клинико-лабораторные критерии, характерные для паренхиматозных поражений печени, в т.ч. и ультразвуковая картина острого гепатита, а именно: увеличение переднезадних размеров печени, снижение ее акустической плотности (в случае интактной печени до болезни), "размытость" ее структуры, уменьшение в размерах желчного пузыря и заметное утолщение его стенок (рис. 3).

Однако необходимо помнить, что если острый вирусный гепатит возникает на фоне измененной печеночной паренхимы, то такой УЗ-симптом, как снижение акустической плотности печени, не может быть использован



Рис.3. Ультразвуковая картина диффузного поражения печени (острый гепатит). 2D-режим. Видны утолщенные (спавшиеся) стенки желчного пузыря, которые выглядят "двухконтурными". Этот ультразвуковой симптом часто расценивают как проявление эмпиемы желчного пузыря, что заставляет направлять больных в хирургическое отделение либо назначать мощную антибактериальную терапию, что совершенно недопустимо при поражениях печени



Рис.4. Ультразвуковая картина диффузного поражения печени (острый гепатит). 3D+PD-визуализация. Показатели объемной гистограммы практически не отличаются от показателей нормальной паренхимы печени. (плотность, (MG) – $17,3 \pm 1,2$; индекс васкуляризации (VI), (%) – $8,9 \pm 0,6$, индекс кровотока, (FI) – $31,8 \pm 3,2$, индекс кровоснабжения (VFI) – $6,8 \pm 0,08$). [11 – 13]

как критерий острого гепатита в режиме 2D-визуализации. Здесь более информативен режим 3D + PD-визуализации (рис. 4).

Таким образом, после получения положительного результата при скрининге иммунохроматографическими или другими тестами для постановки диагноза острого ГС мы рекомендуем учитывать следующие моменты:

- ни один из маркеров, определяемых с помощью метода иммуноблоттинга, не может быть абсолютным критерием для постановки диагноза острого ГС.
- об остром ГС с большей вероятностью можно думать при обнаружении РНК-вируса в крови (даже при отсутствии анти-НСV core Ig M) и наличии сопутствующих клинических и лабораторно-инструментальных признаков гепатита;
- учитывать наличие ультразвуковых признаков (нормальная сонографическая картина печени либо признаки паренхиматозной желтухи, характерные для острого гепатита в случае манифестных форм);
- учитывать данные эпидемиологического анамнеза (чаще всего это массивные оперативные вмешательства в течение 8 – 12 месяцев до дебюта гепатита);
- клинико-биохимический синдром острого гепатита при отсутствии указаний

на подобные заболевания в прошлом (для манифестных форм);

- морфологические признаки гепатита без фиброза при исследовании биоптатов печени.

В заключение хочется отметить следующее: летом наш город посетил известный в мире гепатолог J. McHutchinson*. В частной беседе он сказал, что в его практике за год приблизительно из 1500 больных с гепатитом С только у 3 (!) диагностируется первичная острая форма заболевания. Мы разделяем точку зрения этого авторитетного ученого и призываем более взвешенно подходить к диагностике острого гепатита С.

* **John G. McHutchinson, MD.** Медицинский директор, Научно-исследовательский институт, медицинский центр университета Дьюка, Дархем, США. Имеет большое число публикаций по гепатологии, в том числе хронической НСV-инфекции. Член редакционных советов журналов *Viral Hepatitis Review* и *Hepatology*, а также рецензент журналов *Lancet*, *Gastroenterology*, *Journal of Infectious Diseases*, *Journal of Gastroenterology* and *Hepatology*, *American Journal of Gastroenterology*. С 1987 года член Королевской коллегии врачей Австралии. Является также членом нескольких профессиональных организаций, включая Американскую ассоциацию по изучению болезней печени. Закончил университет Мельбурна в 1981 году и резидентуру в Королевской больнице Мельбурна (Австралия). В последующем проходил обучение в университете Южной Калифорнии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вирусный гепатит С (методические рекомендации). — А.Н. Маянский., А.П. Обрядина, Т.И. Уланова, и др. — Нижний Новгород. — 2007. — С. 39.
2. Байкова И.Е., Никитин И.Г., Сторожаков Г.И. Острый гепатит С: вопросы диагностики и лечения. / И.Е. Байкова, Н.Г. Никитин, Г.И. Сторожаков // Русский медицинский журнал. — Т.11. — № 2. — С. 12 — 18.
3. Ершова О.Н. Эпидемиология HCV-инфекции. / О.Н. Ершова, И.В. Шахгильдян, С.Н. Кузин с соавт. // Гепатологический форум — 2006. — № 1. — С. 6 — 9.
4. Гураль А.Л. Проблеми епідеміології та профілактики гепатиту С в Україні / А.Л. Гураль, В.Ф. Марієвський, Т.А. Сергеева та ін. // Інфекційні хвороби. — 2007. — № 3. — С. 23-31.
5. Козько В.М. Патогенетичне та прогностичне значення сироваткових аутоантитіл у хворих на хронічний гепатит С / В.М. Козько, Г.О. Соломенник, О.Е. Бондар із співавт. // Профілактична медицина. — 2008. — № 2. — С. 28 — 32.
6. Сергеева Т.А. Серологическая диагностика гепатита С: проблемы и перспективы / Т.А. Сергеева // Лабораторная диагностика. — 2003. — №1. — С. 10 — 14.
7. Alter MJ. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus / MJ Alter, WL Kuhnert, L. Finelli // Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm. Rep. 2003. — № 52. — P. 1 — 13.
8. Tanaka E. Natural history of acute hepatitis C/ E. Tanaka, K. Kiyosawa // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2000. — № 15. — P. 97 — 104.
9. Amarapurkar D. Natural history of hepatitis C virus infection/ Amarapurkar D // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2000. — № 15. — P. 105 — 10.
10. Micallef JM. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies/ J. M. JM. Micallef, J.M. Kaldor, G.J. Dore // J. Viral Hepat. — 2006. — № 13. P. 34 — 41.
11. Thomas R. Interactive acquisition, analysis and visualisation of sonographic volume data / R. Thomas, H. Dolores // Int. J. Imaging Technol. — 1997. — № 35. — P. 40 — 47.
12. Nelson T. Abdomen. Three-dimensional Ultrasonography. / T. Nelson, D. Downey, D. Pretorius et al. // Abdomen. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. — 1999. — № 24. — P. 151 — 167.
13. Esmat G. Three-dimensional ultrasonography in hepatogastroenterology // In: A. Kurjiak, S. Kupesic. // Clinical application of 3D sonography, NewYork — London, Parthenon Publ. Group. — 2000. — P. 235 — 241.

УДК: 616.36-002.1-022.7:578.891]-07

О. А. Голубовська

ОСОБЛИВОСТІ ДІАГНОСТИКИ ГОСТРОГО ГЕПАТИТУ С

У роботі наведені сучасні відомості про будову вірусу гепатиту С, його антигени та антитіла, їх роль у проведенні діагностики вірусного гепатиту С. Обговорена проблема розмежування гострих та хронічних форм ВГС. Звернено увагу на ті методи сучасної лабораторної діагностики, що використовуються у виявленні ВГС. Обговорена роль у цьому процесі експрес-методів на основі імунохроматографії. Окреслені ті фактори діагностичного процесу, на які потрібно спиратися при проведенні розмежування гострих та хронічних форм ВГС.

UDC: 616.36-002.1-022.7:578.891]-07

O. A. Golubovska

FEATURES DIAGNOSTIC OF ACUTE HEPATITIS C

In the present study the current information on the structure of hepatitis C virus, its antigens and antibodies and their role in carrying out diagnosis of viral hepatitis C. Discussed the problem of differentiation of acute and chronic HCV. Attention is paid to those methods of modern laboratory diagnostics used in the detection of HCV. Discussed the role in this process of rapid methods based on immunochromatography. The factors outlined diagnostic process, which need to be based during the differentiation of acute and chronic HCV.