

Инфекционные болезни, иммунология и иммунотерапия



УДК 616.36 - 002 : 578.891 + 616.89 - 008.441 + 612.017.1 - 008.64] - 07

А.В. Кузнецова¹, А.Б. Островский²

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С. ОСОБЕННОСТИ У НАРКОЗАВИСИМЫХ И КО-ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ

*Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями министерства
здравоохранения Хабаровского края¹, 680031, пер. Пилотов, 2; Институт повышения квалификации
специалистов здравоохранения², 680009, ул. Краснодарская, 9, г. Хабаровск*

Определение специфических антител к вирусным антигенам является базовым методом детекции вирусного гепатита С и ВИЧ-инфекции. Эти тесты обладают высокой чувствительностью и специфичностью, хорошо воспроизводимы, автоматизируемы, стандартизированы и относительно дешевы. Все это позволяет расценивать их как основу диагностики вирусных гепатитов в практическом здравоохранении [3]. Современные тест-системы достаточно надежны и позволяют точно установить диагноз в 98-99% случаев. В подавляющем большинстве погрешности диагностики связаны с ложноположительными реакциями, но в ряде случаев имеют место и ложноотрицательные результаты, обусловленные снижением иммунитета [1, 10]. В последнее время в практике гепатологии активно внедряется метод генодиагностики вирусных агентов методом ПЦР, который позволяет диагностировать состояния с низкой репликативной активностью вируса [12, 13].

Цель настоящего исследования — изучение степени влияния наркопотребления, ко-инфицирования ВИЧ на результаты иммуноферментной и молекулярно-биологической диагностики HCV-инфекции.

Материалы и методы

В исследование был включен 241 пациент с хроническим гепатитом С. В группе наблюдения преобладали мужчины (78,0%). Возраст больных в общей совокупности колебался от 24 до 43 лет (в среднем $32 \pm 2,6$ г.). Основная когорта пациентов (68,88%) была инфицирована HCV наркотическим путем.

В зависимости от выявленных факторов риска заражения HCV пациенты распределялись следующим образом: группа 1 — потребители инъекционных наркотиков,

Резюме

Проведено изучение результатов серологической и молекулярно-биологической диагностики HCV-инфекции с определением степени влияния наркопотребления, ко-инфицирования ВИЧ на анализируемые показатели.

Ключевые слова: хроническая HCV-инфекция, иммуноферментный анализ, ПЦР-диагностика, ВИЧ-инфекция.

A.V. Kuznetsova, A.B. Ostrovsky

IMMUNO-ENZYME AND BIOLOGICAL - MOLECULAR TESTS IN DRUG USERS WITH CHRONIC HEPATITIS C AND HIV-INFECTED PATIENTS

Khabarovsk territorial AIDS-centre, Khabarovsk

Summary

The authors present the data of serological and molecular-biological studies of patients with chronic hepatitis C. The special analysis was made in groups of drug users and HIV-infected patients. There was correlation between the extent of drug addiction and HIV-infection

Key words: chronic HCV-infection, immuno-enzyme test, PCR diagnostics, HIV-infection.

инфицированные HCV, — 41 чел. (33,06%); группа 2 — пациенты с ненаркотическим путем заражения HCV — 38 чел. (30,65%); группа 3 — ко-инфицированные ВИЧ — 45 чел. (36,29%). Зарегистрированы следующие стадии ВИЧ-инфекции (по классификации В.И. Покровского, 2001): бессимптомная 3 (n=18); стадия вторичных

Таблица 1

Частота (М±m) выявления антител к вирусу гепатита С, %

Серологические маркеры HCV-инфекции	Группа 1 (n=79)	Группа 2 (n=75)	Группа 3 (n=87)	Итого (n=241)
a/t cor HCV-IgG	100,0	100,0	100,0	100,0
a/t cor HCV-IgM	35,44±5,4	38,66±5,6	28,73±4,8	34,0±3,1
a/t NS3HCV	86,07±3,9	86,66±3,9	80,45±4,3	84,23±2,3
a/t NS4HCV	59,49±5,5	61,33±5,6	52,87±5,4	57,67±3,2
a/t NS5HCV	97,46±1,7	98,66±1,3**	89,65±3,3***	95,02±1,4
a/t cor HCV-IgG +a/t NS5HCV	97,46±1,7	98,66±1,3**	89,65±3,3***	95,02±1,4

Примечания. n — кол-во обследованных больных; * — различия между группами 1 и 2 достоверны; ** — различия между группами 2 и 3 достоверны; *** — различия между группами 1 и 3 достоверны.

заболеваний 4А, фаза ремиссии (n=15), стадия вторичных заболеваний 4Б, фаза ремиссии (n=12).

Серологическая диагностика инфицирования HCV (a/tHCV-IgG, a/tHCV-IgM, a/tHCV-cor, a/tHCV-NS(3-5) у всех лиц, включенных в исследование, проводилась методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) по стандартным методикам с использованием специфических коммерческих тест-систем, разрешенных к применению в РФ Приказом МЗ РФ от 30.10.2000 г. № 384 «О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека».

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции базировалась на обнаружении суммарных антител к ВИЧ методом твердофазного иммуноферментного анализа и изолированного выявления антител к белкам оболочки (env), ядра (gag) и ферментов (pol) вируса методом иммунного блотинга по стандартным методикам с использованием специфических диагностических систем, разрешенных к применению Приказом Министерства здравоохранения РФ от 30.07.2001 г. № 292 «Об использовании иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ в сыворотке крови человека».

Молекулярно-биологические исследования включали детекцию генома HCV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с внутренним стандартом с использованием стандартных диагностических наборов «АмплиСенс HCV 240/ВКО-440» и амплификацию участка к ДНК ВГС генотипов 1a, 1b, 2, 3a на тест-системе «АмплиСенс-50-R» на оборудовании «Biometra T3 Thermocycler», количественное определение РНК вируса гепатита С в плазме крови методом ПЦР на диагностикумах «АмплиСенс ВГС-Монитор» (n=241) с учетом результатов методом ГиФА на оборудовании «GeneAmp PCR System 2400» (все диагностикумы производства ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва). Оценка концентрации РНК ВИЧ в плазме проводилась методом ПЦР на количественной тест-системе «АмплиСенс ВИЧ-Монитор» (производство ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва) с учетом результатов методом ГиФА на оборудовании «GeneAmp PCR System 2400».

Результаты и обсуждение

Анализируя результаты табл. 1, необходимо отметить, что наличие антител класса IgG к вирусу гепатита С и

Таблица 2

Частота (М±m) выявления молекулярно-биологических признаков вируса гепатита С у больных хронической HCV-инфекцией, %

Признаки	Группа 1 (n=79)	Группа 2 (n=75)	Группа 3 (n=87)	Итого (n=241)
Генотип вируса гепатита С				
Первый: включая	50,63±5,6**	78,67±4,7***	50,57±5,4	59,34±3,2*
- 1a	нет	2,67±1,8	нет	0,83±0,6
- 1b	49,37±5,6**	70,67±5,3***	44,83±5,3	54,36±3,2
- нетипируемый	нет	5,33±2,6	2,29±1,6	2,49±1,0
- микст	1,26±1,2	нет	3,45±1,9	1,66±0,8
Не первый, включая	49,37±5,6**	21,33±4,7***	49,43±5,4	40,66±3,2
- 2	8,86±3,2	8,0±3,1	6,89±2,7	7,88±1,7
- 3a	40,50±5,5*	13,33±3,9***	42,53±5,3	32,78±3,0
ВН РНК HCV				
ВВН	56,96±5,6	50,67±5,8***	65,52±5,2	58,09±3,2*
НВН	43,04±5,6	49,33±5,8	37,48±5,2	41,91±3,2

Примечания. * — достоверность различия между признаками в целом по группе, p<0,001; ** — различия между группами 1 и 2 достоверны; *** — различия между группами 2 и 3 достоверны.

позитивный результат тестирования на РНК HCV в динамике было условием включения пациентов в исследование. Несмотря на то, что у всех пациентов репликативная активность вируса гепатита С была подтверждена детекцией генетического материала возбудителя методом качественной и количественной ПЦР, антитела класса IgM определялись только в 34,0±3,1% случаев.

Напротив, как следует из приведенных в табл. 1 данных, во всех выделенных группах наряду со специфическими иммуноглобулинами класса IgG наиболее часто обнаруживались антитела к неструктурным (NS3 и NS5) белкам вируса гепатита С (84,23±2,3 и 95,04±1,4% соответственно). При этом зарегистрирована достоверная (p<0,05) разница частоты выявления anti-NS5 в группе ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных пациентов, а также лиц, инфицированных гепатитом С наркотическим и ненаркотическим путем. Удельный вес регистрации антител к NS4 протеину вируса по группам наблюдений существенно не различался, что подтверждает хронический характер заболевания.

В литературе [2, 5, 6, 8, 9] имеются крайне разноречивые сведения о частоте выявления вышеуказанных маркеров, что, на наш взгляд, связано с неоднородностью контингентов в данных исследованиях. На основании данных, приведенных в табл. 1, можно сделать вывод о высокой чувствительности (95%) и предсказательной ценности при хронической HCV-инфекции сочетанного обнаружения a/t HCV-cor IgG и a/t NS5HCV. Вместе с тем необходимо отметить, что чувствительность данного лабораторного теста снижается у ВИЧ-позитивных пациентов (89,65%) и лиц, потребляющих наркотики (93,37%).

Таким образом, для корректной интерпретации результатов специфической серологической диагностики хронической HCV-инфекции необходимо не только комплексно анализировать выявленный спектр антител, но и учитывать сопутствующие заболевания и анамнестические данные.

Изучение частоты выявления антител к основным группам белков ВИЧ (env, gag, pol) показало, что в 100%

случаев у микст-инфицированных и наркозависимых лиц выявлялись антитела к оболочечным белкам вируса, прочие антитела выявлялись с частотой 90-98%, что полностью соответствует сведениям, описанным в литературе [11] для пациентов, моноинфицированных ВИЧ. Таким образом, в проводимом нами исследовании не зарегистрировано значимого влияния ко-инфицирования HCV и наркопотребления на специфический иммунный ответ к вирусу иммунодефицита человека.

Известно, что такие биологические свойства HCV-вируса, как генотип и уровень репликативной активности (табл. 2), оказывают существенное влияние на течение заболевания и эффективность терапии [3].

У пациентов, включенных в исследование, значимо ($p < 0,001$) чаще выявлялся первый генотип возбудителя ($59,34 \pm 3,2\%$) и высокий уровень вирусной нагрузки ($58,09 \pm 3,2\%$).

Зарегистрированы достоверные различия в частоте выявления генотипов возбудителя в зависимости от выявленных факторов риска инфицирования гепатитом С. У пациентов 1 и 3 групп (наркопотребители), вне зависимости от инфицирования ВИЧ, достоверно чаще диагностировался не 1 генотип возбудителя ($49,4 \pm 3,9\%$ против $21,33 \pm 4,7\%$; $p < 0,001$). Сходные выводы были сделаны и другими авторами [4, 7] при изучении распространения различных генотипов HCV в г. Санкт-Петербурге, где широкое распространение наркомании началось несколько раньше.

При изучении частоты выявления генотипов HCV по годам наблюдения показано снижение частоты определения генотипа 1b с 66,0% в 2003 г. до 56,5% в 2007 г. при одновременном повышении встречаемости субтипа 3a с 21,0 до 31,4%. Установлена зависимость распространения тех или иных генотипов возбудителя от пола и возраста пациентов: у мужчин соотношение 1b и 3a генотипов возбудителя составило 3:1, тогда как среди женщин аналогичный показатель был 1:1. При этом у женщин варианты вируса 1b и 3a с равной частотой встречались в разных возрастных группах, за исключением лиц старше 50 лет, где диагностировался только вариант 1b. Напротив, у мужчин имела четкая зависимость между возрастом и генотипом вируса: у 57,1% лиц в возрасте до 30 лет обнаруживался 3a вариант возбудителя, тогда как в группе 30-40 лет данный показатель составил 14,3%. Суммарно среди всех лиц в возрасте до 30 лет 58,3% были инфицированы не первым генотипом возбудителя; удельный вес лиц, зараженных 1b вариантом вируса, повышался с 64,2% в возрастной группе 30-40 лет до 100% у пациентов старше 40 лет (значимых различий между группами по данному критерию не зарегистрировано). Полученные результаты сопоставимы с данными других авторов по этому вопросу [4]. Значения вирусной нагрузки РНК HCV находились в интервале от 90 000 до 58 000 000 копий в мл плазмы. В $58,09 \pm 3,2\%$ случаев вирусная нагрузка превышала показатель 1 млн копий/мл, причем в 10 случаях ($4,15 \pm 1,3\%$) данный показатель был более 10 млн копий/мл.

Частота выявления высокой вирусной нагрузки не зависела от пола пациентов ($55,55 \pm 5,6$ и $44,45 \pm 5,6\%$ среди мужчин и женщин соответственно), а также генотипа вируса ($57,9 \pm 4,3$ и $60,76 \pm 5,5\%$ у пациентов с 1 и не 1 генотипом возбудителя соответственно; $p > 0,05$).

Вирусная нагрузка более 107 копий/мл достоверно чаще регистрировалась у потребителей психоактивных веществ, инфицированных не 1 вариантом возбудителя ($4,0 \pm 2,7$ и $23,0 \pm 8,1\%$ соответственно; $p < 0,05$). Напротив, среди пациентов, инфицированных не 1 генотипом вируса и отрицавших наркопотребление, значения ВН были достоверно ниже, чем у лиц с 1 генотипом. Изучение влияния возраста на уровень вирусной нагрузки показало снижение удельного веса выявления высоких значений ВН с возрастом пациентов с $60,0 \pm 5,5\%$ в группе до 30 лет до $40,0 \pm 5,5\%$ у лиц 30-40 лет и дальнейший рост до $66,7 \pm 5,3\%$ у пациентов старше 40 лет.

У пациентов 3 группы, по отношению к 2 группе, отмечен достоверно более высокий ($p < 0,05$) уровень вирусной нагрузки HCV.

Разброс значений вирусной нагрузки на РНК ВИЧ составил от 400 до 260 000 копий мл плазмы. Зарегистрировано динамическое изменение уровня вирусной нагрузки по стадиям ВИЧ-инфекции: 2Б — $91\,760 \pm 14\,693,4$ копий/мл; 2В — $39\,900 \pm 6\,389,1$ копий/мл; 3А — $79\,200 \pm 12\,682,1$ копий/мл. Разница между значениями вирусной нагрузки РНК HIV на стадиях 2Б и 2В достоверна ($p < 0,001$), что согласуется с данными исследований о кинетике концентрации РНК HIV при естественном течении ВИЧ-инфекции [11].

Выводы

1. При хронической HCV-инфекции показана высокая чувствительность и предсказательная ценность раздельного определения антител класса IgG к различным белкам вируса гепатита С методом ИФА. Определение антител класса IgM к вирусу гепатита С методом ИФА при хронической HCV-инфекции имело крайне низкую чувствительность (34,0%), в связи с чем, по нашему мнению, нецелесообразно ориентироваться на него как надежный лабораторный признак репликации вируса.

2. У пациентов ко-инфицированных ВИЧ и наркозависимых диагностическая ценность раздельного определения антител к белкам HCV была значимо ниже, чем в группе сравнения. Хроническая HCV-инфекция не влияла на чувствительность тест-систем для диагностики ВИЧ-инфекции.

3. В группе пациентов с хронической HCV-инфекцией значительно ($p < 0,001$) чаще выявлялся первый генотип возбудителя и высокий уровень вирусной нагрузки. У наркопотребителей достоверно ($p < 0,001$) чаще диагностировался не 1 генотип возбудителя. Установлена зависимость распространения тех или иных генотипов возбудителя от пола и возраста пациентов. В 3 группе отмечен значимо более высокий уровень ВН HCV.

Л и т е р а т у р а

1. Алексеев Т.И., Знойко О.О., Круглов И.В. и др. Спектр антител к различным антигенам HCV при разных вариантах течения хронической HCV-инфекции // Вопросы вирусологии. - 2002. - №2. - С. 11-16.

2. Жаворонок С.В., Красавцев Е.Л., Мицура В.М. и др. Спектр антител к разным антигенам вируса у больных хроническим гепатитом С // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - № 2. - С. 57-61.

3. Ивашкин В.Т. Диагностика, лечение и ведение пациентов с гепатитом С: По мат-лам практ. рек. Аме-

риканского общества по изучению заболеваний печени (AASLD) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2006. - №2. - С. 102-129.

4. Калинина О.В., Эсауленко Е.В., Мукомолов С.Л. Превалирование генотипа HCV 3a у больных острым гепатитом С в Санкт-Петербурге // Гепатит В, С, D - проблемы диагностики, лечения и профилактики: тез. докл. IV Рос. науч.-практ. конф. - М., 2001. - С. 160.

5. Комолов И.С., Агапов И.И., Тоневицкий А.Г. и др. Особенности гуморального иммунного ответа на рекомбинантный вирусный белок NS3 у больных гепатитом С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2005. - №1. - С. 89-93.

6. Лучшев В.И., Орлова Е.В., Жаров С.Н. и др. Динамика антител к структурным и неструктурным белкам у наркоманов с HCV-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2001. - №6. - С. 30-32.

7. Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С. и др. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ // Вопросы вирусологии. - 1997. - №4. - С. 157-161.

8. Малышев В.С. Тесты иммуноблота на антитела к вирусу гепатита С (HCV) у анти-HCV-позитивных доноров крови // Вестник службы крови России. - 2000. - №4. - С. 14-16.

9. Михайлова Е.А., Корочкина О.В., Бузина А.Б. Диагностическое и прогностическое значение антител к разным антигенам HCV при остром гепатите С // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2003. - №6. - С. 19-21.

10. Новиков В.В., Добротина Н.А., Афанасьев А.Ю. Диагностические возможности иммуноферментной тест-системы для определения спектра антител к структурным и неструктурным антигенам вируса гепатита С // Вопросы вирусологии. - 2000. - №6. - С. 44-47.

11. Онищенко Г.Г. О неотложных мерах по противодействию распространению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации // Здравоохранение Российской Федерации. - 2006. - №2. - С. 4-8.

12. Шипулин Г.А., Покровский В.В., Богословская Е.В. Отечественная ПЦР тест-система для количественного определения РНК ВИЧ в плазме крови // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2001. - №1. - С. 40-43.

13. Шипулин Г.А., Эльберт Е.В., Волкова Р.А. и др. Оценка диагностической эффективности тест-системы для выявления РНК-вируса гепатита С методом полимеразной цепной реакции «Амплисенс HCV-240/ВКО-440» // Вопросы вирусологии. - 2002. - №5. - С. 12-16.

Координаты для связи с авторами: Кузнецова А.В. — тел.: 60-36-01



УДК 616.831 - 009.24 - 053.2 : 616.9

Т.Е. Макарова¹, В.П. Молочный²

СОСТОЯНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА У ДЕТЕЙ С СУДОРОЖНЫМ СИНДРОМОМ ПРИ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

*Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения¹,
680009, ул. Краснодарская, 9; Дальневосточный государственный медицинский университет²,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, г. Хабаровск*

Судорожный синдром является одним из частых ургентных состояний у детей при различных заболеваниях [5], и частота судорог достигает 15-20 случаев на 100 тыс. детей, причем 2/3 судорожных припадков приходится на детей раннего возраста. Высокая частота судорог у детей объясняется незрелостью головного мозга, повышенной проницаемостью сосудов и гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), повышенной гидратацией ткани мозга, неустойчивостью обменных процессов, генерализацией возбуждения [1, 3].

Причинами судорог могут быть различные острые и хронические заболевания и повреждения головного мозга (нейроинфекции, травмы, гидроцефальный синдром, опухоли, генетические, хромосомные заболевания, электролитные нарушения). Возможны также психогенные судорожные нарушения (аффективно-респираторные су-

дороги). По данным различных авторов, от 25 до 84% судорог возникает на фоне лихорадки. Отдельную группу составляют судороги при эпилепсии (0,5-1%) [1, 4].

Несмотря на полиэтиологичность судорожного синдрома, в большинстве случаев его общими патогенетическими факторами являются расстройства гемодинамики, приводящие к гипоксии, ацидозу и другим метаболическим нарушениям в центральной нервной системе (ЦНС). Повышение сосудистой и клеточной проницаемости, наряду с лабильностью водно-солевого обмена и тенденцией к развитию внутримозговой гиперосмолярности, приводит к отеку и набуханию головного мозга. Под влиянием гипоксии и метаболических расстройств нарушается энергетический баланс мозга, снижается активность ферментных систем, что способствует развитию повышенной судорожной готовности.