Т.В. КОЖАНОВА, к.м.н., ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН,
Научно-практический центр медпомощи детям Департамента здравоохранения г. Москвы

СОВРЕМЕННАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА С

И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ИНФИЦИРОВАНИЯ

Вирусный гепатит С является одной из важнейших проблем мирового здравоохранения. Инфекция, вызванная вирусом гепатита С, часто протекает латентно, характеризуется минимальными клиническими проявлениями, а также высокой частотой хронизации. Гепатит С нередко диагностируется случайно, и во многих случаях пациенты остаются недообследованными. Доступные в настоящее время современные методы серологической (определение спектра антител к вирусу гепатита С) и молекулярной диагностики (качественный и количественный анализ выявления РНК вируса гепатита С, генотипирование) гепатита С позволяют выявить инфекцию на ранних сроках, определить необходимость назначения противовирусной терапии, оценить ее эффективность и вероятность достижения устойчивого ответа на лечение. Рассматривается проблема диагностики скрытого гепатита С.

Ключевые слова: гепатит С, вирус гепатита С, антитела к вирусу гепатита С, РНК вируса гепатита С, генотип

Вирусный гепатит С (ГС) является одной из важнейших проблем мирового здравоохранения. Инфекция, вызванная вирусом ГС, часто протекает латентно, характеризуется минимальными клиническими проявлениями, а также высокой частотой хронизации. Предполагается, что в мире вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 170 млн человек, при этом у них значительно повышен риск формирования цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

Общие симптомы ГС: усталость, боль в мышцах, потеря аппетита или тошнота – являются неспецифическими и во многих случаях выражены слабо или совсем не проявляются. ГС нередко диагностируется случайно, и во многих случаях пациенты остаются недообследованными. Подсчитано, что только 30–50% лиц, инфицированных ВГС, осознают свою болезнь, получают противовирусную терапию (ПВТ) и могут избежать дальнейшей передачи вируса [1]. ГС у пациентов, не получающих терапии, переходит в хроническое состояние в 80% случаях, что приводит к развитию цирроза печени у 20–40% лиц с высоким риском печеночной декомпенсации, гепатоцеллюлярной карциномы и смерти [2].

В свете этих фактов диагностика ГС должна быть выполнена тщательно у всех пациентов с высоким уровнем активности печеночных ферментов, с хроническими заболеваниями печени неясной этиологии и наличием отягощенного эпидемиологического анамнеза (введение внутривенно или назально психоактивных препаратов, переливание крови или ее компонентов, хирургические вмешательства (до 1990 г.), частые инъекции, выполнение татуировок или пирсинга, передача инфекции половым путем). Для диагностики ГС доступны как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования [3].

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВГС

Врач при первичной лабораторной диагностике ГС начинает свое обследование с определения в сыворотке крови пациента основного маркера инфицирования ВГС – антиВГС. Их обнаружение может свидетельствовать о встрече организма с ВГС в прошлом или о наличии текущей инфекции (вместе с положительным результатом выявления рибонуклеиновой кислоты вируса гепатита С [РНК ВГС]) [4].

В современной клинической практике антитела против множественных эпитопов ВГС обнаруживаются с помощью коммерчески доступных иммуноферментных (ИФА) тест-систем 2-го и 3-го поколения. В этих наборах реагентов ВГС-специфические антитела из сыворотки захватываются рекомбинантными белками ВГС, а затем определяются вторичными антителами против иммуноглобулинов классов G и M (IgG или IgM), меченные ферментами, которые катализируют развитие цветной реакции.

Предполагается, что в мире вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 170 млн человек, при этом у них значительно повышен риск формирования цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы

Первый ИФА для обнаружения ВГС-специфических антител был основан на эпитопах ВГС, полученных из *NS4* региона (С-100), имел низкую специфичность и чувствительность (70–80%) [3]. С-100-антитела появляются через 16 нед. после инфицирования ВГС. Регионы генома ВГС представлены на *рисунке 1.*

ИФА тест-системы 2-го поколения дополнительно обнаруживают антитела против эпитопов, полученных из *core* (С-22),

Рисунок 1. Структура генома вируса гепатита С

	Структурные белки				Неструктурные белки						
5′-НТО*	Core/F	E1	E2	p7	NS2	NS3	NS4A	NS4B	NS5A	NS5B	3′-НТО

* НТО – нетранслируемая область

NS3 (С-33) и *NS4* (С-100) регионов, имеют более высокую чувствительность (примерно 95%) и низкий риск получения ложноположительных результатов. С помощью этих наборов реагентов ВГС-специфические антитела могут быть обнаружены уже через 10 нед. после инфицирования ВГС [5].

ИФА тест-системы 3-го поколения были сконструированы на основе антигена *NS5* и высокоиммуногенного эпитопа *NS3* регионов для того, чтобы сократить диагностическое окно от момента инфицирования ВГС до появления положительных серологических результатов. Это усовершенствование позволяет обнаруживать антиВГС на 4–6-й неделе после инфицирования (чувствительность 99%) [6]. Определение антиВГС IgM может сократить период «серологического окна» (период от момента инфицирования вирусом до появления антител) лишь у небольшой доли пациентов. Обнаружение антиВГС IgM также не является достаточным, чтобы дифференцировать острый и хронический ГС, т. к. некоторые хронически инфицированные лица регулярно продуцируют антиВГС IgM и не все отвечают на острую инфекцию образованием антиВГС IgM.

Специфичность серологической диагностики ГС трудно определить, поскольку отсутствует золотой стандарт. Ложноположительные результаты определения антиВГС наиболее часто встречаются у пациентов с наличием ревматоидного фактора в крови, среди беременных, у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и др. Ложноположительные результаты определения антиВГС в популяциях с низкой распространенностью ГС, в частности среди доноров крови и органов, требуют проведения подтверждающих тестов. Несмотря на то что иммуноблоттинг для подтверждения положительных результатов выявления антиВГС методом ИФА доступен, эти тесты потеряли свое клиническое значение, т. к. разработаны высокочувствительные методы определения РНК ВГС.

Ложноотрицательные результаты выявления антиВГС могут наблюдаться у пациентов, находящихся на гемодиализе или у лиц с тяжелой иммуносупрессией, например у ВИЧ-инфицированных или больных с гематологическими злокачественными новообразованиями.

ИФА тест-системы 3-го поколения, доступные с 1993 г., дополнены рекомбинантными NS5-белками. Специфичность современных наборов реагентов при определении антиВГС составляет 99,95% (вне зависимости от наличия в материале γ-глобулинов, ревматоидного фактора, С-реактивного белка и т. д.), чувствительность – 98,9% и они способны обнаруживать антиВГС через 4–6 нед. после инфицирования.

При положительных серологические результатах выявления антиВГС необходимо провести качественное и количественное определение в сыворотке крови РНК ВГС, что позволит дифференцировать активно текущую ВГС-инфекцию или ее разрешение. Является недопустимым использование термина «носительство» антиВГС у лиц с нормальным уровнем аланиновой аминотрансферазы в сыворотке крови.

Считается, что при остром ГС один только серологический скрининг является недостаточным, т. к. антиВГС могут появляться позднее от момента инфицирования вирусом. Напротив, РНК ВГС может обнаруживаться в течение нескольких дней после заражения, что делает данный анализ обязательным в диагностике острого ГС. Кроме того, количественное определение РНК ВГС играет важную роль в выборе тактики, длительности и эффективности ПВТ [7].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВГС

Тест-системы для выявления антиВГС в большинстве случаев не дают выраженного преимущества по сравнению с определением вирусной РНК для сокращения периода «серологического окна» [8].

В настоящее время доступны как качественные, так и количественные методы определения РНК ВГС.

Для скрининга донорской крови и для подтверждения активной формы инфекции у лиц с антиВГС должен проводиться качественный анализ на РНК ВГС методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Количественный анализ определения РНК ВГС предлагает возможность точного измерения вирусной нагрузки и играет важную роль в проведении мониторинга ПВТ [9–12]. Качественные и количественные методы обнаружения РНК ВГС в настоящее время широко заменены методом ПЦР в реальном времени, который может обнаруживать РНК ВГС в очень широком диапазоне – от 10 до 10 млн МЕ/мл (*рис. 2, табл. 1*).

Поскольку интерферонотерапия является дорогостоящей и связана с частыми неблагоприятными побочными эффектами, важна ранняя оценка прогноза ПВТ, что позволит своевременно отменить неэффективную терапию, избежать ее нежелательных явлений и снизить стоимость лечения.

РНК ВГС должна быть подтверждена в четко определяемые периоды терапии для решения вопроса о продолжении ПВТ или ее прекращении. Современные методики по ведению и терапии ВГС-инфекции рекомендуют количественное определение РНК ВГС перед началом ПВТ, на 4, 12, 24, 48-й нед. и через 24 нед. после ее завершения. Быстрый вирусологический ответ (БВО), т. е. отсутствие РНК ВГС через 4 нед. терапии, является определяющим прогностическим фактором достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) – отсутствие РНК ВГС через 24 нед. после завершения ПВТ [14]. Во время ПВТ обычно наблюдают ранний вирусологический ответ (РВО), определяемый как снижение на 2 или более десятичных логарифма (log) уровней РНК ВГС (непол-

Рисунок 2. Диапазоны определения и линейные ранги динамики (IU/ml – МЕ/мл) коммерческих тест-систем, доступных для выявления РНК ВГС [13]

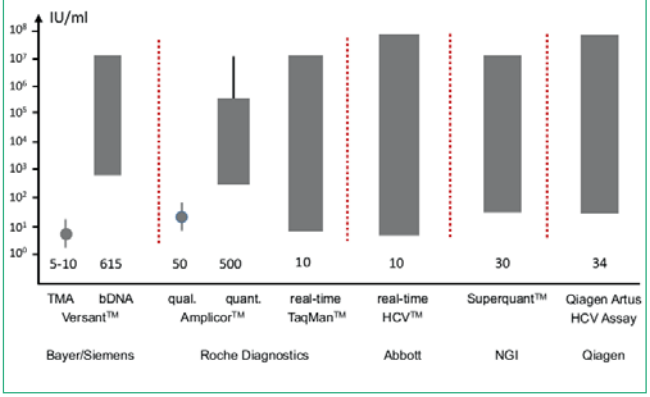


Таблица 1. Коммерческие тест-системы, доступные для выявления РНК ВГС

Тест-система	Дистрибьютор
Качественное определение РНК ВГС	
Amplicor™ HCV 2.0	Roche Molecular Systems
Versant™ HCV	Siemens Medical Solutions Diagnostics
Количественное определение РНК ВГС	
Amplicor™ HCV Monitor 2.0	Roche Molecular Systems
HCV SuperQuant ™	National Genetics Institute
Versant™ HCV RNA 3.0	Siemens Medical Solutions Diagnostics
Cobas AmpliPrep/High pure system/Cobas® TaqMan®	Roche Molecular Systems
Abbott RealTime™ HCV	Abbott Diagnostics
Artus HCV QS-RGQ assay	Qiagen

ный РВО) или отсутствие РНК ВГС через 12 нед. (полный РВО). Отсутствие РВО рассматривают как достоверный прогностический фактор недостижения УВО [15].

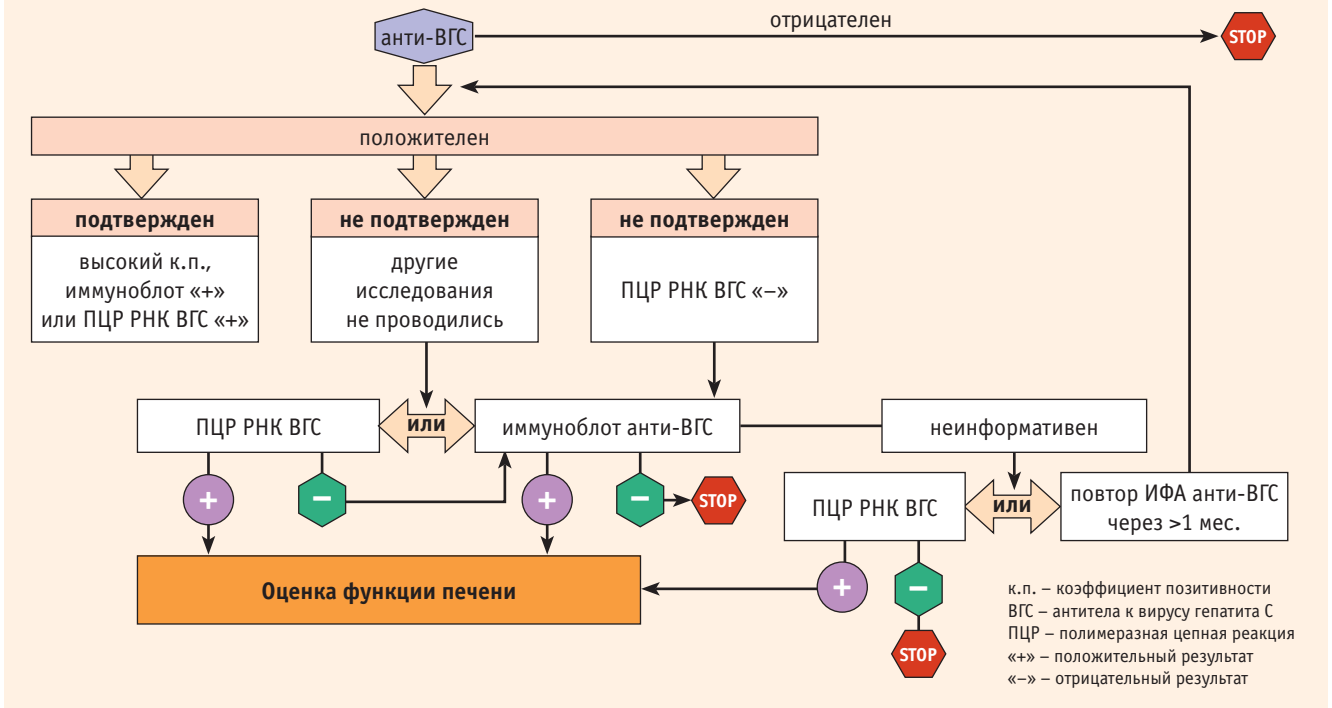
Отрицательный результат выявления РНК ВГС в чувствительном тесте через 24 нед. после окончания терапии является целью противовирусного лечения и указывает на достижение УВО [8].

В последнее время количественный анализ РНК ВГС стал широко применяться для выбора персонализированной продолжительности ПВТ при использовании новых противовирусных препаратов прямого действия для лечения хронического ГС [16, 17].

После базовой диагностики ГС у каждого пациента, для которого рассматривается проведение ПВТ, должен быть определен генотип ВГС, т. к. рекомендуемые в настоящее время схемы и длительность лечения, а также конкретный выбор доз препаратов (в частности, рибавирина) различаются в зависимости от генотипа вируса.

Показано, что независимо от типа терапии (пегилированные, или короткие, интерфероны в сочетани с рибавирином) пациенты лучше отвечают на лечение, если они инфицированы ВГС генотипа 2. Лица, инфицированные генотипами 1, 3, 4 ВГС, хуже отвечают на проводимую ПВТ [18]. В связи с этим для пациентов с хроническим ГС установлена различ-

Рисунок 3. Алгоритм диагностики ВГС-инфекции [4]



ная длительность ПВТ (при генотипах 2 и 3 – 24 нед., генотипах 1 и 4 – 48 нед.) [19].

Золотым стандартом определения генотипа ВГС является анализ нуклеотидной последовательности участка *NS5B* вирусного генома (*рис. 1*). В рутинной диагностике ГС применять данный подход весьма затруднительно, поскольку многие коммерческие тест-системы основаны на высокотехнологичной ПЦР с генотип-специфичными праймерами, а также на методе обратной гибридизации. В основе работы таких наборов лежит использование в качестве матрицы 5'-нетранслируемой области генома ВГС. Однако указанные тест-системы не могут точно дифференцировать новые, редко встречающиеся генотипы ВГС – 7, 8 и 9, а также во многих случаях – субтипы 1a и 1b [8]. Последнее особенно важно, поскольку показано, что субтипы 1a и 1b по-разному отвечают на новые антивирусные препараты прямого действия [8].

В настоящее время вопрос об использовании наиболее адекватного метода генотипирования ВГС в рутинной клинической практике по-прежнему остается открытым.

Морфологические методы, такие как иммуногистохимия, *in situ* гибридизация или ПЦР образцов ткани печени, не играют значительной роли в диагностике ГС из-за их малой доступности, технической сложности, связанной с проведением (биопсия печени), и нередко низкой чувствительности, специфичности и эффективности (в связи с ограниченным объемом получаемого материала) в сравнении с серологическими и молекулярно-генетическими подходами.

Итоги описания современных методов диагностики ГС отражены в таблице интерпретации результатов исследования, суммированы в виде алгоритма и могут служить памяткой для врача любой специальности (*рис. 3, табл. 2*).

В настоящее время врач может столкнуться с проблемой, когда, обследуя пациента с хронической патологией печени (при исключении аутоиммунных процессов и лекарственного поражения) на фоне длительно сохраняющейся минимальной активности печеночного воспаления, в сыворотке крови не находит маркеров инфицирования вирусами гепатитов. В таких случаях считают, что инфекция протекает скрыто (латентная инфекция).

СКРЫТЫЙ ГЕПАТИТ С

Первое определение скрытого (латентного) ГС включало обнаружение РНК ВГС в сыворотке крови в отсутствие серологических маркеров инфицирования ВГС. В дальнейшем при интенсивном изучении данной формы инфекции представление о скрытом ГС изменилось.

В 2004 г. I. Castillo и соавт. была описана скрытая форма ВГС-инфекции, когда у лиц с гепатитом неустановленной этиологии в ткани печени и мононуклеарах периферической крови при помощи ОТ-ПЦР с последующим подтверждением гибридизацией in situ была обнаружена РНК ВГС. При этом в сыворотках крови пациентов отсутствовали как антиВГС (подтверждено двумя независимыми исследованиями ИФА), так и РНК ВГС [19].

С момента начала изучения показатели частоты распространения скрытого ГС в группах риска не были определены. Опубликованные данные о выявлении латентной инфекции свидетельствуют об относительно высокой частоте ее выявления. Так, среди 76 пациентов с гепатитом неясной этиологии у 35 установлен острый ГС, т. е. выявлена РНК ВГС на фоне отсутствия антиВГС [20].

Таблица 2. Интерпретация результатов выявления маркеров инфицирования вирусом гепатита С**

Результат анализа на ВГС			Интерпретация результата		Действие
АнтиВГС	Иммуноблот	РНК ВГС	АнтиВГС	ВГС-инфекция	Дополнительные исследования
–	не нужен	не нужна	–	–	нет
+	не проводился	не проводилась	неизвестно	неизвестно	иммуноблот или ПЦР
+	не проводился	отрицательна	неизвестно	неизвестно*	иммуноблоттинг
+	не проводился	не проводилась	+	перенесенная или текущая	оценка функции печени
+	–	не нужна	–	отсутствует	нет
+	+	не проводилась	+	перенесенная или текущая	оценка функции печени
+	+	отрицательна	+	перенесенная или текущая*	повторная ПЦР, оценка функции печени
+	+/не проводился	+	+	+	оценка функции печени
+	неинформативен	не проводилась	неинформативно	неизвестно	ПЦР, повторное определение антиВГС
+	неинформативен	+	+	+	оценка функции печени
+	неинформативен	–	неинформативно	неизвестно*	ПЦР, повторное определение антиВГС

* Однократное исследование РНК ВГС недостаточно для установления статуса инфекции, т. к. уровень вирусной нагрузки варьирует со временем.
** Данные, представленные в таблице, не учитывают возможность присутствия скрытой ВГС-инфекции.
«+» – положительный результат; «–» – отрицательный результат.

В работе P. Jain было показано присутствие среди 27 обследованных пациентов программного гемодиализа скрытого ГС в 90% случаев [21].

Среди 58 ВИЧ-инфицированных пациентов с доказанным половым путем передачи ВИЧ скрытый ГС определен у 6 (10,3%) пациентов.

Данные исследования продемонстрировали, что результаты выявления только серологических маркеров инфицирования ВГС не дают полного представления об истинном распространении этого вируса [22].

T. Pham и соавт. получили доказательства гипотезы о том, что скрытый ГС является следствием разрешения симптоматического ГС, что указывает на необходимость исследования клеток иммунной системы для эффективной диагностики ВГС-инфекции [23].

Для диагностики латентной ВГС-инфекции необходимо применение высокочувствительных методов ПЦР и специальных методик обработки материала, в первую очередь ультрацентрифугирования сыворотки для концентрации вирусных частиц. В настоящее время золотым стандартом диагностики скрытой ВГС-инфекции является определение РНК ВГС в ткани печени пациентов. Учитывая высокую травматичность процедуры биопсии печени, активно проводится поиск других надежных методов диагностики.

В 70% случаев скрытого ГС РНК ВГС обнаруживают в мононуклеарах периферической крови. V. Carreno и соавт. было показано, что при исследовании РНК ВГС в мононуклеарах периферической крови пациентов с подтвержденной скрытой ВГС-инфекцией (наличие РНК ВГС в ткани печени и ее отсутствие в сыворотке крови) результат был положительным в 57% (12/21) случаев [24].

Латентная инфекция без серологических маркеров ВГС встречается при хроническом гепатите неуточненной этиологии (криптогенном гепатите), у больных, получающих программный гемодиализ, и у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. Важность выявления скрытого ГС определяется возможностью передачи вируса при гемотрансфузиях от доноров с недиагностированной ВГС-инфекцией.

Выделяют две формы латентной HCV-инфекции:

1-й тип – выявление РНК ВГС в ткани печени у больных хроническим заболеванием печени неуточненной этиологии в отсутствие антиВГС и РНК ВГС в сыворотке;

2-й тип – определение РНК ВГС в ткани печени у больных со спонтанным разрешением острой инфекции или с элиминацией РНК ВГС из сыворотки крови в результате ПВТ при сохраняющихся в сыворотке крови антиВГС.

Исследования с использованием гибридизации in situ показали, что в сравнении со случаями гистологически подтвержденного ХГС в ткани печени пациентов со скрытой ВГС-инфекцией количество инфицированных гепатоцитов значительно ниже. Кроме этого, у таких пациентов показатели аланиновой аминотрансферазы, гамма-глобулинов и альфа-фетопротеина значительно ближе к норме. Тем не менее при скрытой ВГС-инфекции в ткани печени пациентов наблюдались выраженные признаки стеатоза [24].

Было показано, что в сравнении с пациентами с ХГС или гепатитом неуточненной этиологии у лиц со скрытой ВГС-инфекцией наблюдается усиленная пролиферация CD 8+ Т-лимфоцитов и выработка гамма-интерферона в ответ на антигенную стимуляцию белками NS3 и NS4 ВГС.

Таким образом, можно предположить, что формирование скрытой ВГС-инфекции у таких пациентов связано с перестройкой функционирования иммунной системы, проявившейся в контроле над ГС.

Второй немаловажный вопрос в данной проблеме для клинициста: нужно ли и как лечить таких пациентов?

Группой исследователей под руководством M. Pardo в 2006 г. был проведен 6-месячный курс лечения (пегилированный интерферон в сочетании с рибавирином) 10 пациентов со скрытой ВГС-инфекцией с последующим наблюдением в течение 24 нед. Несмотря на то что у 8 пациентов к окончанию ПВТ в мононуклеарах периферической крови не обнаруживалась РНК ВГС, достигнутый результат (УВО) сохранился лишь у 3 больных [25].

Скрытая ВГС-инфекция в настоящее время является хорошо описанным явлением, особенно имеющим значение для службы переливания крови и трансплантологии. Кроме того, дальнейшее ее изучение позволит лучше понять механизмы хронизации ВГС-инфекции, а также разработать новые рекомендации в отношении терапии пациентов с ХГС.

Таким образом, использование современных серологических и молекулярно-генетических методов диагностики вирусных гепатитов способствует раннему выявлению активной, скрытой и перенесенной ВГС-инфекции, а также совершенствованию контроля за эффективностью проводимой ПВТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Deuffic-Burban S., Deltenre P., Buti M., Stroffolini T. HCV burden in Europe: impact of national treatment practices on future HCV-related morbitidy and mortality through a modeling approach // Hepatol. 2010. Vol. 52. P. 678–679.
2. McHutchison J.G. Understanding hepatitis C // Am. J. Manag. Care. 2004. Vol. 10. P. 21–29.
3. Scott J., Gretch D. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review // Jama. 2007. Vol. 297. P. 724–732.
4. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003.
5. Pawlotsky J. Diagnostic testing in hepatitis C virus infection: viral kinetics and genomics // Semin. Liver. Dis. 2003. Vol. 23. P. 3–11.
6. Colin C., Lanoir D., Touzet S., Meyaud-Kraemer L., Bailly F., Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature // J. Viral. Hepat. 2001. Vol. 8. P. 87–95.

Полный список литературы вы можете запросить в редакции.