

## КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С И ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В

### Гепатит С

В настоящее время для диагностики инфекции вирусом гепатита С (ВГС) используют иммуноферментный анализ (ИФА) и рекомбинантный иммуноблоттинг (РИБ) 1, 2, 3 поколений, а также полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [19].

Обнаружение антител (АТ) к ВГС стало основным методом диагностики этой инфекции. Все используемые в настоящее время иммуноферментные тест-системы изготовлены на основе рекомбинантных или синтетических полипептидов, несущих антигенные детерминанты белка ядра и/или неструктурных белков NS3, NS4 [9,10].

В самых последних ИФА-тест-системах третьего поколения введен белок области NS5, что повысило чувствительность анализа [14]. Однако иммуноферментный метод неэффективен в ранней диагностике заболевания, так как АТ в улавливаемых титрах появляются в среднем через 6-8 недель после заражения. При этом закономерности в появлении АТ к тем или иным АГ не установлено [11].

Около 20% хронически инфицированных имеют низкие титры АТ [21] и около 10% могут быть серонегативными. Кроме того, АТ в улавливаемых титрах могут отсутствовать у лиц с иммунодефицитом вследствие ВИЧ-инфекции, иммуносупрессивной терапии и др., а также у новорожденных вследствие слабости иммунного ответа или врожденной иммунной толерантности.

В ряде ситуаций иммуноферментный анализ может давать ложноположительные результаты. Как правило, подобные результаты наблюдаются при наличии в анализируемом образце АТ к супероксиддисмутазе (например, у больных хроническим активным аутоиммунным гепатитом), совместно с которой в рекомбинантных дрожжевых клетках синтезируется белок, использующийся в качестве антигена в иммуноферментных тест-системах.

Ложноположительные результаты выявляются также у больных с гипергаммаглобулинемией, на-

блюдающейся у африканцев, больных системными заболеваниями соединительной ткани, миеломной болезнью, гепатоцеллюлярной карциномой, хроническими заболеваниями печени. Имеются сообщения о ложноположительных результатах после повторного размораживания образцов или в случае их длительного хранения при нестабильной температуре [24,27].

До настоящего времени не было установлено корреляции между появлением АТ к тем или иным белкам ВГС и стадией заболевания, течением процесса и жизненным циклом вируса, следовательно, обнаружение АТ не имеет никакой прогностической ценности, а отражает лишь наличие текущей или перенесенной инфекции.

Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике ВГС-инфекции позволяет подтвердить или отвергнуть в большинстве случаев результаты иммуноферментного исследования на антитела к ВГС [23].

Как показали эксперименты по моделированию инфекции вирусом гепатита С на шимпанзе, РНК ВГС появляется в плазме крови через 3-4 дня после заражения. У больных РНК ВГС в детектируемых количествах обнаруживают в плазме крови уже в течение 1-й недели после предполагаемого заражения [11,23]. Это позволяет диагностировать острый гепатит С задолго до сероконверсии.

Несмотря на то, что у большинства пациентов с серологически подтвержденным хроническим гепатитом С в сыворотке крови обнаруживают РНК ВГС, у части из них не выявляют детектируемые уровни вирусной РНК. Предполагают, что это может быть следствием перемежающейся вирусемии [22]. В тоже время, у большинства больных с вирусемией (93%) наблюдаются высокие концентрации РНК вируса (100000 молекул РНК в мл крови) [23].

При обследовании больных, находящихся на гемодиализе, установлено, что около 30% из них, у которых в сыворотке крови методом ПЦР обнаружены РНК ВГС, серонегативны по антителам к

ВГС [22]. В связи с ненадежностью серологических методов поднимается вопрос о необходимости использования ПЦР в качестве скринингового метода при обследовании лиц, входящих в группы риска, и доноров крови [6].

В исследовании, проведенном Асади Мобархан А.Х. и соавт. в пяти ИФА-тест-системах были протестированы 88 образцов сывороток крови (27 донорских сывороток, 37 сывороток от больных гепатитом С, панель из 24 стандартных сывороток, содержащих антитела к вирусу гепатита С, производства “Вектор Бест”, Новосибирск). Для детекции ВГС с помощью ПЦР были отобраны 9 сывороток, результаты исследования которых в разных тест-системах не совпадали (первая группа), и 12 сывороток, положительных по всем тест-системам (вторая группа). В первой группе обнаружено 3 (33,3%) ПЦР-положительные сыворотки, одна из которых серонегативная по четырем тест-системам, принадлежала донору крови. Во второй группе выявлены 3 (25%) ПЦР-отрицательные сыворотки [2].

Таким образом, около 30% сывороток, при исследовании которых получен отрицательный результат (хотя бы в одной ИФА-тест-системе), содержали РНК ВГС, что свидетельствует о необходимости использования ПЦР для решения вопроса о наличии вирусемии, особенно при исследовании донорской крови.

В настоящее время помимо простого определения наличия РНК ВГС многие исследователи говорят о необходимости определения генотипа ВГС.

У. Kobayashi и соавт.[16] считают, что уровень вирусемии до лечения интерфероном является более важным показателем прогноза терапии, чем генотип ВГС, ввиду высокой частоты смешанного инфицирования различными подтипами вируса.

В тоже время, исследованиями М. Yamada и соавт. было установлено, что количество вирусной РНК напрямую связано с носительством определенного генотипа ВГС. Так у пациентов, имеющих II генотип ВГС, концентрация вирусной РНК в сыворотке была выше, чем у пациентов с III и IV генотипами ВГС [25].

В ряде работ определяли наличие РНК ВГС в периферических мононуклеарных лейкоцитах. Хотя наличие промежуточных продуктов репликации ВГС в лейкоцитах может быть результатом фагоцитоза, в недавно проведенных исследованиях получены доказательства того, что ВГС реплицируется в периферических мононуклеарных лейкоцитах [10]. Кроме того, доказано, что активация

и/или пролиферация этих клеток может инициировать репликацию вируса, находящегося в латентной стадии. При этом проведение ПЦР с выделением РНК ВГС из лейкоцитов периферической крови по сравнению с выделением РНК вируса из плазмы позволяет увеличить эффективность полимеразной цепной реакции [4,8].

Местом преимущественной репликации ВГС является гепатоцит. Полуколичественная оценка с помощью метода РНК-ПЦР показала, что у больных хроническим гепатитом С концентрация РНК ВГС в ткани печени соответственно в 100-500 раз выше, чем в периферических мононуклеарных лейкоцитах [12]. Однако, частота выявления вируса гепатита С в периферических мононуклеарных лейкоцитах методом ПЦР не отличается от частоты выявления ВГС в печеночных биоптатах [4].

Как показали последние исследования, уровень РНК ВГС в крови напрямую связан с активностью процесса, что позволяет использовать количественную ПЦР для контроля эффективности противовирусной терапии [20].

С помощью ПЦР можно установить этиологическую и патогенетическую роль ВГС в различных внепеченочных синдромах. Упрощение, стандартизация и, возможно, автоматизация этого метода позволят использовать его при исследовании донорской крови и трансплантируемых органов.

## **Гепатит В**

Лабораторная диагностика инфекции вирусом гепатита В (ВГВ) принципиально схожа с диагностикой инфекцией ВГС. Для диагностики данной инфекции также используют определение антител к белкам ВГВ и наличие поверхностных и ядерных антигенов вируса и ДНК ВГС в сыворотке с помощью соответственно иммуноферментного метода и полимеразной цепной реакции. При рутинном лабораторном анализе сывороток крови больных гепатитом В определяют HbsAg (поверхностный антиген), HbeAg (внутренний антиген), суммарные антитела к Hbc-антигену (ядерный антиген) (анти-Hbc), IgM антитела к Hbc-антигену (IgM анти-Hbc), суммарные антитела к Hbs-антигену (анти-Hbs) и суммарные антитела к Hbe-антигену (анти-Hbe) [3,4]. Диагностическое значение маркеров гепатита В следующее:

- HbsAg - основной маркер острой или хронической формы инфекции, а также вирусоносительства;

- ДНК ВГВ - непосредственный показатель инфицирования ВГВ, свидетельствует о репликации вируса [6,7,26];

- HBeAg -маркер острой формы заболевания, наличие которого в крови достаточно кратковременно;

- IgM анти-HBc основной маркер острой формы заболевания;

- IgG (суммарные) анти-HBsAg, HBcAg, HBeAg - маркеры завершения острой формы инфекции, указывающие на формирование иммунитета к ВГВ; наличие анти-HBsAg может также являться результатом вакцинации [3,5].

По данным ряда авторов [3] в 8,2% случаев выявления ДНК ВГВ на момент ПЦР-исследования серологические маркеры ВГВ могут отсутствовать, однако они обнаруживались в дальнейшем. В этих случаях единственным маркером инфекции, указывающим, кроме того, на активность вирусной репликации, являлась ДНК ВГВ в ПЦР. Также было показано [3], что в группе пациентов, у которых ДНК ВГВ не обнаруживалась, антигены ВГВ и антитела к ним наблюдали в 62% случаев. Однако лишь в 14% из них клиническая картина заболевания соответствовала острому вирусному гепатиту, а забор крови на ПЦР-анализ проводили на поздних стадиях инфекции, когда репликативная активность вируса падает. Остальные случаи относились к микст-инфекци-

ям, т.е. наряду с маркерами ВГВ у пациентов обнаруживались как РНК, так и антигены и антитела к ним гепатитов С и Д.

По данным Kaneko S. ДНК вируса гепатита В обнаруживается у всех пациентах, имеющих HbsAg и HBeAg и в 64 % случаев у пациентов, имеющих как HbsAg и так и антитела к HBeAg в сыворотке. При этом все пациенты, у которых после перенесенного острого гепатита В в сыворотке отсутствовал HbsAg, не имели ДНК ВГВ. Таким образом, авторы данной работы делают заключение о том, что методика ПЦР - чувствительный и быстродействующий метод для обнаружения вируса гепатита В [15]. В тоже время Mason A. и соавт. показали что ДНК ВГВ может обнаруживаться у больных хроническим гепатитом В спустя 4 года после исчезновения из крови HbsAg [17].

При сравнении результатов ПЦР-анализа и выявления серологических маркеров вирусной репликации (HBeAg, антитела к HBeAg), было показано, что в 28% случаев при отсутствии HBeAg может также обнаруживаться ДНК ВГВ. Таким образом, в ряде случаев ПЦР остается единственным методом, позволяющим говорить о репликации ВГВ [3,6,21,].

#### Литература

1. Аммосов А.Д. Гепатит В. Аналитический обзор. Институт средств медицинской диагностики ЗАО "Вектор-Бест". Кольцово. 1998.
2. Асади Мобархан А.Х., Авдюхова Н.А., Максимова Р.Ф. и др. Сравнительный анализ результатов, полученных пятью иммуноферментными тест-системами на антитела к вирусу гепатита С и методом ПЦР на наличие РНК вируса гепатита С в группах доноров крови больных гепатитом С // Тезисы докл. научно-практической конференции "Гепатит В,С и D - проблемы изучения, диагностики, лечения и профилактики". Москва. 1995. с.18.
3. Волчкова Е.В., Умбетова К.Т., Чуланов В.П., Алленов М.Н. Информативность различных маркеров гепатита В. // Материалы VII съезда всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Т. 2, Москва. 28-31 января, 1997.
4. Лакина Е.И., Самохвалов Е.И., Левченко О.Г. и др. Выявление геномной РНК вируса гепатита С в сыворотке, лимфоцитах и печени больных гепатитом С. // Тезисы докладов III-ей Российской научно-практической конференции с международным участием 22-24 июня 1999 г. с. 125.
5. Малышев В.С., Минеева М.М. Иммунодиагностика вирусных гепатитов. (методические рекомендации). Москва.1999 г.
6. Писарева М.М., Морозов В.М., Тарасов К.В. и др. Полимеразная цепная реакция в комплексной диагностике гепатита В. // Материалы II Международной конференции, посвященной 75-летию института имени Пастера "Идеи Пастера в борьбе с инфекциями". С.-Петербург. 02-04.09.98.
7. Федоров Н.А., Чуланов В.П., Волчкова Е.В. и др. Использование полимеразной цепной реакции в обнаружении вируса гепатита С и вируса гепатита В. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1995. том 3, N 4.
8. Ющук Н.Д., Знойко О.О., Климова Е.А. и др. Персистенция HCV в плазме и лейкоцитах у больных с хронической HCV-инфекцией до и после лечения. // Тезисы докладов III-ей Российской научно-практической конференции с международным участием 22-24 июня 1999 г. с. 260.
9. Alter HJ. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. // Hepatology 1992; 15: 350-353.

10. Chaudary RK, McLean C. Detection of antibody to hepatitis C virus by second-generation enzyme immunoassay. // *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 702-704.
11. Farci P, London WT, Wong DC et al. The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. // *J Infect Dis* 1992; 165: 1006-1011.
12. Gil B., Qian C., Menw-Bo J.I. et al. // *Hepatology*. - 1993. - Vol. 18, 5. - P.1050-1054.
13. Gretch DR, dela Rosa C, Carithers Jr RL, Willson RA, Williams B, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. // *Ann Intern Med* 1995;123:321-9.
14. Huber KR, Sebesta C, Bauer K. Detection of common hepatitis C virus subtypes with a third-generation enzyme immunoassay. // *Hepatology*, 1996; 24: 471-473.
15. Kaneko S., Miller R.H., Di Bisceglie A.M., Feinstone S.M., Hoofnagle J.H., Purcell R.H. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. // *Gastroenterology*, 1990., Vol 99, 799-804.
16. Kobayashi Y., Watanabe S., Konisht M. et al. // *Hepatology*. - 1993. - Vol.18, 6. - P.1319-1325.
17. Mason A.L., Xu L., Guo L., et al. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. // *Hepatology*. 1998;27:1736-1742.
18. Mutter H.M., Pfaff E., Goeser T. et al. // *J. Gen. Virol.* - 1993. - Vol.74. - P.669-676. N4
19. 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*, June 1998, Vol. 27, No. 6 p. 1700-1702,
20. Pontisso P., Bellati G., Brunetto M. et al. Hepatitis C virus RNA profiles in chronically infected individuals: do they relate to disease activity? // *Hepatology*, February 1999, Vol. 29, No. 2., p. 585-589.
21. Quint WG, Heijtkink RA, Schirm J, Gerlich WH, Niesters HG. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection // *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33: 225-228.
22. Seelig R., Renz M., Seetig H.P. // *Ann.Med.* - 1992. - Vol.24. - P. 225-230.
23. Weiner A.J., Shyamala V., Hall J.E. et al. // *Diagnosis of human viruses by polimerase chain reaction technology* / Eds. Y.Becker, G.Darai. Berlin, 1992. - P.86-100.
24. Weiner AJ, Truett MA, Rosenblatt J, et al. HCV testing in low-risk population. *Lancet* 1990; 336: 695.
25. Yamada M, Kakumu S, Yoshioka K et al. // *Hepatitis C virus genotypes are not responsible for development of serious liver disease.* *Dig Dis Sci* 1994 Feb;39(2):234-239
26. Zaaijer H.L., F ter Borg, Cuypers H.T., Hermus M.C., Lelie P.N. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA // *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, Vol 32, No. 9, 2088-2091.
27. Zhang H.Y., Kuramoto I.K., Mamish D. et al. // *J. Clin. Microbiol.* - 1993. - Vol.31. - P.606-609.