

**Е. Д. Чикова, Г. А. Цветовская, Н. П. Пичко,  
Л. А. Колбина, И. Ю. Туманова, Д. В. Зиновьева**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

Центр новых медицинских технологий в Академгородке  
ул. Пирогова, 25/4, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: labor@cnmt.ru

## **СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С**

Представлены данные по распространенности вируса гепатита С (ВГС) среди здоровых лиц – доноров крови, и пациентов с различными видами патологии в Новосибирске и Новосибирской области. Скрининговое тестирование образцов крови методом ИФА показало снижение инфицированности ВГС доноров в 1,9 раза с 2003 г., в течение последних 4-х лет она не превышала в среднем 1,6 %. Выявляемость РНК ВГС у пациентов, обратившихся за медицинской помощью в 2007 г., по данным ПЦР составила 35 % случаев. Изучена частота встречаемости генотипов ВГС: показано, что преобладающим является 1b генотип. Среди пациентов, у которых определен уровень виремии, 64 % составляют лица с высокой вирусной нагрузкой. Проанализирована диагностическая значимость различных методов лабораторной диагностики вирусного гепатита С, показана важность комплексного подхода с использованием молекулярно-биологических, иммунологических и биохимических методов исследования для снижения инфицированности населения ВГС.

*Ключевые слова:* вирусный гепатит С, диагностика, распространенность, Новосибирск.

Вирусный гепатит С (в отличие от гепатитов А и В) является наиболее трудно диагностируемым и резистентным к современным методам лечения. По данным ВОЗ, более 500 млн человек в мире являются носителями этой инфекции. В России количество инфицированных ВГС приближается к 5 млн. Частота обнаружения антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) среди здоровых детей колеблется от 0,5 до 4 % в зависимости от возраста, причем число инфицированных вирусом нарастает с увеличением возраста. По данным Гематологического центра РАМН, в России в среднем около 4 % доноров резерва инфицированы ВГС. В то же время известно, что ВГС передается преимущественно парентеральным путем при переливании зараженной крови и ее компонентов и представляет наибольшую угрозу населению. В последние годы резко возросла инфицированность ВГС среди лиц, принимающих наркотики внутривенно.

Внимание исследователей к проблеме диагностики, профилактики и лечения ВГС определяется высокой степенью распро-

странности и хронизации заболевания (до 80 % пациентов) с последующим развитием цирроза печени и возможным исходом в гепатоцеллюлярную карциному. Для подтверждения диагноза ВГС ведущую роль играют результаты лабораторного исследования, однако пациенты с гепатитами неуточненной этиологии среди обследованных методом ИФА, а также больные с маркерами двух и более вирусных гепатитов (микс-гепатитов) представляют значительную диагностическую проблему [1]. Внедрение в широкую практику диагностических лабораторий иммунологических методов исследования, основанных на взаимодействии антиген-антитело и разработки тест-систем для ИФА, позволяет в 98,5 % случаев диагностировать и устанавливать этиологию вирусных гепатитов. Следует отметить, что методом ИФА улавливаются только антитела, но не антигены вируса гепатита С. От момента инфицирования до первого появления в крови антител проходит не менее 6–8 недель, в ряде случаев этот период может затянуться до двух лет

[2; 3]. «Диагностическое серонегативное окно», которое образуется с момента инфицирования до появления антител можно обнаружить при определении в крови РНК ВГС молекулярно-биологическими методами диагностики. Характеристика вируса, принадлежность его к тому или иному типу, оценка активности процесса также возможны с использованием ПЦР. В этой связи совершенствование методов диагностики гепатита С, внедрение новейших разработок в области биологии и медицины в клиническую диагностическую практику, детальный анализ данных по распространению генотипов ВГС в определенном регионе представляется важным для разработки мер профилактики, лечения ВГС и снижения заболеваемости в целом.

**Целью** работы явилось определение частоты встречаемости ВГС среди жителей Новосибирска и Новосибирской области, а также количественная и качественная характеристика вируса в данном регионе.

#### **Материал и методы**

За период 2003–2007 гг. методом ИФА обследовано 7 228 доноров, в крови которых определяли суммарные антитела вируса гепатита С (ВГС) и поверхностный антиген вируса гепатита В (ВГВ) – HBsAg. Обследовано также более 5 000 пациентов по направлениям гастроэнтерологов, инфекционистов, гепатологов, гинекологов с целью выявления вирусных гепатитов и / или дифференциальной диагностики острых и хронических заболеваний печени. В сомнительных случаях выполнялись подтверждающие тесты, исследовалась сыворотка крови на анти-ВГС-IgG к core-белку и неструктурным белкам вируса, а также использовались молекулярно-биологические методы выявления РНК ВГС.

Для выявления и подтверждения наличия иммуноглобулинов класса М и G к ВГВ и ВГС использовали наборы реагентов HBsAg-ИФА-БЕСТ, БЕСТ-анти-ВГС («Вектор-Бест», Россия).

Методом ПЦР в 2007 г. проанализированы образцы плазмы крови от 532 пациентов на наличие РНК ВГС. Для ПЦР-диагностики использовали наборы реагентов производства ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ):

для выделения РНК ВГС – набор «РИБО-сорб», для обратной транскрипции – «Ревверта-L», для амплификации – «АмплиСенс HCV-240 / ВКО-440».

Определение генотипов проводили с помощью набора «Генотипирование кДНК HCV» (ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ), а также набора «Генотипирование кДНК HCV» (НПФ «ДНК-технология», Россия). Часть образцов, в которых была выявлена РНК ВГС, охарактеризована количественно с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс HCV-Монитор-FRT» в режиме реального времени с использованием амплификатора Rotor-Gene-3000 («Corbett Research», Австралия). Особенностью данного метода является детекция продукта амплификации непосредственно во время проведения ПЦР с помощью флуоресцентного зонда, гибризованного с ампликоном, что позволяет отказаться от отдельной стадии детекции продуктов ПЦР, ведет к сокращению времени проведения анализа и уменьшению вероятности контаминации. Достоинства данного подхода состоят не только в простоте и скорости выполнения анализа, но и в его высокой чувствительности и специфичности.

Средний возраст пациентов оказался равным  $35,0 \pm 1,6$  лет. Пациенты с выявленной РНК ВГС были разделены на две возрастные группы: 1-я группа – лица моложе 30 лет (51 человек), 2-я – старше 30 лет (103 человека).

#### **Результаты исследования и обсуждение**

Скрининговое тестирование образцов крови методом ИФА показало снижение инфицированности ВГС доноров в 1,9 раза с 2003 г., в течение последних 4-х лет она не превышала в среднем 1,6 % случаев. Это указывает на более тщательный отбор доноров по клиническим и лабораторным данным.

Методы молекулярно-биологической детекции при обследовании доноров использовались выборочно, тем не менее в единичных случаях в 2003 и 2005 гг. у серонегативных доноров была выявлена РНК ВГС. Известно, что при традиционном иммуноферментном исследовании маркеров вирус-

ных гепатитов у доноров не исключается ситуация переливания крови в период «сериологического окна» [4; 5]. В некоторых случаях антитела к ВГС могут не обнаруживаться при ускользании вируса от иммунного ответа в силу циркуляции в крови так называемых «квазивидов» – генетически отличающихся друг от друга вариантов вируса гепатита С, или при запаздывании иммунного ответа в ранние сроки после инфицирования, особенно у лиц с гиперглобулиемиями разного генеза, то есть позднем появлении антител (от 6–8 недель до 2 лет) [2; 3; 6].

Гарантией полной вирусной безопасности донорской крови и ее компонентов может стать разработка международных стандартов, использующих дополнительно к иммуноферментному анализу и генамплификационные методы исследования [7].

Из 532 обследованных методом ПЦР образцов плазмы крови у 186 (34,9 %) пациентов была выявлена РНК вируса гепатита С. Частота выявляемости ВГС в зависимости от пола и возраста пациентов проанализирована по данным 154 случаев (табл. 1).

Во 2-й возрастной группе вирус гепатита С обнаруживался в 2 раза чаще, при этом, если у пациентов до 30 лет частота выявления гепатита С не зависела от пола (см. табл. 1), у лиц старше 30 лет РНК вируса гепатита С в 1,3 раза чаще выявлялась у мужчин. Эти данные могут иметь значение при прогнозировании риска хронизации острой вирусной инфекции.

Так, по мнению К.-П. Майер [2], при инфицировании ВГС в возрасте между 20 и 30 годами цирроз развивается примерно у каждого пятого пациента, частота цирроза печени возрастает до 70 % при инфицировании в возрасте старше 50 лет. Однако более достоверным прогностическим факто-

ром развития ВГС-инфекции и ответа на противовирусную инфекцию является генотип ВГС [3; 6; 8].

Определение генотипа ВГС нами было проведено у 66 пациентов. При этом оказалось, что в целом в группе обследованных тип 1а не зарегистрирован ни у одного пациента, тип 1b выявлен у 41 пациента (63 %), тип 3а – у 10 (15,4 %), тип 2 (в том числе 2а и 2b) – у 8 (12,3 %). У 6 лиц были выявлены смешанные варианты: у 4 пациентов (6,2 %) – 1b + 3а, у 2 (3,0 %) – 1b + 2b. У одного пациента мы обнаружили генотип 2к, который практически не встречается у лиц белой расы. Отмечено также увеличение распространенности типа 1b по сравнению с 2005 г. (48,6 %).

Исследования О. И. Матрос и соавт. [9] по распределению генотипов ВГС в Новосибирской области и Алтайском крае (данные 2001–2003 гг.) обнаруживают значительное увеличение доли генотипа 3а (до 44,8 и 27,7 % соответственно регионам) и уменьшение доли генотипа 1b (до 50–57 %). Это является отличительной особенностью данных регионов по сравнению с Омской областью, где доля генотипа 1а составляла 14 %, и практически такой же процент (18 %) приходится на долю типа 1b ВГС [10]. В целом по России в 1997 г. преобладающим генотипом являлся 1b (68,9 %) [11]. Однако в последние годы ситуация несколько изменилась. По данным ряда авторов [6; 12], в Европейской части России доля 1b генотипа уменьшилась в среднем до 50 %, при этом существенно возросла (с 10 до 35 %) доля пациентов, инфицированных 3а генотипом вируса гепатита С.

В табл. 2 приведены данные, полученные нами при распределении генотипов ВГС в зависимости от возраста.

Таблица 1. Частота инфицированности ВГС в зависимости от возраста и пола среди обследованных лиц, абс. (%)

Группы пациентов	Частота инфицированности	
	Мужчины	Женщины
1-я группа	27 (17,5)	24 (15,6)
2-я группа	58 (37,7)	45 (29,2)
Всего:	85 (100,0)	69 (100,0)

Таблица 2. Распределение генотипов ВГС у жителей г. Новосибирска в зависимости от возраста, %

Группы пациентов	Генотип вируса гепатита С			
	1a	1b	2	3a
1-я группа	–	53,3	20,0	26,7
2-я группа	–	82,8	10,3	6,9

В обеих возрастных группах преобладал генотип 1b, однако во 2-й группе доля его увеличилась в 1,5 раза, а доля генотипов 2 и 3a уменьшилась в 2 и 3,8 раза соответственно (см. табл. 2). Кроме того, нами отмечено, что увеличение доли генотипа 1b во 2-й возрастной группе наиболее выражено среди женщин – более чем в 2 раза, а уменьшение доли генотипа 2 среди мужчин – более чем в 3 раза. Это отличается от данных по распределению генотипов ВГС в зависимости от возраста в г. Екатеринбурге, где в группе лиц моложе 30 лет преобладающим являлся генотип 3a (62,5 %), тип 1b составлял 37,5 %, тогда как генотип 2 не был обнаружен. В группе лиц старше 30 лет основным являлся генотип 1b (68,7 %) [13].

По нашему мнению, определение генотипа ВГС в определенной географической зоне имеет большое практическое значение, поскольку является одним из критериев, определяющих выбор схемы и длительности курса лечения. С другой стороны, доминирование того или иного типа ВГС может указывать на пути распространения вирусной инфекции: генотип 3a часто ассоциируют с внутривенным употреблением наркотиков, генотип 1b – с гемотрансфузиями.

До настоящего времени остается дискуссионным вопрос о значимости количественного содержания вируса в крови при определении степени тяжести патологического процесса и выбора лечебной тактики. Однако большинство авторов сходится на том, что лучшие шансы на успех интерферонотерапии имеют пациенты с низким уровнем виремии при первичном обследовании. По мнению В. П. Чуланова и соавт. [14], определение концентрации РНК ВГС в плазме крови в настоящее время является обязательным при назначении противовирусной терапии пациентам с хроническим ВГС и оценке эффективности лечения. По данным консенсусной конференции Нацио-

нальных институтов здоровья США (2002), снижение вирусной нагрузки менее чем в 100 раз через 3 месяца комплексного лечения является признаком неэффективной терапии.

С целью количественного определения ВГС в плазме крови нами обследовано 90 пациентов методом ПЦР в режиме реального времени. У 58 лиц концентрация РНК ВГС, определенная в плазме крови, обозначалась как высокая и составила более  $10^5$  МЕ/мл, у 32 больных уровень виремии в крови не превышал  $10^5$  МЕ/мл и обозначался как низкая вирусная нагрузка. Определение генотипов среди 50 пациентов с выявленной вирусной нагрузкой обнаружило, что во всем диапазоне измерений преобладающим является 1b тип.

Важным, на наш взгляд, является тот факт, что среди лиц с уровнем виремии порядка  $10^5$  МЕ/мл значения активности печеночных ферментов аланинаминотрансферазы и гемаглютамилтрансферазы (АЛат и ГГП), как правило, не отличались от нормальных значений или незначительно (в 1,5–2 раза) превышали границы норм. Иначе говоря, не прослеживалось связи между вирусной нагрузкой и цитолизом гепатоцитов. Только в единичных случаях активность АЛат регистрировалась на уровне 300–500 МЕ/мл.

В динамике с интервалом 2–9 месяцев нами обследованы 9 пациентов. Из них только у одного человека с генотипом 2 через пять месяцев вирусная нагрузка уменьшилась с  $1,2 \times 10^5$  до 500 МЕ/мл, что является свидетельством эффективности комплексной терапии. У 1 из 9 пациентов при отсутствии лечения вирусная нагрузка через три месяца увеличилась в 10 раз и составила  $5 \times 10^5$  МЕ/мл, у другого через 8 месяцев выросла в 100 раз (с  $2,0 \times 10^3$  до  $2,8 \times 10^5$  МЕ/мл). У остальных больных вирусная нагрузка оставалась на одном и том же уровне. Возможно, это были пациенты

с «постоянным» типом уровня вирусемии, что, по мнению Е. Н. Ильиной и соавт. [6], является хорошим прогностическим признаком эффективного ответа на интерферонотерапию.

Полученные нами данные согласуются со сведениями, имеющимися в литературе [6; 15]. Они дают основание полагать, что количественное определение уровня вируса в плазме крови не отражает тяжести патологического процесса, однако может иметь значение для оценки эффективности противовирусной терапии и прогнозирования хронизации ВГС.

При сопоставлении результатов исследования методами ПЦР и ИФА показано, что у 36 пациентов с выявленной РНК ВГС не было обнаружено антител либо к соге-белку, либо к отдельным неструктурным NS3-, NS4-, NS5-белкам, либо к их суммам. Отсутствие соге-белка при обнаружении РНК ВГС в сыворотке можно объяснить низкой концентрацией белка нуклеокапсида у таких пациентов или циркуляцией в сосудистом русле соге-белка в составе иммунных комплексов на поздних стадиях инфицирования ВГС [15]. Обнаруженные у ряда пациентов разные комбинации неструктурных белков могут указывать на различные стадии жизнедеятельности вируса.

Наличие РНК В-ГС при отсутствии антисоге, анти-NS3, -NS4 у пациентов позволяет диагностировать инфекционный процесс на начальной стадии. Диагностическая ценность обнаружения в крови РНК ВГС снижается из-за высокой чувствительности метода ПЦР и возможности получения ложноположительных результатов [2]. Однако девятилетний опыт работы дает основание утверждать, что высокая степень организации работы ПЦР-лаборатории (разделение рабочих процессов), соблюдение мер эпидемиологического режима, а также проведение наряду с положительным как минимум двух отрицательных контрольных исследований и возможность проведения анализа в режиме реального времени позволяет свести к нулю ошибки и значительно повысить эффективность диагностики.

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о значительном распространении инфици-

рованности вирусом гепатита С населения Новосибирска. Если вирусоносительство среди доноров крови по сравнению с 2003 г. снизилось и в последние годы не превышало 1,6 %, то среди пациентов, обратившихся в лабораторию генодиагностики с различными видами патологии, 35 % человек оказались инфицированными ВГС. Преобладающим генотипом среди инфицированных является 1b вариант, неблагоприятный с патофизиологической точки зрения. Определение генотипа вируса, а также количественная оценка уровня вирусемии, играют существенную роль, поскольку наиболее благоприятный ответ на противовирусное лечение наблюдается у лиц молодого возраста с низким уровнем вирусемии и генотипом 2 или 3.

Диагностика ранних случаев острого ВГС без клинических проявлений и с нормальным уровнем трансаминаз, а также количественная характеристика вирусной нагрузки и определение генотипа вируса на сегодняшний день возможны только с использованием ПЦР. В то же время особенности течения ВГС с волнообразным изменением в крови концентрации РНК ВГС и иммуноглобулинов диктуют необходимость обязательного комплексного обследования доноров и пациентов методами ИФА и биохимической оценки функции печени наряду с ПЦР-диагностикой. Лишь такой подход позволит своевременно диагностировать различные стадии гепатита С, получать объективную информацию о протекании инфекционного процесса и тем самым значительно снизить число инфицированных среди пациентов, использующих донорскую кровь, а также населения в целом. Высокий процент инфицированности ВГС среди медицинских работников указывает на необходимость использования комплексного и тщательного подхода к выявлению вирусных инфекций при профилактических осмотрах лиц, имеющих контакт с потенциально инфицированным биологическим материалом.

### Список литературы

1. *Проблемы* этиологической диагностики вирусных гепатитов / В. М. Агафонов, В. Ф. Пильников, А. Л. Волчецкий

и др. // Вирусные гепатиты: решенные и нерешенные проблемы: Материалы Первого российско-итальянского симпозиума. СПб., 2000. С. 55.

2. *Майер К.-П.* Гепатит и последствия гепатита: Пер. с нем. М., 2001.

3. *Жибурт Е. Б. и др.* НАТ-скрининг вирусных инфекций у доноров повышает безопасность крови / Е. Б. Жибурт, Н. А. Федоров, П. В. Рейзман // Клиническая лабораторная диагностика. 2006. № 12. С. 22–23.

4. *Костинова М. П. и др.* Вирусные гепатиты В и С / М. П. Костинова, Т. В. Чередниченко, Асади Мобархан Али Хоссейн. Ижевск, 2004.

5. *Колупаев В. Е., Яшина Т. В.* Новое поколение ИФА тест-систем для лабораторного скрининга гепатита С // Лаборатория. 2007. № 1. С. 3–7.

6. *Хронические вирусные заболевания печени* // Е. Н. Ильина, Е. Е. Фомина, Е. К. Артемов и др. М., 2005.

7. *НАТ-минипул-геноскринирование* крови на основе международных стандартов ВОЗ – гарантия вирусной и бактериальной безопасности реципиентов / Н. А. Федоров, А. А. Елов, Е. Г. Черкасов и др. М.; Новосибирск; Франкфурт-на-Майне, 2004.

8. *Peginterferon alpha-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3* / A. Mangia, R. Santoro, N. Minerva et al. // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. P. 2609–2617.

9. *Генотипическое разнообразие* изолятов вируса гепатита в Алтайском крае /

О. И. Матрос, Г. В. Кочнева, Е. В. Чуб и др. // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб. тр. М., 2004. С. 254–256.

10. *Пахалкова Е. В., Утянская И. Г.* Распространение субтипов ВГС на территории Омска и Омской области // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб. тр. М., 2004. С. 261–265.

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

12. *Беляева Л. В., Желтякова О. В.* Распространенность генотипов вируса гепатита С в Самарской области // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб. тр. М., 2004. С. 236–237.

13. *Циганко Е. В., Шварцкова Т. А.* Распределение генотипов вируса гепатита С в Екатеринбурге // Генодиагностика инфекционных заболеваний: Сб. тр. М., 2004. С. 277–278.

14. *Чуланов В. П., Шипулин Г. А.* Роль молекулярных методов диагностики в оптимизации алгоритмов лечения вирусного гепатита С // Лабораторная медицина. 2006. № 8. С. 1–10.

15. *Вишневская Т. В.* Маркеры вирусного гепатита С в клетках и в сыворотке крови: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006.

*Материал поступил в редколлегию 27.02.2008*

**E. D. Chikova, G. A. Tsvetovskaya, N. P. Pichko, L. A. Kolbina, I. Yu. Tumanova, D. V. Zinovyeva**

### **Modern Approaches to Laboratory Diagnostics of Virus Hepatitis C**

Hepatitis C virus with parenteral route of infection is one of the major etiological agents liver diseases existing throughout the world. It was shown that quantity HCV infected blood donor samples were reduced from 3 (2003) to 1.7% (2004) and during four last years were no more 1.6%. Blood plasma samples were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). The positive plasma was registered in 35.0% cases. The determination of genotype was carried out for 66 patients. The presence of genotype 1b was prevailed. The quantity of HCV RNA in blood plasma samples was determined by Real-time PCR. Blood plasma samples with HCV RNA more  $10^5$  ME per ml was prevailed and composed 64.0%. The significance of laboratory diagnostic different methods was analyzed. Our findings show that complex approach with using of molecular-biology, immunology and biochemistry methods are significant for reduced HCV infection.

*Keywords:* virus hepatitis, diagnostics, predominate, Novosibirsk.