

ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА С

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

**Нижний Новгород
2007**

Маянский А.Н., д.м.н, профессор,
Нижегородская государственная медицинская академия
Обрядина А.П. к.б.н., Уланова Т.И. д.б.н., Блинова Т.В. д.м.н.,
Бочкова Г.А. к.х.н, Бурков А.Н. д.м.н., профессор,
НПО "Диагностические системы"

СОДЕРЖАНИЕ

| | | |
|----|-----------------------------------|----|
| 1 | Вирусология | 3 |
| 2 | Вариабельность | 5 |
| 3 | Эпидемиология | 6 |
| 4 | Патология | 9 |
| 5 | Патогенез | 10 |
| 6 | Иммунитет | 14 |
| 7 | Принципы лабораторной диагностики | 15 |
| 8 | Определение антител к HCV | 15 |
| 9 | Обнаружение РНКНСV | 20 |
| 10 | Определение HCV-антигенов. | 21 |
| 11 | Принципы антивирусной терапии | 21 |
| | Основная литература | 30 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ | 34 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ 2 | 35 |

Гепатит С является инфекцией, возбудитель которой распространяется среди людей почти исключительно путем абиегенной "кровяной" трансмиссии. Вирусом гепатита С (HCV) инфицировано около 3% населения Земного шара, и фактически речь идет о пандемии, которая по масштабу в 5 раз превосходит зараженность вирусом СПИДа. После резкого снижения гемотрансфузионного гепатита С (благодаря антивирусному контролю донорской крови) инфицированность поддерживается за счет парентеральных инъекций наркотиков и (в меньшей степени) других процедур, связанных с повреждением кожи и слизистых оболочек. HCV-инфекция относится к индикаторам социального и медицинского благополучия общества. Именно так она рассматривается в ряде документов, изданных на государственном уровне.

Заражение HCV в 50-80% случаев ведет к персистенции вируса, которая служит главной причиной хронического гепатита и его тяжелейших осложнений - цирроза и первичного рака печени. В относительном измерении их вероятность не очень велика¹, но учитывая масштаб заражения, число таких больных значительно. На долю HCV приходится около 40% всех случаев хронического гепатита. В большинстве это молодые люди в возрасте 15-29 лет.

Современные методы диагностики позволяют с высокой точностью выявлять HCV-инфекцию и следить за ее эволюцией. Это служит основой для превентивных мероприятий и антивирусной терапии.

Открытие вируса гепатита С явилось беспрецедентным 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). 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 и даже сборку вирусоподобных частиц, однако до сих пор единственной моделью, наиболее полно воспроизводящей HCV-инфекцию, является заражение шимпанзе.

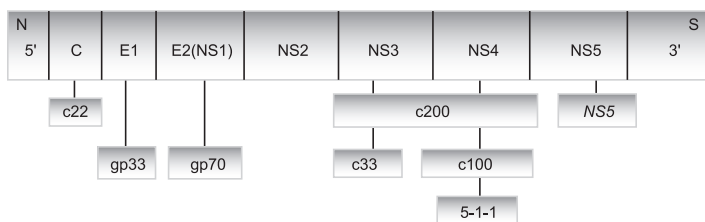
HCV классифицирован как единственный вид рода *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*, куда входят такие (наиболее родственные ему) вирусы как вирус желтой лихорадки, вирус денге и вирус гепатита G^{1a}. Это мелкий (30-38 нм в диаметре), РНК-содержащий, оболочечный вирус. Геном представлен линейной одноцепочечной плюс-РНК (примерно 9600 нуклеотидов). Она кодирует единственный полипротеин (3011 аминокислот), который расщепляется клеточными и вирусными протеазами на 3 структурных и 7 неструктурных белков. Структурные белки входят в состав нуклеокапсида (С-белок, от англ. Core -

¹ Для лиц, зараженных до 20 лет вероятность цирроза печени в первые двадцать лет не превышает 10%; вероятность развития гепатоцеллюлярной карциномы на фоне HCV-цирроза составляет около 3% в год. По данным ВОЗ гепатоцеллюлярная карцинома является наиболее распространенной злокачественной опухолью, составляя более 18% всех раковых заболеваний в мире.

сердцевина) и оболочки/суперкапсида (E1 и E2, от англ. Envelope - оболочка). На своей поверхности С-белок несет высококонсервативные В-клеточные эпитопы, существование которых важно для выявления антител к вирусу. Неструктурные белки не включаются в вирион. Они участвуют в репликации вируса, выполняя функции различных ферментов (протеазы, РНК-зависимой РНК-полимеразы, геликазы) (Рис.1). Для неструктурных белков приняты

обозначения NS1 (p7), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (NS - от англ. Non-structural).

На каждом из концов РНК имеется не-транслируемый участок—UTR (от англ. Untranslated Region; 329-341 нуклеотидов). UTR играют важную роль в репликации вируса, обеспечивая восприятие регуляторных клеточных сигналов². Это (наряду с неструктурными белками) привлекает к ним интерес как к потенциальным мишеням для антивирусной терапии.



- C - КОР (НУКЛЕОКАПИД)
- E1 - СУПЕРКАПИД
- E2 - СУПЕРКАПИД
- NS1 - ФУНКЦИЯ НЕУСТАНОВЛЕНА
- NS2 - ПРОТЕАЗА
- NS3 - ПРОТЕАЗА ГЕЛИКАЗА
- NS4 - КОФАКТОР NS3ПРОТЕАЗЫ (NS4A)
КОФАКТОР РЕПЛИКАТИВНОГО КОМПЛЕКСА (NS5B)
- NS5 - КОФАКТОР РЕПЛИКАТИВНОГО КОМПЛЕКСА (NS5A)
РНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА (NS5B)

Вариабельность

Вирус гепатита С относится к РНК-содержащим вирусам, для которых характерна высокая частота мутаций, связанных с некорректируемыми ошибками репликации РНК. Значительная генетическая вариабельность РНК объясняет длительное носительство вируса, большую вероятность хронизации процесса,

трудности в терапии и в создании эффективных вакцин. На основании гомологии нуклеотидных последовательностей РНК предложено дифференцировать 6 основных генотипов и более сотни субтипов, обозначаемых латинскими буквами в порядке их открытия (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a и т.д.). Они неодинаково распространены в различных регионах Земного шара (рис 2).

^{1a} Типовой род этого семейства, возбудитель желтой лихорадки, тоже обладает гепатотропно-стью и свое название получил по наиболее яркому симптому гепатита - желтухе (лат. flavus - желтый).

² UTR (особенно 5'-UTR) высококонсервативны, т.е. имеют идентичную структуру (последовательность нуклеотидов) у всех вирусных изолятов. Это делает их универсальным объектом в генодиагностике, позволяя использовать стандартные праймеры для полимеразной цепной реакции (см. ниже).

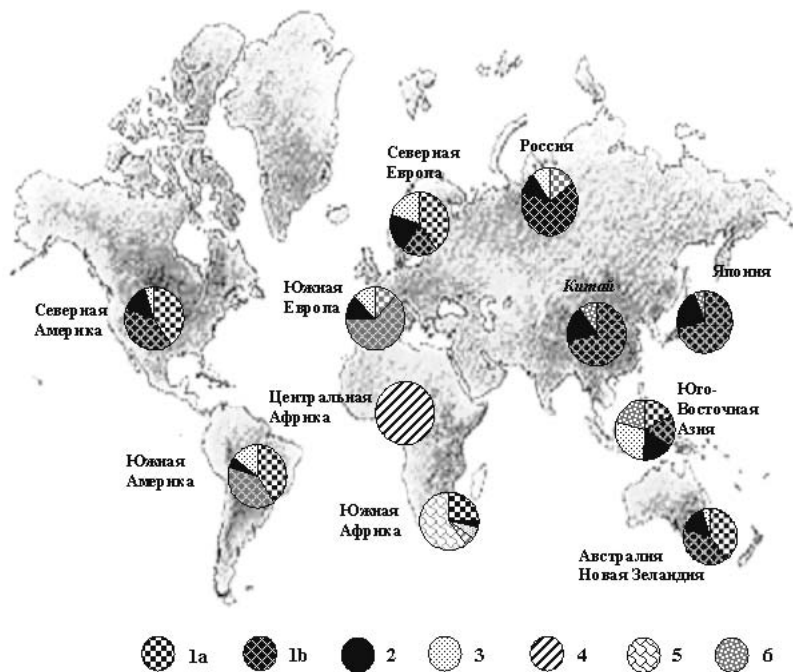


Рис.2. Географическое распределение генотипов вируса гепатита С.

Некоторые универсальны, другие циркулируют лишь в ограниченных географических зонах. Генотип 1b является преобладающим на юге Европы, в Китае, Японии, России (50-80%). В США и странах Южной Америки, на севере Западной Европе чаще встречаются генотипы 1a и 1b, за ним следуют генотипы 2 и 3. Генотип 4 преобладает в Северной и Центральной Африке, в то время как на юге континента основным является генотип 5. Генотип 3 встречается почти всюду и является основным в Австралии и Юго-Восточной Азии. Генотип 6 также распространен в Юго-Восточной Азии и является основным типом во Вьетнаме, одним из основных в Таиланде, Индонезии.

Определение генотипа имеет большое значение для предсказания эф-

фективности противовирусной терапии, прогноза тяжести течения и исхода заболевания. Гепатит, вызванный генотипом 1b, относительно резистентен к интерферону—признак, контролируемый NS5A, и чаще приводит к циррозу, хроническому гепатиту и гепатоцеллюлярной карциноме (1a).

Кроме прогностических целей расшифровка генотипа интересна в плане этиологии инфекции. Субтипы 1a и 3b чаще ассоциируются с "шприцевым" гепатитом у лиц, употребляющих парентеральные наркотики, в то время как субтип 1b связан с гемотрансфузионным путем передачи.

Генетическая изменчивость HCV проявляется и по ходу инфекции. В зараженном организме вирус представлен популяцией близкородственных клонов

с небольшими (1-2%) отличиями в структуре генома. Это так называемые "квазивиды" (quasispecies). Они играют большую роль во взаимоотношениях с хозяином, обеспечивая уклонение от эффекторов иммунитета, расширение тканевого тропизма (спектра инфицируемых клеток) и повышение устойчивости к антивирусной терапии. Наиболее вариабельны области генома, кодирующие оболочечные белки, прежде всего E2. Здесь находится один из двух гипервариабельных участков—HVR-1 (от англ. Hypervariable Region), который несет важную функциональную нагрузку, инициируя взаимодействие с клеточными рецепторами. Это делает его носителем протективных эпитопов, индуцирующих образование вируснейтрализующих антител. К сожалению, эффективность последних быстро падает, так как квазиспецифичность помогает вирусу ускользать от иммунного ответа—"ускользающие мутанты" (англ. escape mutants).

Эпидемиология

Источником заражения служат больные острыми и хроническими формами HCV-инфекции. Основное значение имеют лица с бессимптомным и малосимптомным течением. Будучи глобальной инфекцией, гепатит С неодинаково распространен в различных регионах Земного Шара. Это доказывают результаты обследования доноров крови, среди которых процент

серопозитивности (наличие HCV-антител) колеблется от 0,01% до 05% (Северная Европа, северные регионы США, Канада), от 6,0% до 28,0% (Египет)¹. В России показатели анти-HCV серопозитивности колеблются от 0,6% (северные регионы) до 3,0% (Южная Сибирь, Дальний Восток) и в среднем составляют 1,5% [3]. Если учесть, что у 3 из 4 серопозитивных лиц имеется вирусемия, то носителями активной HCV-инфекции являются около 2 млн жителей России².

Формально эпидемиология гепатита С достаточно проста: вирус передается в основном при контакте с зараженной кровью и ее продуктами. По ретроспективным оценкам анти-HCV антитела обнаруживаются в большинстве образцов донорской крови, переливание которой осложнилось гепатитом. У гемофиликов, получавших в прошлом многократные инъекции антигемофильных препаратов, антитела к HCV выявляются в 50-80% случаев. Высокий процент инфицированности (в 20 и более раз выше, чем у здоровых) имеют больные на постоянном гемодиализе. Выбровка доноров на основе определения маркеров вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции и обеззараживание препаратов крови резко сократили посттрансфузионное HCV-инфицирование (рис.3.). Вероятность нозокомиального заражения работников здравоохранения от случайных уколов шприцевыми иглами после инъекций HCV-инфицированным больным по разным данным колеблется от 0 до 10%³.

¹ Одной из причин высоких показателей HCV-серопозитивности в Египте может быть парентеральное лечение шистосомоза.

² Для сравнения те же показатели для США оцениваются как 1,8% и 2,7 млн [25].

³ Согласно "правилу трех" риск "шприцевого" заражения определяется следующими усредненными цифрами: гепатит В - 30%, гепатит С - 3%, ВИЧ-инфекция - 0,3% [25]. Существенное влияние оказывают дозировка, размер иглы и глубина инкуляции.

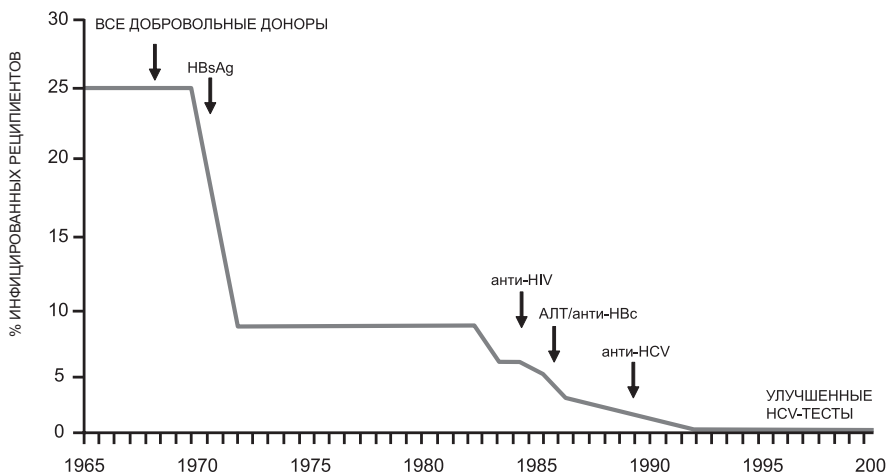


Рис.3. Зависимость числа инфицированных вирусным гепатитом С от совершенствования контроля качества донорской крови. HJ Alter and Tobler and Busch, Clin Chem 1997

Опасность заражения при переливании крови, негативной по анти-HCV оценивается как 1:103 000. Она связана с вирусемией в фазе так называемого "окна" (до появления антител). Ее продолжительность не превышает 12 недель после инфицирования, что почти в два раза меньше риска по посттрансфузионному гепатиту В (1:63 000) и примерно в 5 раз выше вероятности заражения ВИЧ-1 (1:493 000) [25]. С введением в гемотрансфузиологию генодиагностики (ПЦР), позволяющей сократить период окна до трех недель, ожидается дальнейшее (практически до нуля) снижение опасности заражения через препараты крови.

Основную группу риска составляют лица, употребляющие парентеральные наркотики. Они играют ведущую роль в современной эпидемиологии гепатита С, определяя неодинаковую интенсивность эпидемического процесса в разных возрастно-половых и социальных

категориях. Повышенная вероятность заражения HCV при многократном использовании контаминированных вирусосодержащей кровью игл и шприцез с целью внутривенного введения психотропных препаратов. Максимальный процент инфицированности наблюдается среди подростков и молодых людей 18-29 лет, преимущественно мужского пола.

Вместе с тем в 20-40% случаев причины заражения HCV остаются нераскрытыми, по крайней мере, их не удается связать с известными факторами риска. Это говорит о возможности распространения вируса иными путями. Один из активно обсуждавшихся механизмов - половые контакты. Такая возможность реальна, но маловероятна. Среди постоянных половых партнеров, один из которых хронически инфицирован HCV, риск заражения не превышает 1% в год. Некоторые авторы вообще отрицают присутствие ви-

руса в семенной жидкости и вагинальном секрете, хотя это и не исключает половой передачи: заражение может быть результатом мобилизации циркулирующего вируса через микротравмы слизистых оболочек при половом акте.

Передача HCV от матерей тоже редкое явление: вероятность контаминации плода и новорожденного инфицированными женщинами составляет 1-5%. Вирус, полученный в перинатальном периоде, длительно персистирует без сероконверсии - антитела могут появиться лишь в зрелом возрасте. HCV содержится в слюне, но его концентрация скорее всего недостаточна для заражения в обычных бытовых ситуациях.

Пробелы в представлениях о естественном компоненте эпидемического процесса вынуждают говорить о криптогенной HCV-инфекции с не установленным эпидемиологическим анамнезом (отсутствие факторов риска).

Патология

Большинство сведений о взаимоотношениях HCV с человеком получено из наблюдений за посттрансфузионным гепатитом, когда можно точно установить сроки заражения. Обычно (более 70% случаев) инфицирование протекает бессимптомно или в стертой форме. Желтуха возникает у 10-30% больных, уровень сывороточных трансаминаз часто не меняется. Инкубационный период острого гепатита С (время от переливания крови до первого подъема

сывороточных трансаминаз) составляет 6-8 недель, с колебаниями от 2 до 26 недель. Среди причин столь высокой вариабельности могут быть неодинаковое количество инфекта и особенности вируса, влияющие на его вирулентность. Клиническое и вирусологическое выздоровление (элиминация вируса из организма) по разным данным наблюдается у 20-50% инфицированных. В остальных случаях формируется персистентная инфекция, которая лежит в основе хронического гепатита и его осложнений.

Критерием хронизации принято считать HCV-вирусемию продолжительностью более 6 мес¹. В большинстве случаев (70-80%) HCV-персистенция протекает при слабовыраженном поражении печени (латентное течение); отдаленный исход неизвестен и скорее всего благополучен, по крайней мере на ближайшие 20-30 лет. Это чаще наблюдается у женщин и при заражении в молодом возрасте².

В остальных случаях (10-30%) хронический гепатит обретает агрессивный характер и в течение 10-20 лет завершается циррозом. У 20-30% таких больных со временем развивается рак печени³. Реализации HCV-агрессивности способствует мужской пол, заражение в старшем возрасте (особенно после 50 лет), злоупотребление алкоголем, коинфицирование вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и гепатита В. Значение HCV-генотипа не доказано. В частности, принадлежность к генотипу 1, с которым связана повышенная резистентность к антивирусной терапии, не имеет прогностического значения. Спонтанная элиминация вируса маловероятна.

¹ Этот критерий не очень надежен, так как элиминация вируса может задержаться на 14-45 мес.

² Длительное отсутствие тяжелых осложнений со стороны печени не исключает других нарушений здоровья, снижающих качество жизни.

³ Ежегодный прирост случаев гепатоцеллюлярной карциномы среди больных HCV-циррозом составляет 1-4%. В редких случаях гепатокарцинома возникает без цирроза. Подтверждением взаимосвязи между HCV-инфекцией и первичным раком печени являются данные сероэпидемиологических и молекулярнобиологических исследований. К первым относится высокий процент выявления анти-HCV антител среди больных гепатокарциномой (60-80%), ко вторым - обнаружение HCV-PНК в опухолевой ткани.

Варианты естественной эволюции HCV-инфекции показаны на рис. 1.

Кроме гепатита при хронической HCV-инфекции возможны другие, внепеченочные осложнения. Они часто ассоциированы с аутоиммунными реакциями, отражая способность вируса к репликации в лимфоидной ткани, прежде всего в В-лимфоцитах. Большинство внепеченочных симптомов связано с продукцией криоглобулинов, обладающих свойствами ревматоидных факторов. Они обнаруживаются у половины лиц, инфицированных HCV, причем криопреципитаты обычно содержат HCV антигены и антитела. В 10-15% случаев развивается клиническая картина смешанной криоглобулинемии¹. Симптомы формируются на основе васкулита: слабость, артралгии, пурпура. Наиболее тяжелые случаи протекают с поражением почек (мембранопролиферативный гломерулонефрит) и нервной ткани (периферические нервы, головной мозг). Сходным образом (стимуляция В-лимфоцитов, синтез аутоантител, продукция иммунных комплексов) HCV включается, повидимому, в патогенез других, в том числе лимфопролиферативных заболеваний. Это дает право говорить о том, что хроническую HCV-инфекцию следует рассматривать не только как заболевание печени, а как системный процесс, в котором ведущую роль играет тканевой тропизм возбудителя.

Патогенетическая стратегия вируса гепатита С сводится к персистенции. Только закрепившись и поддерживая свою репликацию в организме, он представляет реальную опасность.

Для рецепции и эндоцитоза требуется взаимодействие между оболочечными (E1 и E2) белками вируса и мембранными молекулами (рецепторами) клеток. Центральная роль принадлежит связке CD81-E2(HVR-1). Набор дополнительных рецепторов (коррецепторов) и лигандных E1/E2-сайтов может быть неодинаковым для гепатоцитов и других клеток, способных поддерживать репликацию HCV. Не исключено и то, что HCV-квасивиды отличаются по тканевому тропизму, используя особенности рецепторного аппарата клеток.

Длительное пребывание HCV в организме человека определяется его способностью выживать в условиях достаточно напряженного и разнообразного иммунного ответа. Начать с того, что антитела не защищают от HCV-персистенции и не обеспечивают надежного иммунитета против реинфекции. Скорее всего, это связано с антигенной вариабельностью (даже гипервариабельностью) оболочечных белков, благодаря которой минорные (т.е. по началу немногочисленные) иммунорезистентные вирусные клоны ускользают от ней-трализирующих антител, обретая лидерство в патологическом процессе. Замечено, например, что ви-

¹ Заболевание получило название в связи с присутствием в сыворотке иммуноглобулинов, которые преципитируют (выпадают в осадок) на холоду. В отличие от криоглобулинемии, представленной единственным классом иммуноглобулинов (криоглобулинемия типа I), при смешанной форме криоглобулины относятся к IgG и IgM. Криоглобулины обладают свойствами ревматоидных факторов и могут иметь поликлональную (тип II) или моноклональную (тип III) природу. Большинство случаев смешанной криоглобулинемии относятся к типу II. В 80-90% они ассоциированы с хронической HCV-инфекцией.

руснейтрализующие антитела, продуцируемые в раннем периоде хронического гепатита, не эффективны против HCV-изолятов, полученных от тех же больных в более поздние сроки. Имеет значение и то, что многие HCV-вирионы ассоциированы с сывороточными липопротеинами (?-липопротеины низкой и очень низкой плотности), которые экранируют вирусные антигены, защищая HCV от антител¹.

Не всегда результативны и эффекторы Т-клеточного иммунитета. Несмотря на то, что структурные и неструктурные HCV-белки содержат множество Т-эпитопов², выступающих в качестве мишеней для хелперных (CD4+) и цито-токсических (CD8+) Т-лимфоцитов, Т-зависимая элиминация вируса часто бывает неполной. Кроме антигенной (в данном случае Т-эпитопной) вариабельности, имеет значение сродство пептидов к презентующим их молекулам HLA, сокращение внутриклеточного пула вируса до уровня, невосприимчивого Т-лимфоцитами, вирусиндуцированное ослабление экспрессии HLA на инфицированных клетках, клональная анергия Т-лимфоцитов, связанная с действием так называемых "антагонистических" Т-эпитопных вирусомутантов. Все эти механизмы, которые широко обсуждаются в связи с феноменом вирусной персистенции, повышают устойчивость HCV к эффекторам иммунитета, содействуя стабилизации инфекции в организме.

Еще один механизм, способствующий

выживанию HCV, связан с его антиинтерфероновой активностью. Это, в частности, объясняется блокадой клеточной протеинкиназы, которая обеспечивает один из антивирусных эффектов интерферона—опережающее подавление синтеза белка за счет подавления фактора элонгации-2. Участок NS5A, ответственный за этот эффект, неодинаково активен у разных генотипов вируса, определяя разную степень рефрактерности к антивирусной терапии. В наибольшей степени это выражено для штаммов генотипа 1.

Персистенции HCV содействуют внепеченочные резервуары инфекции, прежде всего в лимфоидной ткани. Вирус находит здесь не только "пассивное убежище". Это дополнительная зона реализации его агрессивного потенциала. Подвергаясь репликации, он вызывает функциональные перекосы лимфоцитов, которые ведут к развитию заболеваний иммунной системы (см. выше) и ослабляют ее вирусэлиминирующий потенциал³. Это, в частности, зависит от нарушения баланса регуляторных цитокинов. Преобладание Th2 цитокинов при остром HCV-гепатите, ассоциируемое с ослаблением эффекторного звена Т-клеточного иммунитета, содействует вирусной персистенции и хронизации HCV-инфекции. Напротив, доминирование Th1 цитокинов коррелирует с тенденцией к выздоровлению и элиминацией возбудителя⁴. Функциональные

¹ Одновременно это создает условия для дополнительного взаимодействия вирионов с клетками - через рецепторы для липопротеинов низкой плотности.

² Обнаружено, например, около 40 эпитопов для CD8+ Т-лимфоцитов, которые презентуются 15 аллельными вариантами молекул HLA-I.

³ Допускается возможность репликации HCV в стволовых клетках костного мозга. Полагают даже, что это второй по значимости резервуар персистой HCV-инфекции.

⁴ Стимуляция продукции Th1 цитокинов рассматривается как возможный вариант терапии хронических HCV и HBV гепатитов.

извращения лимфоцитов могут быть связаны с действием белков (особенно С-белка) реплицирующегося HCV-вируса (Nikolayeva et al., 1999; Николаева, 1999).

Определенное значение в эволюции HCV-инфекции играют генетические факторы. Они связаны с HLA-полиморфизмом, который накладывает отпечаток на течение хронического гепатита С и очищение организма от вируса. В конечном итоге это тоже преломляется через особенности иммунологической (HLA-опосредованной) реактивности к вирусным антигенам, хотя до полной ясности здесь далеко. Скорее всего, иммунный ответ против HCV (впрочем, как и против других инфекционных агентов), модулируется комплексом генных взаимодействий, а не отдельными HLA-аллелями.

Механизмы HCV-зависимого поражения гепатоцитов остаются неясными. Прямая цитопатичность реальна, но, безусловно, не является главной причиной: вирусная нагрузка и репликативная активность HCV не коррелируют с выраженностью патологического процесса, а число зараженных гепатоцитов не совпадает с биохимическими, клиническими и гистологическими признаками заболевания. Существенная роль принадлежит иммунологическим механизмам повреждения, прежде всего цитодеструктивным реакциям антивирусных Т-лимфоцитов, нацеленных против клеток, несущих вирусные пептиды в комплексе с молекулами HLA. Процент клеток, содержащих РНК-HCV колеблется в широких преде-

лах (от 4,8% до 87,6%), определяя вероятный масштаб Т-зависимой агрессивности. Патология возникает тогда, когда гибель клеток (в результате цитолиза и/или апоптоза), нацеленная на элиминацию вируса, не обеспечивает полноценного решения этой задачи благодаря ускользанию HCV-мутантов от иммунного пресса.

Повышенный риск развития гепатоцеллюлярной карциномы, который воспринимается как один из грозных символов хронического гепатита С, не имеет четких объяснений. Впрочем, это вряд ли возможно, если учесть, что канцерогенез—многоступенчатый процесс, в котором задействованы разнообразные факторы и механизмы.

В отличие от вируса гепатита В, HCV-геном не вступает в интеграцию с ДНК зараженных клеток. Это исключает один из принципиальных механизмов онкогенности—инсерционный мутагенез, побуждая искать другие объяснения. По одной из версий, онкогенность HCV связана с производными кор (С)-протеина, которые, взаимодействуя с регуляторными белками клетки-хозяина, влияют на экспрессию генов, ответственных за регуляцию роста и апоптоза клеток¹. Однако редкое развитие гепатокарциномы в нецирротической печени исключает универсальность данного механизма, позволяя думать об опосредованном характере гепатоканцерогенеза. Допускают, например, что рак развивается в результате спонтанного мутагенеза гепатоцитов, побуждаемых к перманентной регенерации в условиях хронической вирусиндуцированной гибели печеноч-

¹ В этом отношении С-белок похож на Х-протеин вируса гепатита В. Сходным действием, по-видимому, обладают и субкомпоненты неструктурных белков, NS3 и NS5.

ной паренхимы. Этому содействует повышенная чувствительность клеток к вторичным (эндогенным и экзогенным) мутагенам, которые особенно опасны для одноцепочечной ДНК, временно образующейся по ходу клеточной репликации.

Иммунитет

Не обеспечивая полной элиминации вируса, иммунная система существенно влияет на развитие HCV-инфекции. Выше об этом говорилось в связи с иммунологически зависимыми механизмами патогенеза хронического гепатита С и внепеченочных осложнений. Но иммунный ответ может быть и достаточно эффективен. Об этом свидетельствует вероятность полного очищения от вируса (по разным данным от 20% до 50% остро инфицированных), а также многолетняя стабилизация инфекции на умеренном уровне у большинства зараженных.

Характерный признак гепатита С - отсроченная сероконверсия. Первые анти-HCV антитела удается обнаружить не ранее 5 недель после инфицирования (переливание зараженной крови), но сроки их появления могут быть и гораздо длиннее (30-50 недель). Спектр антител достаточно сложен, отражая эпитопную поливалентность HCV-антигенов. Динамика антител к различным антигенам (точнее их эпитопам) неодинакова, что имеет диагностическое значение.

Вируснейтрализующие антитела ограничивают инфекцию, но пропускают мутантные клоны (квазивиды) с обновленными В-эпитопами ("ускользающая мишень"). Это тем более

вероятно, так как протективные В-эпитопы сосредоточены в гипервариабельных зонах оболочечных антигенов, прежде всего E2. Между титрами вируснейтрализующих антител и исходами острого гепатита нет корреляции, а у лиц, спонтанно выздоровевших от острого гепатита, их содержание невелико. Образование нейтрализующих антител продолжается и при хронической инфекции, но их эффективность здесь еще ниже. В опытах на шимпанзе антитела предохраняют от реинфекции "своим" штаммом, но не защищают от заражения гетерологичными штаммами даже у идентичного генотипа. У детей с врожденной гипогаммаглобулинемией течение хронической HCV-инфекции не имеет заметных особенностей.

Это определило интерес к реакциям Т-клеточного иммунитета, которым, по видимому, принадлежит главная роль в элиминации и длительном сдерживании HCV. Основой для этого служит относительный консерватизм протективных Т-эпитопов, представленных на всех HCV-белках - структурных и неструктурных. Принципиально, что вирусинфицированные клетки становятся мишенями для Т-лимфоцитов до созревания новых вирусных частиц. Высокая сенсibilизация Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+) к HCV-антигенам характерна для острого гепатита С, который завершается элиминацией возбудителя, но не для больных с исходом в хроническую инфекцию. В последнем случае реакции выражены слабее и явно недостаточны для эрадикации вируса. Задача решается здесь частично, иногда с потерями для хозяина: стабилизируя HCV-персистенцию, Т-лимфоциты

поддерживают хроническую инфекцию, включаясь в патогенез (см. выше).

Высокая изменчивость HCV затрудняет создание профилактической и лечебной (для ликвидации персистентной инфекции) вакцин. Новые идеи связаны с Т-вакцинами¹, которые в отличие от традиционных вакцин (нацеленных на образование антител) рассчитаны на избирательную активацию антивирусных Т-лимфоцитов. С этой целью, кроме HCV-пептидов (носителей Т-эпитопов), планируется использовать генетические (ДНК) вакцины, которые основаны на рекомбинантных молекулах ДНК - бактериальные плазмиды со встроенными HCV-генами. Попав в клетки, они подвергаются экспрессии с образованием антигенных пептидов, которые включаются в индукцию иммунных реакций.

Принципы лабораторной диагностики

Констатация HCV-инфекции базируется на выявлении специфических серологических маркеров. Это важно не только для дифференциальной диагностики гепатита С, но и для суждения о стадии заболевания, прогнозировании

его течения, оценки активности процесса и эффективности противовирусной терапии.

Наиболее широко практикуется определение анти-HCV антител. Принципиальное значение имеет генодиагностика, основанная на детекции РНК-HCV. Недавно появилась возможность обнаружения циркулирующих HCV-антигенов.

Определение антител к HCV

Выявление анти-HCV антител проводят при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на основе комплекса структурных и неструктурных вирусных пептидов. В настоящее время применяются диагностические системы 3-го поколения, которые построены из рекомбинантных и/или синтетических фрагментов структурных и неструктурных HCV-белков (С, NS3, NS4 и NS5). Внедрение диагностикумов 3-го поколения позволило сократить сроки первичного выявления анти-HCV при острой инфекции, существенно повысить чувствительность и специфичность реакции (рис 4).

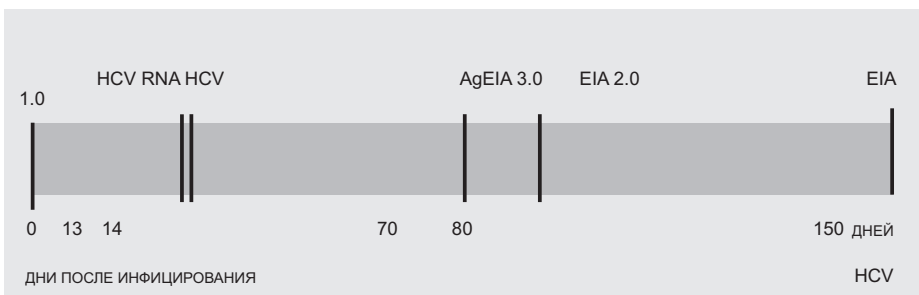


Рис. 4. Детекция маркеров HCV тестами разных поколений

¹ Их называют также "дендритными вакцинами" по наименованию главной категории клеток, презентующих антигены Т-лимфоцитам.

Первые антитела (обычно анти-С, анти-NS3, анти- NS5) удается обнаружить через 20-150 дней (в среднем через 50 дней) (рис 5).

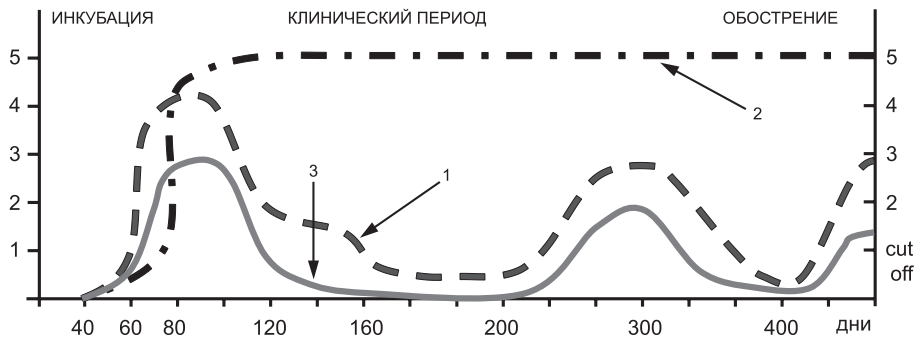


Рис.5. Динамика анти-HCV core класса M (1) и G (2) в сопоставлении с АлАТ (3) при остром гепатите С с развитием хронизации.

Частота выявления анти-HCV среди РНК-HCV позитивных образцов крови приближается к 100%. На фоне хронической инфекции антитела выявляются постоянно, а после элиминации вируса сохраняются (прежде всего, анти-С) в течение 4-8 и более лет. Поэтому формальное наличие анти-HCV не всегда говорит о присутствии вируса в организме и не позволяет судить об активности процесса. Для суждения о вирусной нагрузке, активности HCV-репликации, риска хронизации, разграничения острого и хронического гепатита, длительности инфекционного процесса и степени поражения печени предложено использовать определение спектра антител к различным HCV-пептидам, а также наблюдать за их качественной и количественной динамикой. Это дает ориентировочную информацию, которая требует подтверждения другими методами.

Детекция антител к каждому из

HCV-антигенов имеет самостоятельное диагностическое значение. Так например известно, что анти-core, анти-Е и анти-NS3 выявляются на самых ранних этапах сероконверсии, анти-NS4 и анти-NS5, как правило, появляются позднее. По мере развития инфекционного процесса титры выявляемых анти-HCV увеличиваются.

Было показано, что наличие в сыворотке анти-HCV core является достаточно надежным маркером вирусной репликации, поскольку имеются данные о том, что их присутствие коррелирует с наличием в сыворотке специфической мРНК.

Анти-HCV core тест может использоваться в качестве подтверждающего теста при тестировании образцов с "неопределенными" результатами. Сыворотки крови, в которых анти- HCV core детектируется в разведении 1:1000, с большой вероятностью содержат вирус и являются реально позитивными.

Образцы, являющиеся позитивными в разведении 1:200 и отрицательными в разведении 1:1000, необходимо в дальнейшем исследовать на наличие вирусной РНК. С большой вероятностью эти сыворотки можно отнести к реально негативным. Таким образом, используя предварительный анти-HCV core тест можно существенно снизить количество образцов, требующих подтверждения методом ПЦР.

Анти-NS3 могут являться самостоятельным диагностическим маркером острой HCV-инфекции. Высокие титры анти-NS3 при остром гепатите С свидетельствуют о значительной вирусной нагрузке, а длительное сохранение их в острой фазе связано с высоким риском хронизации инфекционного процесса.

Выявление анти-NS4 и высокие титры этих антител чаще всего свидетельствуют о длительности инфекционного процесса, и, по всей видимости, коррелируют со степенью поражения печени.

Имеются данные, говорящие о том, что выявление анти-NS5 в высоких титрах часто свидетельствует о присутствии вирусной РНК, а в острой стадии является предиктором хронизации инфекционного процесса. Также имеются данные о том, что в NS5 области вируса гепатита С имеются последовательности, не специфически реагирующие с антителами в сыворотках крови человека. При помощи синтетических пептидов было проведено эпитопное картирование этой области, и были найдены последовательности, специфически реагирующие с антителами, вырабатываемыми именно к вирусу гепатита С.

Большое значение для клинической практики может иметь выявление анти-

E1/E2. Выявление анти-E в течение 1 месяца от начала заболевания и быстрое последующее снижение может свидетельствовать об очищении организма от вирусной РНК, определение анти-E при хроническом гепатите С свидетельствует об активной вирусной репликации.

Для многих вирусных заболеваний, таких как гепатит В, гепатит Д, гепатит А, определение антител класса IgM к различным вирусным маркерам является важным диагностическим показателем острой или хронической инфекции. Важность определения антител этого класса при инфекции вируса гепатита С остается не вполне ясной. Разными авторами получены противоречащие друг другу результаты. Вопреки ожиданиям, IgM-ответ в острой фазе гепатита С не следует классическому пути антителообразования: IgM анти-HCV могут выявляться одновременно и даже позднее, чем анти-HCV класса IgG. Поэтому обнаружение IgM анти-HCV не может быть использовано как маркер острой HCV-инфекции. Вместе с тем длительность циркуляции антикор-IgM (3-5 месяцев) является фактором, прогнозирующим персистентную инфекцию, а их появление при хроническом гепатите С свидетельствует о реактивации вируса, т.е. об обострении процесса. Этому соответствует корреляция между темпами снижения антикор-IgM и эффективностью противовирусной терапии.

Согласно материалам Нижегородского гепатологического центра информативность исследований существенно повышается при оценке характеристики спектра антител к отдельным белкам

HCV, особенно в условиях динамического контроля. Для этого используют иммуноблоттинг или иммуноферментные тесты с отдельно сорбированными на планшетах антигенами вируса гепатита С. Специально разработанная ИФА тест система "ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР", являясь по сути дешевой альтернативой иммуноблоттингу, позволяет учесть изменения соотношения антител к разным антигенам HCV в разные сроки заболевания.

Иммуноблоттинг (англ. "blot" - пятно) основан на дифференцированном определении антител к различным антигенам (С, NS3, NS4 и NS5), которые в виде дискретных фракций ("пятен") фиксируются на нитроцеллюлозных полосках и после инкубации с исследуемой сывороткой проявляются мечеными антителами так же, как в "обычном" ИФА. Результат считается положительным при выявлении антител к двум и более антигенам.

Несмотря на высокую специфичность, современные ИФА-системы не гарантированы от гипердиагностики, т.е. от ложноположительных результатов. Для их исключения также требуется динамическая оценка на основе индикации анти-HCV к дискретным антигенам (подтверждающие, или подтверждающие тесты).

Наряду с ложноположительными возможны и ложноотрицательные результаты, когда анти-HCV антитела не удается обнаружить несмотря на присутствие вируса в организме. Известны по меньшей мере три подобных ситуации:

1) начальный период заболевания (серонегативная фаза острого гепатита - фаза "окна")

2) больные, получающие иммунодепрессанты (они могут быть длительно инфицированы без сероконверсии)

3) заражение некоторыми HCV-генотипами (прежде всего 3 и 4).

В настоящее время коммерческие тесты для выявления антител к вирусу гепатита С используют в качестве антигенов рекомбинантные белки или синтетические пептиды, созданные на основе аминокислотной последовательности вируса гепатита С 1-го генотипа. Однако растет число наблюдений, что такие тесты могут быть недостаточно эффективны для надежной детекции антител при инфицировании вирусом другого генотипа. Так, например, было показано, что антигены, полученные из NS3 области HCV 1-го генотипа, в 5 раз более эффективно узнают антитела в сыворотках больных, инфицированных вирусом HCV 1-го генотипа, чем в сыворотках больных, инфицированных вирусом 2-го или 3-го генотипа. Исследования, проведенные L Bassit (2002) продемонстрировали неспособность нескольких коммерческих тестов адекватно детектировать антитела к вирусу гепатита С у больных, инфицированных вирусом 1а и 3а типов. Это наблюдение имеет огромное значение как для регионов, где преобладают вирусы других типов, так и для отдельных популяций.

Таким образом, для эффективной диагностики гепатита С необходим высокочувствительный тест, способный адекватно реагировать с анти-ВГС любого генотипа.

Кроме прямого изучения структуры РНК, информация о зараженности конкретным генотипом может быть получена на основе изучения антител про-

тив генотипоспецифических эпитопов, локализованных в NS5, NS4 и С - белках вируса. Перечень серотипируемых вариантов HCV в настоящее время включает генотипы (субтипы) 1a, 1b, 2a, 2b, 3a и 4a. Результаты серотипирования и РНК-типирования совпадают в 50-95% случаев, в зависимости от генотипа. Осуществляется коммерческий выпуск диагностических препаратов для серотипирования в планшетном варианте ИФА и иммуноблоте (см. [11]).

Обнаружение РНК-HCV

Выявление РНК-HCV считается "золотым" стандартом в диагностике гепатита С. Наиболее широко используется классический вариант полимеразной цепной реакции (ПЦР) после обратной транскрипции HCV-РНК в комплементарную ДНК (кДНК). С ее помощью удается следить за вирусемией, а также судить о присутствии HCV в печени и других тканях. Определение циркулирующей HCV-РНК наиболее часто применяют для подтверждения антительных тестов, раннего диагноза острого гепатита (РНК-HCV удается обнаружить на 7-21-й день после инфицирования, т.е. задолго до появления первых антител), мониторинга перинатального заражения и контроля за эффективностью антивирусной терапии.

В целом, данные HCV-РНК-вирусемии хорошо коррелируют с обнаружением анти-HCV антител. Положительные результаты ПЦР в сочетании с негативными реакциями на анти-HCV характерны для серонегативного периода острого гепатита (фаза "окна").

Негативные показатели на фоне положительных антительных тестов могут быть следствием ложной позитивности последних либо низкой (не улавливаемой в ПЦР) концентрации вируса в крови. Повторные анализы могут дать положительный результат, отражая активацию вируса в гепатоцитах или во внепеченочных резервуарах.

Кроме слежения за вирусемией, HCV-ПЦР применяется для обнаружения вируса в биоптатах печени. Это дает более полную информацию об эволюции инфекционного процесса, так как вирус способен персистировать в гепатоцитах, не выходя в кровь или присутствуя в ней в субпороговых концентрациях. Это чаще происходит на ранних этапах инфекции, но наблюдается и при хроническом HCV-гепатите. Более точное представление об активности процесса дает определение репликативной формы РНК. Ее содержание в печени может не соответствовать количеству геномной РНК и уровню вирусемии, отражая сложные взаимоотношения вируса с хозяином, в частности наличие внепеченочных резервуаров HCV-инфекции.

Определение HCV-антигенов

Принципиальная возможность выявления структурных и неструктурных HCV-белков была установлена вскоре после открытия вируса при иммунофлюоресцентном изучении биоптатов печени больных хроническим гепатитом С и шимпанзе, зараженных HCV. Определение HCV-антигенов в сыворотке из-за их низкого содержания долго не удавалось. Лишь недавно разработаны методические подходы

для иммуноферментного выявления С(кор)-белка в крови, и организовано производство первых коммерческих тест-систем ("OrtoAntibody to Core Antigen (Murine Monoclonal) ELISA Test System" и "Immucheck F-HCV Ag Core Koku-su" - цит. [11]). Их внедрение в практику позволит решать спорные вопросы диагностики на более экономичной основе, чем определение HCV-RНК.

Принципы антивирусной терапии

Стратегия терапии хронического гепатита С направлена на ликвидацию хронической (персистентной) HCV-инфекции¹. Современная тактика предусматривает длительное комбинированное лечение интерфероном-альфа и рибавирином (синтетический аналог нуклеозидов). Испытание целого ряда рекомбинантных интерферонов не выявило их преимуществ. Предложен интерферон, химически связанный с полиэтиленгликолем (ПегИнтерон), что увеличивает период полураспада и продолжительность действия препарата.

По результатам устойчивого вирусологического ответа в рандомизированных группах больных (отсутствие РНК-HCV через 6 мес и более после отмены препаратов) эффективность комбинированной терапии составляет около 50%. Некоторые авторы отстаивают целесообразность антивирусного лечения в латентной фазе хронической HCV-инфекции, но другие не видят в этом смысла. Компромиссом служит признание целесообразности лечения HCV-RНК позитивных лиц без поражения печени, но с признаками снижения качества жизни.

Склонность к высокой изменчивости HCV проявляется и в селекции клонов, устойчивых к антивирусной терапии. В сочетании с природной резистентностью HCV (прежде всего генотипа 1) к интерферону это создает дополнительные сложности в эрадикации персистентной инфекции, предрасполагая к вирусологическим рецидивам. В перспективе можно рассчитывать на препараты, которые будут действовать на другие вирусные мишени, в частности блокировать вирусспецифические ферменты.

НПО "Диагностические системы" выпускает следующие наборы для диагностики вирусного гепатита С:

◇ **"ИФА-АНТИ-HCV"** – для выявления антител класса IgG к вирусу гепатита С (ФС 42 3438-97);
"ИФА-АНТИ-HCV"* - для выявления антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита С, взамен теста "ИФА-АНТИ-HCV" (ФСП 42 099 3180-02)

◇ **"ИФА-АНТИ-HCVc-M"** - для выявления антител класса IgM к вирусу гепатита С ФСП 42-00990934-01)

◇ **"ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР"** - для идентификации спектра антител класса IgG к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти-HCV скрининга (ВФС 423590-99)

◇ **"ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM"** - для идентификации спектра антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита С и подтверждения результатов анти HCV скрининга с использованием "ИФА-АНТИ-HCV"* (проект ФСП)

¹ Целесообразность противовирусной терапии острого гепатита С для профилактики хронического процесса не доказана.

* Последняя модификация теста имеет смесь конъюгатов IgG и IgM.

Принцип теста "ИФА-АНТИ-НСV"

В основе теста лежит неконкурентный метод ИФА, двустадийный вариант (рис. 6).

Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству связанных антигенов.

"ИФА-АНТИ-НСV", выпускаемая в НПО "Диагностические системы", представляет собой тест-систему третьего поколения.

На твердую фазу нанесено 7 рекомбинантных антигенов, получаемых на предприятии: 2 рекомбинантных белка, эспрессирующие антигенные эпитопы

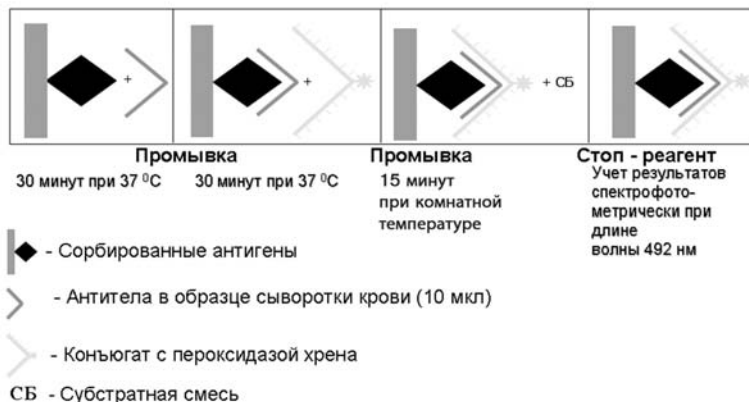


Рис.6. Схема определения IgG и IgM анти-НСV.

из core области вируса гепатита С, и 5 рекомбинантных белков, экспрессирующих антигенные эпитопы неструктурных белков вируса гепатита С: два полипептида из иммунодоминантного региона NS3 белка вируса (1356-1459aa и 1192-1459aa), два из области NS4 - мозаичный, содержащий сильные антигенные эпитопы (1691-1710aa, 1712-1733aa, 1921-1940aa) из вирусных белков разных генотипов, и белок, перекрывающий aa 1916-1947, также рекомбинантный белок из области NS5 (2016-2302) (рис 7).

Все рекомбинантные белки являются специально выбранными диагностическими мишенями, оптимальными для использования в иммуноферментном анализе.

Промышленный выпуск "ИФА-АНТИ-НСV" начался в 1992 году. Это был один из первых отечественных тестов для диагностики вирусного гепатита С. Качество иммуноферментного теста непрерывно совершенствуется в соответствии с мировыми стандартами с использованием панелей и референс образцов ведущих производителей. Тест - система "ИФА-АНТИ-НСV" успешно прошла государственные испытания в России и получила сертификат о регистрации в Польше, Украине и Вьетнаме.

2000, Россия

ГИСК им. Л.А. Тарасевича совместно с МЗ РФ регулярно проводит государственные сравнительные испытания

ГЕНОМ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

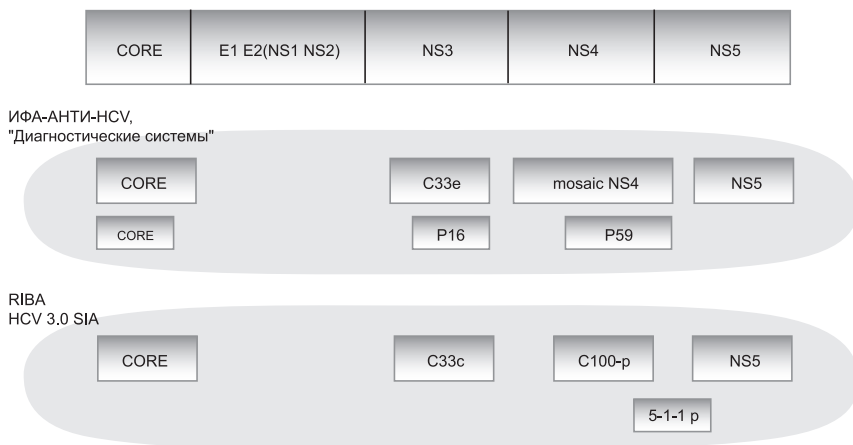


Рис. 7. Антигенная композиция иммуноферментных тестов для детекции анти-НСV

отечественных и зарубежных тестов для выявления антител к вирусу гепатита С.

В 2000 году испытания проводились с использованием низкотитражной панели сывороток PHV-105, Boston Biomedical Inc (Lot:79-3547-1001) и стандартной панели сывороток (ОСО 42-28-310-00 С.004). "ИФА-АНТИ-НСV" признана одной из лучших российских тест-систем для выявления антител к вирусу гепатиту С и рекомендована для обследования доноров крови, органов и тканей человека, больных острыми и хроническими гепатитами, а также скрининга населения (Приказ МЗ РФ № 384 от 30 октября 2000).

Повторные сравнительные испытания, проводимые МЗ РФ и ГИСКом им.Л.А.Тарасевича в 2002 г., подтвердили высокое качество нашего теста. На этих испытаниях был представлен, помимо разработанного в 1999 году, новый диагностикум для определения

антител к вирусу гепатита С, выявляющий антитела как класса IgG, так и класса IgM.

Тест - система "ИФА-анти-НСV" неоднократно испытывалась в сравнении с другими отечественными и зарубежными диагностикумами для определения антител к вирусу гепатита С.

2001, Россия

В таблице приложения представлены выборочные результаты сравнения тест-системы "ИФА-анти-НСV" и ряда других производителей, проведенного с использованием 124 образцов сывороток крови (из них 75 позитивных и 49 отрицательных в референс - тесте "Anti HCV EIA Ortho 3.0"). Все 59 сывороток, положительных в системе "Anti-HCV EIA Ortho 3.0" и подтвержденных тестом "RIBA HCV 3.0 SIA", нашим тестом определяются как анти-НСV положительные. 49 отрицательных образцов аттестованы как отрицательные в "ИФА-анти-НСV".

Из 16 образцов сывороток, содержащих антитела только к одному из неструктурных или нуклеокапсидному белку, либо слабореактивных () по двум и более маркерам ("неопределенный" - (indeterminate) результат на антитела к ВГС), отобраны анти core ВГС содержащие образцы (9 образцов). Из таблицы видно, что все эти сыворотки в скрининговой тест-системе "ИФА-анти-НСВ" производства НПО "Диагностические системы" детектируются как анти-НСВ положительные.

2001, Польша

В таблице 1 суммированы результаты сравнения диагностикума "ИФА-анти-НСВ" с тест-системой "UBI HCV EIA 4,0" фирмы "Organon Teknika". Испытания проводились на кафедре клинической биохимии Гданьской Медицинской Академии. Сравнение, проведенное на 12 анти - HCV положительных (ОП~0,561-1,709) и 30 анти - HCV отрицательных сыворотках, показало полное соответствие всех позитивных и отрицательных результатов. Однако, следует отметить, что отношение оптической плотности образца к критической оптической плотности - критерий

позитивности (ОП/ cut off) в большинстве сывороток, имеющих анти-НСВ, было в 1,5-2,5 раза выше в тест-системе "ИФА-анти-НСВ".

Тест - система "ИФА-анти-НСВ" допущена к применению в медицинских лабораториях на территории Польской республики наряду с диагностикумом "UBI HCV EIA 4,0" фирмы "Organon Teknika".

2002, Социалистическая Республика Вьетнам

В Национальном институте гигиены и эпидемиологии Минздрава СРВ было проведено сравнение тест - системы "ИФА-анти-НСВ" с диагностикумом фирмы "Sanofi Diagnostics Pasteur", "Monolisa anti - HCV - plus". Результаты этого сравнения приводятся в таблице 2.

Показано, что результаты тестирования аналогичны как для отрицательных, так и для положительных образцов. Однако отношение величины ОП/cutoff в тест-системе "ИФА-анти-НСВ" выше более чем втрое по сравнению с "Monolisa anti - HCV - plus".

Таблица 1.

Сравнительная оценка тест-систем "ИФА-анти-НСВ" фирмы ООО "НПО "Диагностические системы" и "UBI HCV EIA 4,0" фирмы "Organon Teknika".

| | "UBI HCV EIA 4,0" фирмы "Organon Teknika" | | "ИФА-анти-НСВ" фирмы ООО "НПО "Диагностические системы" | |
|-------------------------|---|-------------------|---|-------------------|
| | Число сывороток | Среднее ОП/cutoff | Число сывороток | Среднее ОП/cutoff |
| Отрицательные сыворотки | 30 | 0,41 | 30 | 0,36 |
| Положительные сыворотки | 12 | 3,82 | 12 | 8,00 |

Таблица 2.

**Сравнительная оценка
тест -систем "ИФА-анти-НСV" фирмы ООО "НПО "Диагностические системы"
и "Monolisa anti - HCV - plus" фирмы "Sanofi Diagnostics Pasteur"**

| | "Monolisa anti - HCV - plus", "Sanofi Diagnostics Pasteur" | | "ИФА-анти-НСV" фирмы ООО "НПО "Диагностические системы" | |
|------------------------------------|---|----------------------|---|----------------------|
| | Число сывороток | Среднее ОП/cutoff | Число сывороток | Среднее ОП/cutoff |
| Отрицательные сыворотки | 17 | 0,22 | 17 | 0,16 |
| Положительные сыворотки | 23 | 3,02 | 23 | 10,00 |

2002, Россия

Сравнительные испытания тестов для определения антител к вирусу гепатита С - "ИФА-анти-НСV" и "Monolisa anti - HCV - plus" (Version 2) производства "BIO - RAD", проведенные на базе отдела контроля качества нашего предприятия, осуществлены с использованием Российской стандартной панели сывороток СО 42-28-310-00 с. 005. Результаты суммированы в таблице 3. Расхождение в результатах тестирования наблюдалось при исследовании трех образцов: №1, №6, №16. Также, средняя величина ОП/cut off положительных образцов с использованием "Monolisa anti - HCV - plus" ниже соответствующих показателей "ИФА-анти-НСV".

2002, США

Комплексные исследования диагностического потенциала "ИФА-анти-НСV" были проведены на базе секции молекулярной диагностики вирусных гепатитов Центра по Контролю и Профилактике заболеваемости США (Center of Disease Control and Prevention, Atlanta).

В таблице приложения приводятся данные исследования чувствительности теста "ИФА-анти-НСV" с использованием сероконверсионной панели № 9047 (BioClinical Partners, Inc., Franklin, USA). Сравнительный анализ данных показал: тест-система "ИФА-анти-НСV", производства НПО "Диагностические системы" практически не уступает по срокам детекции сероконверсии диагностикумам, лидирующим на мировом рынке.

На рис.8 приведены гистограммы сравнения чувствительности "ИФА-анти-НСV" и "Ortho HCV EIA 3.0" при детекции ранней сероконверсии с использованием 8 сероконверсионных панелей, выпускаемых "Boston Biomedical Inc" (BBI). Показано, что начало сероконверсии в большинстве случаев определяется одновременно обоими тестами.

В некоторых случаях использование системы "ИФА-анти-НСV" (панели № 6214, 6211) позволяет сократить период серонегативного окна по сравнению с тестом "Ortho

Таблица 3.

**Сравнительная оценка тест - систем “ИФА-анти-НСV”
фирмы ООО “НПО “Диагностические системы” и “Monolisa anti - HCV - plus”
(Version 2) фирмы “BIO - RAD”**

| № сыво ротк и | Генотип вируса | Характеристика реактивности образцов | ОП/cutoff | |
|------------------------|-------------------|---|---------------------------------|----------------|
| | | | “Monolisa anti - HCV - plus” | “ИФА-анти-НСV” |
| 1 | 1в | core+NS4+ | 0,89 | 1,3 |
| 2 | - | core+NS4 | 4,5 | 9,4 |
| 3 | 2а-с | core+NS3+ | 7,4 | 7,6 |
| 4 | 1в | core++ NS3++NS4 +NS5 | 1,5 | 4,7 |
| 5 | 1в | core+++NS4+++NS5 | 1,9 | 7,6 |
| 6 | 1в | core+NS4 | 0,44 | 2,7 |
| 7 | - | NS3+++NS4+++ | 4,8 | 9,5 |
| 8 | - | NS3+NS4+ | 1,2 | 2,4 |
| 9 | 2а-с | core NS3+ NS4+ | 7,5 | 9,5 |
| 10 | 2а-с | NS3+NS4+ | 3,7 | 3,4 |
| 11 | 2а-с | NS3 NS4 | 2,4 | 2,5 |
| 12 | 3а | core+++NS3+++ NS4+++ NS5++ | 7,8 | 10,0 |
| 13 | 3а | core+++NS3+ NS4+ | 3,2 | 8,3 |
| 14 | 3а | core++NS3 NS4+ | 1,7 | 6,2 |
| 15 | 3а | core++ NS3 NS4 | 1,1 | 2,9 |
| 16 | 3а | core++ NS4 | 0,72 | 1,6 |

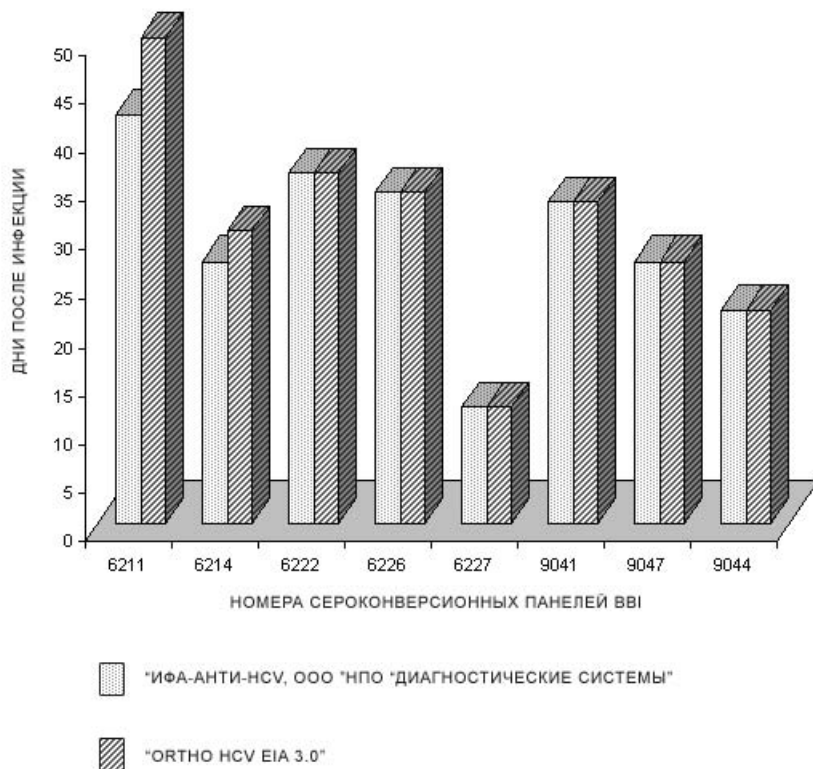


Рис.8. Сравнение теста "ИФА-анти-НСV" с диагностикумом "Ortho HCV EIA 3.0" по сероконверсионным панелям ВВИ.

НСV EIA 3.0".

Таблица 4 содержит результаты исследования чувствительности теста "ИФА-анти-НСV" с использованием "Anti-HCV Mixed Titer Performance Panels" (PHV 205 и PHV 103, ВВИ). Из таблицы видно, что результаты тестирования всех образцов панелей полностью соответствуют характеристикам, приведенным в описании панелей.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют, что по специфической актив-

ности тест система "ИФА-АНТИ-НСV" не уступает зарубежным аналогам и может успешно применяться для диагностики вирусного гепатита С.

Таблица 4.

**Результаты исследования чувствительности теста "ИФА-анти-НСV"
с использованием "Anti-HCV Mixed Titer Performance Panels"
(PHV 205 и PHV 103, ВВ1)**

| № сыворотки | "Ortho RIBA 3,0" | | | | | ИФА-анти-НСV |
|-------------|------------------|-----|------|-----|-----------|--------------|
| | C100 | C33 | core | NS5 | Результат | ОП/cut off |
| PHV 205-1 | 2+ | 2+ | - | 2+ | Pos | 2.9 |
| PHV 205-2 | - | - | - | - | Neg | 0.6 |
| PHV 205-3 | - | - | 4+ | 1+ | Pos | 5.6 |
| PHV 205-4 | - | 2+ | 4+ | - | Pos | 5.3 |
| PHV 205-5 | - | -/+ | 2+ | - | Ind | 3.8 |
| PHV 205-6 | - | 3+ | - | - | Ind | 6.1 |
| PHV 205-7 | - | 1+ | 2+ | - | Pos | 3.0 |
| PHV 205-8 | +/- | 2+ | +/- | - | Ind | 4.7 |
| PHV 205-9 | 2+ | 3+ | 2+ | - | Pos | 5.3 |
| PHV 205-10 | +/- | 1+ | 3+ | - | Pos | 6.1 |
| PHV 205-11 | - | 4+ | 1+ | 3+ | Pos | 6.6 |
| PHV 205-12 | 1+ | 3+ | 3+ | - | Pos | 5.7 |
| PHV 205-13 | 2+ | 1+ | - | 3+ | Pos | 5.1 |
| PHV 205-14 | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | Pos | 5.3 |
| PHV 205-15 | 2+ | 3+ | 3+ | 2+ | Pos | 5.4 |
| PHV 205-16 | 1+ | 3+ | 3+ | 2+ | Pos | 5.3 |
| PHV 205-17 | 2+ | 2+ | - | - | Pos | 4.5 |
| PHV 205-18 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | Pos | 6.3 |
| PHV 205-19 | - | 4+ | 3+ | 4+ | Pos | 6.2 |
| PHV 205-20 | 3+ | 3+ | 4+ | - | Pos | 6.5 |
| PHV 205-21 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | Pos | 7.6 |
| PHV 205-22 | 4+ | 4+ | 4+ | - | Pos | 7.4 |
| PHV 205-23 | 3+ | 4+ | 4+ | 2+ | Pos | 7.1 |
| PHV 205-24 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | Pos | 8.3 |
| PHV 205-25 | - | - | - | - | Neg | 0.2 |
| PHV 103-1 | 2+ | 2+ | +/- | - | Pos | 2.7 |
| PHV 103-2 | +/- | 2+ | 4+ | 1+ | Pos | 4.3 |
| PHV 103-3 | +/- | 2+ | 2+ | - | Pos | 3.2 |
| PHV 103-4 | 1+ | 4+ | - | - | Pos | 3.8 |
| PHV 103-5 | 2+ | 4+ | - | - | Pos | 4.3 |
| PHV 103-6 | 4+ | 4+ | +/- | - | Pos | 2.7 |
| PHV 103-7 | 1+ | 1+ | - | +/- | Pos | 2.8 |
| PHV 103-8 | 1+ | 1+ | 3+ | - | Pos | 3.9 |
| PHV 103-9 | +/- | 2+ | - | - | Ind | 3.2 |
| PHV 103-10 | - | - | - | - | Neg | 0.5 |
| PHV 103-11 | 2+ | 4+ | 2+ | - | Pos | 3.5 |
| PHV 103-12 | 4+ | 3+ | - | - | Pos | 1.9 |
| PHV 103-13 | +/- | 2+ | 1+ | - | Pos | 3.0 |
| PHV 103-14 | +/- | 4+ | - | +/- | Ind | 3.4 |
| PHV 103-15 | +/- | 4+ | 4+ | - | Pos | 6.3 |

Основная литература

1. Гепатит С (диагностика, эпидемиология, лечение, профилактика). Вирусные гепатиты. 2000, N3, С.3-9.
2. Ершов Ф.И., Касьянова Н.В. Новые лекарственные средства в терапии вирус-ных гепатитов. Инфекции и антимикробная терапия. 2001, N1, С.17-24.
3. Ивашкин В.Т. Эпидемиология и профилактика вирусных гепатитов. Русский мед. журн. 1995, N1, С.22-26.
4. Калинина О.В., Мукомолов С.Л. Молекулярная эпидемиология гепатита С. Вирусные гепатиты. 2000, N3, С.9-15.
5. Круглов И.В., Знойко О.О., Огиенко О.Л. и др. Спектр антител к различным ан-тигенам HCV при разных вариантах течения хронической HCV-инфекции. Вопр. виру-сол. 2002, N2, С.11- 15.
6. Лакина Е.И., Куц А.А. РНК вируса гепатита С в организме больных хрониче-ским гепатитом С. Вопр. вирусол. 2002, N2, С.4-11.
7. Лакина Е.И., Масалова О.В., Абдулмеджидова А.А., Куц А.А. Вирусная на-грузка и тяжесть заболевания гепатитом С: есть ли связь ? Вирусные гепатиты. 2001, N3.
8. Лопаткина Т.Н. Современная комбинированная терапия хронического гепати-та С ПегИнтроном и РЕБЕТОЛОМ. Вирусные гепатиты. 2001, N2.
9. Масалова О.В., Самохвалов Е.И., Петракова Н.В. и др. Выявление маркеров вируса гепатита С - белка нуклеокапсида, РНК и вирусспецифических антител в плаз-мах крови доноров. Вопр. вирусол. 2000, N2, С.14-18.
10. Маянский А.Н., Бурков А.Н., Астафьев Д.Г., Рассанов С.П. Персистенция ви-русов: иммунологические и патогенетические аспекты. Клин. медицина. 1998, N12, С.19-25.
11. Михайлов М.И. Лабораторная диагностика гепатита С (серологические мар-керы и методы их выявления). Вирусные гепатиты. 2001, N2
12. Николаева Л.И. Участие вирусного нуклеокапсидного белка в патогенезе ге-патита С. Мир вирусных гепатитов. 1999, N4.
13. Оленина Л.В., Соболев Б.Н. Тканевой тропизм вируса гепатита С. Вирусные гепатиты. 1999, N1, С. 11-17.
14. Семенов Т.А. Клеточный иммунный ответ при гепатите С. Вирусные гепа-титы. 2000, N1.
15. Соринсон С.Н., Корочкина О.В., Жданов Ю.Е. и др. Латентная фаза храни-ческого гепатита С: критерии диагностики и терапевтическая тактика. Вирусные гепа-титы. 1999, N1, С.17-21.
16. Bergsland E.K. Molecular mechanisms underlying the development of hepato-cel-lular carcinoma. Semin. Oncol. 2001, Vol.28, P.521-31.
- 17 .Blanchard E., Brand D., Trassard S. et al. Hepatitis C virus-like particle morpho-genesis. J. Virol. 2002, Vol.76, P.4073-9.
- 18 .Bonkovsky H.L., Metha S. Hepatitis C: A review and update. Dis. Mon. 2001, Vol.41, P.610-47.

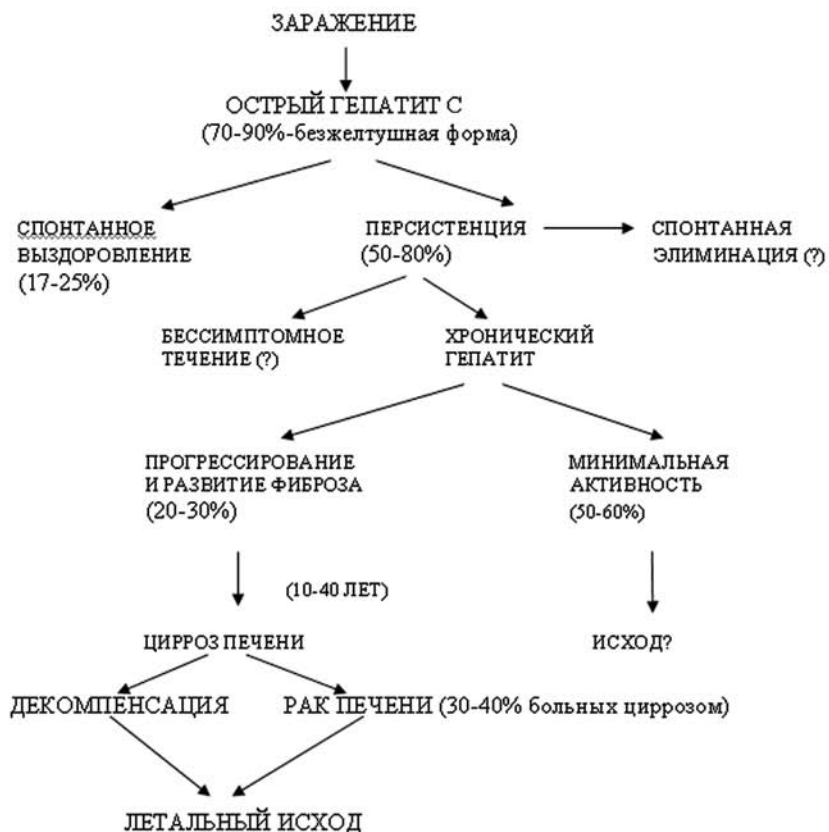
19. Carreno V. Present treatment expectations and risks of chronic hepatitis C. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002, Vol.8, P.74-9.
20. Flint M., Quinn E.R., Levy S. In search of hepatitis C virus receptor(s). *Clin. Liver Dis.* 2001, Vol.5, P.873-93.
21. Foster G.R., Goldin R.D., Thomas H.C. Chronic hepatitis C virus infection causes a significant reduction in quality life in the absence of cirrhosis. *Hepatology.* 1998, Vol.27, P.209-12.
22. Freeman A.J., Marinos G., Ffrench R.A., Lloyd A.R. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol. Cell Biol.* 2001, Vol.79, P.515-36.
23. Icardi G., Ansaldi F., Bruzzone B.M. et al. Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of new enzyme-linked immunosorbent as-say for HCV core antigen. *J. Clin. Microbiol.* 2001, Vol.39, P.3110-4.
24. Idilman R., Maria N.D., Colantoni A., Van Thiel D.H. Pathogenesis of hepatitis B and C-induced hepatocellular carcinoma. *J. Virol. Hepatitis.* 1998, Vol.5, P.285-299.
25. Lauer G.M., Walker M.D. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2001, Vol.345, P.41-52.
26. Liang T.J., Rehermann B., Seeff L.B. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention.
27. Liu D.X. A new hypothesis of pathogenetic mechanism of viral hepatitis B and C. *Med. Hypotheses.* 2001, Vol.56, P.405-8.
28. Nikolayeva L.I., Olenina L.V., Kolesanova E.F. Immunity in different types of hepatitis C. *Russ. J. Immunol.* 1999, Vol.4, P.92-112.
29. Nguyen M.H., Wright T.L. Therapeutic advances in the management of hepatitis B and hepatitis C. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2001, Vol.14, P.593-601.
30. Pawlotsky J.M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*, 2002, Vol.122, P.1554- 68.
31. Pietschman T., Lohmann V., Kaul A. et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.* 2002, Vol.76, P. 4008-21.
32. Prince A.M., Shata M.T. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver Dis.* 2001, Vol.5, P.1091-103.
33. Randall G., Rice C.M. Hepatitis C virus cell culture replication systems: their potential use for the development of antiviral therapies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2001, Vol.14, P.743-7.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Сравнительная оценка тест-систем для детекции антител к вирусу гепатита С

| № сыворотки | Anti-HCV EIA Ortho 3.0 | Ortho RIBA 3.0 MFG | | Result | c100(p) (NS4) | Ortho RIBA 3.0 MFG c22(p) cor | NS5 | Результаты ПЦР | «ИФА-анти-НСV» фирмы НПО «Диагностические системы» Нижний Новгород | «ВГС-ИФА-Авиценна» ООО МЦ «Авиценна» Санкт-Петербург | «Акваген-С-АТ-2» НПО «Аквапаст» г.Санкт-Петербург | «ВГС-DCM-стрип» ЗАО «МБС» г.Новосибирск | «ELISA Anti-HCV», Shenzhen 3 Moon Technology Co., China | «ELISA Anti-HCV», Beijing Wantai Biology Pharmacy Enterprise Co. | «ELISA Anti-HCV», Shanghai Siic Kenue Biotech Co.,Kenua |
|-------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|--------|---------------|-------------------------------|-----|----------------|--|--|---|---|---|--|---|
| | | с100(p) (NS4) | Ortho RIBA 3.0 MFG c22(p) cor | | | | | | | | | | | | |
| 15 | Pos | Ind | ± | ± | 3+ | - | - | - | 8,8 | 6,9 | 8,6 | 2,5 | 7,8 | 6,4 | 4,6 |
| 21 | Pos | Ind | ± | ± | 3+ | - | - | - | 3,4 | 1,4 | 7,0 | 0,85 | 1,8 | 0,6 | 1,1 |
| 49 | Pos | Ind | - | ± | 2+ | - | - | - | 1,3 | 0,02 | 0,02 | 0,34 | 1,1 | 0,4 | 0,5 |
| 79 | Pos | Ind | - | ± | 4+ | - | - | 1a | 10,1 | 10,9 | 11,8 | 2,5 | 10,3 | 11,3 | 12,2 |
| 81 | Pos | Ind | - | ± | 4+ | - | - | 3a | 9,5 | 11,5 | 11,9 | 2,1 | 9,1 | 8,7 | 8,8 |
| 96 | Pos | Ind | ± | ± | 2+ | - | - | - | 5,1 | 7,3 | 6,7 | 1,7 | 4,4 | 2,1 | 3,4 |
| 103 | Pos | Ind | ± | ± | 4+ | - | - | 3a | 9,8 | 13,5 | 11,2 | 3,0 | 8,0 | 9,6 | 7,1 |
| 107 | Pos | Ind | ± | ± | + | - | - | - | 1,8 | 2,9 | 6,8 | 0,64 | 1,2 | 0,57 | 1,5 |
| 124 | Pos | Ind | - | ± | 4+ | - | - | - | 7,8 | 3,1 | 5,6 | 0,83 | 7,8 | 8,4 | 3,1 |
| 11 | Pos | Pos | ± | - | 3+ | 4+ | - | - | 9,6 | 12,8 | 11,6 | 2,6 | 13,3 | 11,9 | 9,7 |
| 16 | Pos | Pos | ± | 4+ | - | - | - | 3 | 4,7 | 1,8 | 6,6 | 0,86 | 3,1 | 1,9 | 6,6 |
| 23 | Pos | Pos | ± | 2+ | 2+ | - | - | 1b | 9,2 | 5,1 | 11,9 | 1,5 | 11 | 7,9 | 1,7 |
| 24 | Pos | Pos | 2+ | 2+ | 4+ | + | - | 1b | 20,2 | 13,5 | 10,9 | 3,9 | 12,8 | 16,1 | 11,9 |
| 56 | Pos | Pos | 3+ | 2+ | 4+ | - | - | - | 10,0 | 13,8 | 11,2 | 2,3 | 14,8 | 11,9 | 12,1 |
| 61 | Pos | Pos | 4+ | 2+ | 4+ | - | - | 3 | 10,0 | 10,9 | 11,2 | 2,5 | 14,8 | 6,2 | 5,1 |
| 67 | Pos | Pos | 2+ | 2+ | 4+ | - | - | 1b | 8,6 | 11,1 | 11,1 | 1,8 | 3,9 | 1,0 | 2,5 |
| 68 | Pos | Pos | - | 2+ | 2+ | - | - | - | 5,5 | 2,2 | 7,7 | 1,1 | 0,78 | 0,75 | 1,5 |
| 69 | Pos | Pos | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | - | - | 9,1 | 11,7 | 11,3 | 3,7 | 8,0 | 12,7 | 7,3 |
| 109 | Pos | Pos | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | - | 1b | 9,7 | 11,9 | 11,9 | 10,0 | 10,7 | 9,4 | 10,9 |
| 110 | Pos | Pos | 4+ | 2+ | - | - | - | 3a | 10,2 | 9,3 | 7,7 | 1,5 | 1,1 | 0,4 | 1,56 |
| 118 | Pos | Pos | 4+ | 2+ | - | + | - | - | 9,7 | 10,6 | 11,4 | 2,0 | 0,52 | 6,3 | 5,5 |
| 122 | Pos | Pos | - | 2+ | 4+ | - | - | 3 | 10,1 | 10,8 | 12,7 | 8,2 | 8,2 | 6,3 | 5,5 |

Варианты естественного течения HCV-инфекции





Нижний Новгород

Главный офис:

ООО «НПО «Диагностические системы»
603093, г. Нижний Новгород,
ул. Яблоневая, д. 22
тел. (831) 434-86-83

Отдел сбыта:

ул. Нижне-Волжская набережная, д. 9
тел. (831) 461-92-02
тел./факс (831) 461-92-15, 461-92-16, 461-92-17
info@npods.nnov.ru
selling@npods.ru
http://www.npods.ru

Региональные предприятия

| | |
|------------------------------|--|
| Москва | ООО "Диагностические системы—Столица" 117405, г. Москва, ул. Дорожная, д. 60 Б тел. (495) 411-96-84, 411-96-85, 411-96-86 e-mail: ds-stolica@bk.ru zav2006@bk.ru |
| Санкт-Петербург | ООО "Диагностические системы—СПб" 194044, г. Санкт-Петербург, пр. Большой Сампсониевский, д. 66, Литер А тел/ факс (812) 702-17-13, 702-17-14 spb@npods.ru managerspb@npods.ru |
| Красноярск | ООО "Диагностические системы—Сибирь" 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 16 д тел/ факс (3912) 54-16-55, 54-14-66, 54-17-58 ds-siberia@scn.ru |
| Республика Украина | ООО "Диагностические системы—Украина" 04210, г. Киев, а/я 119 тел. (10-380-44) 501-90-80, тел/факс 501-91-00 ua@npods.ru |
| Республика Казахстан | ТОО "Диагностические системы—Казахстан" 050034, г. Алматы, ул. Бродского, д. 37 а, офис 227 тел./факс (3272) 27-37-68, 27-37-69 ds-kazakhstan@mail.kz |
| Республика Узбекистан | ООО "Диагностические системы—Бактрия" 100015 г. Ташкент, ул. Ойбек, д. 32 тел./факс (998 71) 152-23-15, 152-23-16 тел.: (998 98) 127-15-87, (998 93) 181-75-21, (998 97) 157-20-77 ds-baktriya@mail.ru |
| Ростов-на-Дону | Обособленное подразделение 344068, г. Ростов-на-Дону пр. М.Нагибина, д. 33 а/47, 3 этаж, офис 5 тел/факс (863) 292-41-01, моб. 8-8632-75-66-22 RostovDon@npods.ru |
| Чита | Обособленное подразделение 672000, г. Чита, ул. 9 января, д. 6, офис 103 тел. (3022) 35-27-91, chitanpods@mail.ru |

