

ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА А

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Нижний Новгород
2007

Пименов В.К., к.б.н., ООО “НПО “Диагностические системы”
Уланова Т.И., д.б.н., ООО “НПО “Диагностические системы”

Содержание

Этиология	4
Эпидемиология	6
Патогенез	8
Клиника	8
Диагностика	11
Лечение	14
Профилактика	14
Иммуноферментные тест-системы для диагностики гепатита А	16
Список литературы	22

Гепатит А является одной из актуальных проблем мирового здравоохранения. Прежде всего, это связано с высоким уровнем распространения этой инфекции: до 30% в развитых странах и до 100% в развивающихся странах, гиперэндемичных по гепатиту А. Согласно данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется 1,4 млн случаев острого гепатита А. Данные сероэпидемиологических обследований свидетельствуют, что фактическая заболеваемость в 3-10 раз выше.

К настоящему времени наука достигла больших успехов в изучении проблемы гепатита А. Охарактеризован возбудитель заболевания—вирус гепатита А, исследованы эпидемиологические закономерности инфекции, разработаны методы специфической диагностики и вакцинопрофилактики гепатита А. Во второй половине 90-х годов даже казалось, что проблема гепатита А уже решена. Однако позднее были получены новые данные о молекулярной организации возбудителя и патогенезе инфекции. Показано, что клиника и эпидемиология инфекции изменяется, причем в сторону увеличения тяжести течения, продемонстрирована возможность парентерального заражения гепатитом А. Все это совпало с очередным периодом роста заболеваемости и научный интерес к проблеме гепатита А резко возрос. По мнению Клода Вандама, пришло время "новой схватки со старой болезнью".

Этиология

Инфекционная природа поражения печени, сопровождающегося желтухой, была предсказана еще в начале 20 века. Во время Второй Мировой Войны отмечалось, что существует как минимум 2 разных возбудителя, один

из которых передается через кровь, а другой—фекально-оральным путем. Возбудитель гепатита А был впервые идентифицирован Feinstone S.M. et.al., 1973 методом иммуноэлектроноскопии в фекалиях экспериментально зараженного добровольца. Была показана возможность заражения этим материалом приматов—мармозет и шимпанзе, у которых вирусные частицы были обнаружены не только в фекалиях, но и в цитоплазме гепатоцитов. Аналогичный вирус был обнаружен в экстрактах фекалий больных гепатитом А в условиях естественного заражения во время эпидемических вспышек. Огромное значение имело доказательство репродукции вируса в первичных и перевиваемых линиях клеток человека и обезьян. Это дало возможность моделирования инфекции в условиях *in vitro*, а также послужило основой для получения культурального вирусного антигена, используемого в диагностических целях и для разработки вакцинных препаратов.

Вирус гепатита А (HAV) относится к роду *Hepatovirus* в составе семейства *Picornaviridae*. На основании сходства биофизических и биохимических характеристик с другими пикорнавирусами HAV ранее классифицировался как энтеровирус 72-го серотипа. Морфологически HAV представляет собой сферические частицы диаметром 27-30 нм, построенные по типу икосаэдрической симметрии и лишённые оболочки. Геном вируса представлен линейной одноцепочечной РНК положительной полярности, включающей около 7500 нуклеотидных остатков. В нем определяются: 5'-нетранслируемая область, единичная открытая рамка считывания, кодирующая синтез структурных и неструктурных белков

вируса, и короткая 3'-нетранслируемая область, заканчивающаяся поли-А-последовательностью.

Зрелые, т.е. содержащие полноценную РНК, вирионы HAV имеют плавучую плотность в хлориде цезия 1,32-1,64 г/см³ и коэффициент седиментации в нейтральных растворах са-

структурные (VP1, VP2, VP3, VP4) и неструктурные (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) белки вируса (рис 1). Структурные белки VP1, VP2, VP3 образуют капсид вируса. По некоторым данным, в состав капсида входит и VP4-протеин. Формирование вириона происходит следующим образом (см. рис.1).

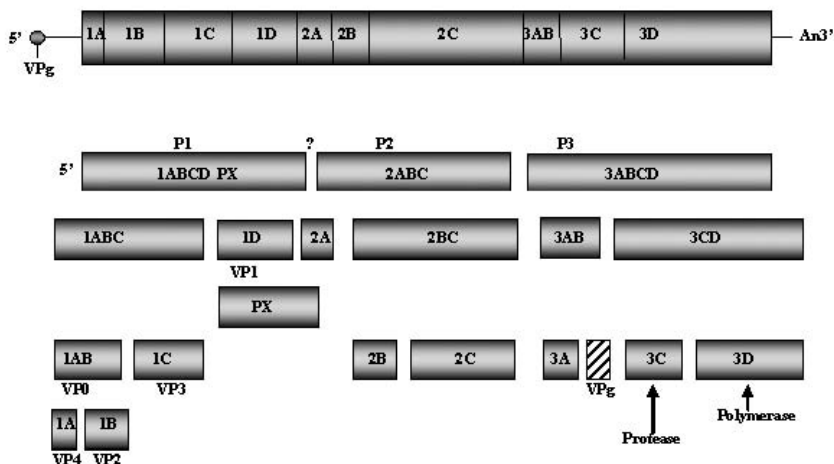


Рис. 1. Схема процессинга полипротеина -предшественника вируса гепатита А. (Steepleton J.T., 1995).

харозы 156-160S. В фекалиях больных в небольших концентрациях могут встречаться частицы с иными значениями плавучей плотности (от 1,27 до 1,48 г/см³) и коэффициента седиментации (50 и 90S). Они соответствуют так называемым дефектным вирионам, отличающимся от зрелых вирионов тем, что не содержат РНК или содержат только ее фрагменты, или же имеют повышенную проницаемость белковой оболочки.

Геном вируса кодирует полипротеин—предшественник, состоящий из 2227 аминокислотных остатков. (Yokosuka, 2000). В ходе посттрансляционного процессинга этот полипротеин расщепляется на ряд фрагментов, в результате чего образуются

1). Расщепление структурного участка P1 полипротеина -предшественника с образованием белков VP0 (VP2+VP4), VP3 и VPX (VP1+2A);

2). Формирование пентамеров, состоящих из 5 копий каждого из белков VP0, VP3, VPX;

3). Образование препровириона, состоящего из одной молекулы вирусной РНК и 12 пентамеров;

4). Путем расщепления VPX на VP1 и 2A формируется провирион, состоящий из одной молекулы РНК и 60 копий VP0, VP1, VP3;

5). Расщепление VP0 на VP2 и VP4 и образование вирусной частицы, в структуру которой входят молекула РНК и капсид, образованный 60 копия-

ми белков VP1, VP2 и VP3. Капсид построен из отдельных капсомеров, симметрично уложенных по принципу пятиосевого двенадцатигранника.

Функции большинства неструктурных белков вируса изучены мало. Белок РЗС является сериновой протеиназой и играет ключевую роль в процессинге полипротеина—предшественника HAV. Предполагается, что РЗD является РНК-полимеразой, Р2С обладает хеликазной активностью. Белки РЗА и РЗВ связаны с РНК (Yokosuka O., 2000).

HAV считается одним из самых устойчивых вирусов человека к факторам внешнего воздействия. При 60 °С он полностью сохраняется в течение часа и лишь частично инактивируется за 10-12 часов. При кипячении погибает через 5 мин. Вирус остается инфекционным в течение 1 месяца после высушивания на твердой поверхности в условиях обычного помещения. В воде HAV может сохраняться от 3 до 10 месяцев, в фекалиях—до 30 суток. На выживаемости HAV не сказывается реакция среды в пределах pH 3-10. Он устойчив к действию органических растворителей, таких как эфир, хлороформ, фреон. Для стерилизации материалов, содержащих HAV, рекомендуется автоклавирование либо применение дезинфицирующих средств: хлорамина, перманганат калия и др.

При секвенировании генома вируса, выделенного из изолятов, полученных от больных ГА из разных регионов мира, идентифицировано 4 генотипа (I, II, III, VII), еще 3 (IV, V, VI) полученных из экстрактов фекалий зараженных обезьян. Однако, вариабельность генома практически не затрагивает антигенную структуру вируса. Иммунодоминантный эпитоп, с которым образуются нейтрализующие антите-

ла, является общим для всех генотипов вируса. Поэтому все генотипы HAV относятся к одному серотипу (Van Hattem J., Chen X.Q., 1999).

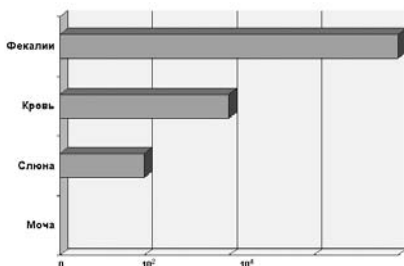


Рис.2. Концентрация вируса гепатита А в различных биологических жидкостях

Эпидемиология

Гепатит А—антропонозная нетрансмиссивная инфекция с энтеральным механизмом заражения со спорадическим и эпидемическим распространением. ГА регистрируется практически повсеместно, однако интенсивность его распространения в разных регионах мира варьирует в широких пределах: от единичных случаев в странах с высоким социально-гигиеническим уровнем жизни до показателей порядка нескольких тысяч на 100 000 населения в развивающихся странах. Россия относится к регионам с высоким уровнем распространенности HAV-инфекции.

Эпидемиологически гепатит А имеет три характерных проявления:

1. Хорошо очерченные вспышки водного или пищевого происхождения с распознаваемым источником заражения (около 5% всей заболеваемости);

2. Серийные одновременные и последовательные случаи заболевания в организованных детских и подростковых коллективах, а также в семьях

(около 2/3 всей заболеваемости);

3. Спорадические случаи, преимущественно среди взрослых, при которых связь с источником заражения установить чаще всего не удастся. (Балаян М.С., Михайлов М.И., 1999).

Основной путь передачи вируса— фекально-оральный с реализацией через бытовой контакт, пищевые продукты и воду. Гепатит А с полным основанием относят к "болезням грязных рук". На разных территориях значимость того или иного пути неодинакова. В России преобладает контактная передача, часто регистрируются ограниченные пищевые вспышки инфекции. В развивающихся странах не редкость крупные водные вспышки ГА, связанные с фекальным загрязнением водоемов. Первопричиной в любом случае служит низкий уровень санитарной культуры, пренебрежение элементарными правилами личной и общественной гигиены.

Другие пути передачи при гепатите А не имеют существенного значения. Допускают половой и парентеральный пути передачи гепатита А, на что указывает значительная инфицированность среди гомосексуалистов и наркоманов. Возможность вертикальной передачи вируса на сегодняшний день не доказана.

Восприимчивость к гепатиту А всеобщая, хотя болеют, в основном, дети. Их доля в суммарной заболеваемости достигает 70-80%. Исключение составляют дети до 1 года ввиду сохранения у них пассивного иммунитета, переданного от матери. Интересно, что соотношение клинически манифестных и бессимптомных форм инфекции в разных возрастных группах неодинаково. У маленьких детей первых 2-х лет жизни бессимптомное течение инфекции наблюдается в 90% случаев, у детей до 10 лет— в 50%. Среди взрос-

слых соотношение клинически манифестных и латентных форм составляет 5:1. Исходя из этих данных, следует, что основными источниками инфекции являются дети с безжелтушными, субклиническими и иннапарантными формами инфекции (рис.3).

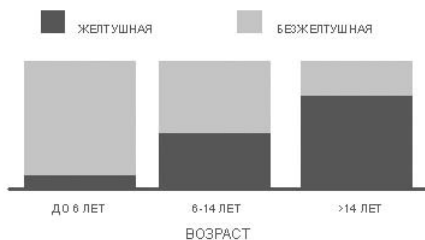


Рис. 3 Относительная частота желтухи при гепатите А в разных возрастных группах.

В странах умеренного пояса для гепатита А характерна выраженная осенне-зимняя сезонность. Продолжительность сезонного подъема составляет от 4 до 6 месяцев с пиком заболеваемости в октябре-ноябре. Начало подъема заболеваемости приходится на сентябрь и даже август (в годы с максимальным уровнем заболеваемости). В гиперэндемичных регионах субтропического и тропического поясов сезонных колебаний не наблюдается.

Россия относится к странам с высоким уровнем заболеваемости гепатитом А. Можно отметить следующие факторы, способствующие его широкому распространению: высокая доля организованных детей (ясли, детские сады), подростков (школы, интернаты, молодежные лагеря и т.д.), плохие условия проживания большинства граждан, неудовлетворительное состояние коммунальной службы, миграция населения. (Михайлов М.И., 2002).

Патогенез

Основной мишенью для вируса гепатита А являются клетки печени—гепатоциты. Внепеченочная репликация HAV не установлена. Наиболее вероятный механизм попадания вируса в печень—поступление из кишечника с кровью через воротную вену. Предполагается, что первичными местами размножения вируса могут быть ротоглотка, слюнные железы и прилежащие к ним лимфоузлы. В этом случае вирус достигает клеток печени через кровеносные и лимфатические сосуды. Непосредственное проникновение HAV в гепатоциты, как полагают, связано с наличием на их мембране соответствующих рецепторов. Активная репликация вируса в клетке приводит к ее аутолитическому распаду и высвобождению вновь образованных вирусных частиц, поражающих следующие клетки. Вирус попадает в желчные канальцы, далее поступает в кишечник и выделяется с фекалиями во внешнюю среду. Часть вирусных частиц проникает в кровь, что приводит к появлению симптомов интоксикации в продромальном периоде. На стадии первичной репликации отчетливых повреждений гепатоцитов не обнаруживается.

Причиной цитолиза гепатоцитов при гепатите А является как непосредственное цитопатическое действие вируса, так и поражение инфицированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Иммуноопосредованный цитолиз преобладает в период разгара инфекции. На этой стадии наблюдаются воспалительные и некробиотические процессы, происходящие в перипортальной зоне печеночных долек и портальных трактах.

Патоморфологические изменения печени при гепатите А выражены в ви-

де ограниченного некроза. Регистрируется фокальный (точечный), пятнистый (spotty), реже зональный тип некроза печени. Фокальный и пятнистый некроз преимущественно наблюдается при легких формах заболевания. Зональный некроз соответствует среднетяжелому течению болезни и характеризуется более обширным некробиотическим процессом с поражением уже не отдельных гепатоцитов, а целых участков печеночной ткани. При фульминантном гепатите А наблюдается острый массивный некроз печени.

Однако, гепатит А рассматривают как самоограничивающуюся инфекцию, что обусловлено высокой иммуногенностью вируса. Происходит комплексная активация всех звеньев иммунной системы. Клоны вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов уничтожают пораженные вирусом клетки. Специфические антитела нейтрализуют вирус в биологических жидкостях. Такой быстрый интенсивный иммунный ответ препятствует поражению неинфицированных гепатоцитов и приводит к полной элиминации вируса. При моноинфекции HAV, как правило, не наблюдается ни длительная циркуляция вируса, ни хронизация процесса. Иное течение заболевания может быть обусловлено ко или суперинфекцией другими вирусами. В исключительных случаях, при наличии генетической предрасположенности HAV-инфекция может стать пусковым механизмом развития хронического активного гепатита первого типа.

Клиника

Как и другие вирусные гепатиты, гепатит А характеризуется многообразием клинических проявлений. По сте-

пени выраженности клинических проявлений выделяют бессимптомные (иннапарантная и субклиническая) и манифестные (желтушная, безжелтушная, стертая) формы заболевания. По длительности течения инфекция может быть острая и затяжная, по степени тяжести течения легкая, средней тяжести и тяжелая. Гепатит А, как правило, заканчивается полным выздоровлением, однако в ряде случаев могут наблюдаться остаточные явления (постгепатитный синдром, затяжная реконвалесценция, поражения желчных путей—дискинезия и холецистит). Из возможных осложнений после инфекции выделяют рецидивы, обострения, поражения желчевыводящих путей.

Основными клиническими особенностями гепатита А являются преимущественная легкость течения, крайняя редкость развития тяжелых форм, быстрое купирование инфекционного процесса с ранней реконвалесценцией и полным выздоровлением в срок 1,5-2 месяца без угрозы хронизации. (Соринсон С.Н., 1997).

В манифестных случаях болезни выделяют следующие периоды: инкубационный, преджелтушный (продромальный), желтушный и реконвалесценции (восстановительный период).

Гепатит А называют гепатитом с короткой инкубацией. Инкубационный период составляет в среднем 14-28 дней (от 7 до 50 дней). Последняя треть инкубации соответствует наиболее интенсивной элиминации вируса, что определяет особую эпидемиологическую опасность этого периода. Повышение АлАт отмечается в конце периода инкубации, за 5-7 дней до появления желтухи

Типичная желтушная форма гепатита А наблюдается у 10% инфицированных. Характеризуется четкой циклич-

ностью течения и последовательной сменой преджелтушного, желтушного и восстановительного периодов. В преджелтушный период (длительность от 1 до 14 дней) у больных отмечается повышение температуры (до 38-38,5 °С) и гриппоподобные симптомы: слабость, тошнота, утомляемость, сонливость в сочетании с зыбким ночным сном, головная боль, боль в мышцах и суставах. У младших детей может иметь место диарея, у старших детей и у взрослых чаще отмечаются боли в правом подреберье. Такое состояние соответствует фазе наибольшей активности инфекционного процесса, подтверждаемой наибольшей концентрацией вируса в фекалиях. Практически у всех больных регистрируется увеличение печени (гепатомегалия). У детей может наблюдаться абдоминальный синдром (нарастающая интенсивность боли в животе), который продолжается 1-2 дня и спонтанно проходит. В целом, в преджелтушном периоде все симптомы выражены не резко, что определяет позднюю обращаемость к врачу.

Желтушный период (общая продолжительность 1-2 недели) характеризуется появлением темной мочи, обесцвеченного кала, пожелтением слизистых, склер и кожи. Появление желтухи, как правило, сочетается с улучшением состояния больных. Уменьшаются признаки интоксикации, исчезают поташивание, рвота, познание, ломота в мышцах и костях. Улучшение самочувствия обычно фиксируется с первого дня, реже спустя 2-3 дня с появления желтухи. Такое течение заболевания характерно для детей и взрослых и соответствует снижению инфекционного процесса, уменьшению репликационного вируса.

При гепатите А желтуха не достигает большой интенсивности. Содержание

билирубина превышает норму не более чем в 4-5 раз. Восстановление желчеотделения с просветлением мочи и появлением сначала пестрого, а затем стабильно окрашенного кала соответствует кризису—точке "перелома".

В отличие от быстрой динамики общего состояния больных, гепатомегалия сохраняется на всем протяжении желтушного периода. Это соответствует не столько инфекционному процессу, сколько органной патологии. Сохраняются и повышенные значения АлАТ, подтверждая незавершенность цитолитических процессов в печени. Из общих клинических проявлений отмечаются признаки астенизации, тенденция к брадикардии и гипотензии, глухость сердечных тонов.

Восстановительный период при гепатите А характеризуется обратным развитием всех патологических изменений: нормализуются размеры печени, восстанавливаются показатели пигментного обмена, ликвидируются астеновегетативные нарушения. Дольше других сохраняются повышенные значения АлАТ. У подавляющего большинства больных (90%) наблюдается нормальная реконвалесценция, когда клиническое выздоровление наступает в пределах 3-4 недель от начала заболевания. У остальных регистрируется затянувшаяся реконвалесценция продолжительностью до нескольких месяцев. У отдельных пациентов наступают обострения болезни, проявляющиеся ухудшением клинических и лабораторных показателей. Рецидивы возникают в период реконвалесценции через 1-3 месяца после клинического выздоровления и характеризуются повторными клиникобиохимическими изменениями. Это связано с возобновлением активной репликации вируса. Описаны холестати-

ческие варианты течения гепатита А, при которых повышенное содержание билирубина в сыворотке сохраняется 2-5 мес.

Безжелтушная, субклиническая и иннапарантная форма гепатита А в клинической практике практически не распознаются и, в основном, регистрируются в детских эпидемических очагах. При целенаправленном обследовании с индикацией специфических маркеров эти формы гепатита А выявляются в несколько раз чаще, чем желтушная форма. Клинические проявления при субклинической и иннапарантной формах вообще отсутствуют, при безжелтушной—близки к симптомокомплексу продромального периода. При лабораторных исследованиях регистрируется повышение уровня АлАТ, тимоловой пробы, циркуляция специфических антител.

В подавляющем большинстве случаев, независимо от тяжести заболевания, моноинфекция гепатита А заканчивается выздоровлением и восстановлением функций печени. Летальность при гепатите А составляет по разным данным 0,01-0,1%. Основная причина смерти—фульминантный гепатит, при котором происходит быстрая массовая гибель гепатоцитов вследствие некроза. Клиническими признаками ухудшения течения заболевания являются уменьшение печени, нарастающая апатия и усталость, в финальной стадии—дезориентация и прекома (кома) с появлением печеночного запаха изо рта. Развитие хронического гепатита А не зарегистрировано. Риск хронизации возникает при присоединении вирусного гепатита иной этиологии (в основном, вирусом гепатита В и С) (рис.4).



Рис. 4. Основные исходы болезни при гепатите А.

Диагностика

При постановке диагноза гепатита А необходимо учитывать целый комплекс эпидемиологических данных (контакты с больными, пребывание в неблагополучном по гепатиту А районе), клинических показателей (характерные клинико-биохимические синдромы) и результатов лабораторных исследований (билирубин в моче, общий и прямой билирубин в сыворотке, повышение активности АлАТ в 10-40 раз, снижение сулемового титра, повышение тимоловой пробы, уровня щелочной фосфатазы, умеренное повышение гаммаглобулинов в сыворотке крови, характер изменения гемо-

граммы: нормоцитоз или лейкопения, относительный лимфоцитоз, замедление СОЭ). Однако, установить этиологический диагноз гепатита А на основании этих данных практически невозможно ввиду сходства клинической картины острого периода болезни при всех вирусных гепатитах, трудностей получения достоверных данных эпиданамнеза и интерпретации результатов неспецифических биохимических и гематологических исследований. Окончательный диагноз гепатита А может быть подтвержден только специфическими иммунохимическими (ИФА, РИА) или молекулярно-биологическими (ПЦР) методами. К основным маркерам HAV-инфекции относятся антитела классов М и G к вирусу (анти-HAV-IgM и анти-HAV-IgG), антиген вируса (HAV-Ag), вирусная РНК (HAV-RNA). На рис. 5 представлена динамика различных маркеров гепатита А.

Антитела образуются ко всем антигенам вируса гепатита А. Первоначально, для определения специфических антител использовался вирусный

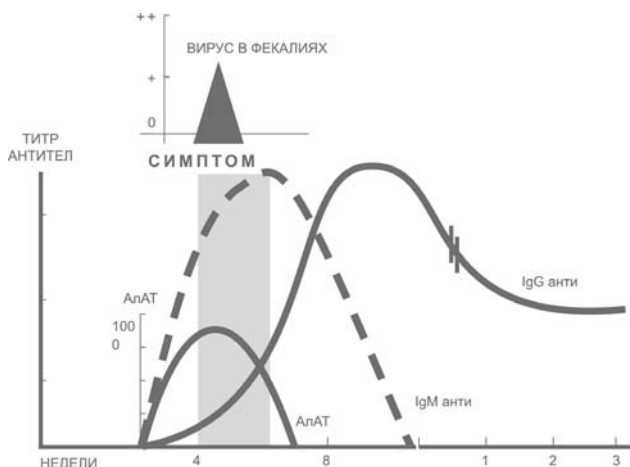


Рис. 5. Динамика маркеров инфицирования при гепатите А.

антиген, полученный путем культивирования на различных клеточных линиях. По сути, он представляет собой цельные вирусные частицы (вирионы). Антигенные свойства вириона определяются структурными белками, входящими в состав вирусного капсида. Антитела к капсиду обладают свойством нейтрализовать активность вируса. Показано, что антигенные детерминанты капсида вируса, узнаваемые "нейтрализующими" антителами, имеют конформационную природу и образуются только при самосборке вириона. Такие антитела не взаимодействуют с изолированными структурными и неструктурными белками вируса.

В широкой клинической и эпидемиологической практике наиболее распространено определение анти-HAV-IgM к капсиду вируса. Их обнаружение однозначно указывает на текущую или недавно перенесенную HAV-инфекцию. Эти антитела появляются в сыворотке крови еще в преджелтушный период, за 3-5 дней до появления первых симптомов, и циркулируют несколько месяцев. Часто анти-HAV-IgM к капсиду выявляются и через 6-12 месяцев, являясь всего лишь свидетельством затянувшейся реконвалесценции при гепатите А.

Антитела класса IgG к HAV появляются в крови несколько позже анти-HAV-IgM, однако нарабатываются в значительно более высоких титрах. Их появление характеризует окончание активного инфекционного процесса, санацию организма и рассматривается как маркер пастинфекции. Антитела класса G присутствуют в крови всех переболевших гепатитом А пожизненно, обеспечивая протективный иммунитет.

В лабораторной практике используется определение суммарных (общих) антител к HAV. Для клиницистов

значение такого теста, не позволяющего разграничить острую стадию болезни от пастинфекции, не велико. Однако при эпидемиологических исследованиях частота встречаемости суммарных антител к HAV является важным показателем распространенности вирусного гепатита А.

В последние годы с помощью синтетических пептидов и рекомбинантных белков было проведено детальное картирование сайтов узнавания для специфических антител в структурных и неструктурных белках HAV. Антигенные детерминанты были локализованы во всех белках вируса. Показано, что наибольшей диагностической ценностью обладают рекомбинантные белки и синтетические пептиды, воспроизводящие фрагменты неструктурных (P2A, P2B, P2C) и структурных (VP4-VP2, VP3, VP1) протеинов вируса (Khudyakov Y. et.al, 1999). Композиция из этих антигенов позволяла выявлять анти-HAV-IgM в 100% образцов больных острым гепатитом А. Кроме того, в N-концевой части белка VP1 был обнаружен еще один "сайт нейтрализации", отличающийся от конформационного сайта, локализованного в составе вирусного капсида.

Были обнаружены существенные различия в динамике антител к отдельным белкам HAV и к вирусному капсиду (Khudyakov Y. et.al., 1999). Антитела класса M в обоих случаях появлялись одновременно на 3-4 неделе заболевания. Как уже упоминалось выше, с помощью культурального антигена анти-HAV-IgM часто регистрируются спустя 6 и более месяцев после инфекции, в то время как анти-HAV-IgM к отдельным белкам — через 2-3 месяца. Таким образом, диагностикумы для определения антител класса M к отдельным белкам вируса позволяют выявлять больных в острой

фазе инфекции и дифференцировать их от поздних реконвалесцентов гепатита А.

Определение HAV-антигена редко применяется в клинической

практике. Пик экскреции вируса, когда он может быть обнаружен в фекалиях и очень редко в крови, приходится на инкубационный и начало преджелтушного периода. Именно в это время больные представляют наибольшую эпидемическую опасность. К моменту проявления симптомов заболевания и обращения к врачу HAV-Ag, как правило, уже не обнаруживается. Кроме того, необходимо учитывать перемежающийся характер выделения вируса. Даже при исследовании нескольких (серийных) образцов фекалий, отрицательный результат не позволяет исключить наличие гепатита А. Эпидемиологи используют выявление HAV-Ag в объектах внешней среды (в основном, в воде) для обнаружения источника распространения инфекции. Это возможно только после предварительной концентрации исследуемого материала в 1000 раз и более.

РНК вируса гепатита А может быть выявлена в крови и фекалиях больных. Обнаружение HAV-РНК однозначно указывает не только на наличие вируса, но и его активную репликацию. **Высокая чувствительность метода.**

Опорные критерии первичной диагностики гепатита А:

о Указания о контактах с больными с учетом продолжительности инкубации

о Групповая заболеваемость с формированием эпидемических очагов (особенно в детских и молодежных коллективах)

о Характерная сезонность с максимумом заболеваемости в сентябре-ноябре

о Детский (3-10 лет), подростковый, молодой возраст заболевших

о Острое начало болезни с выраженной температурной реакцией и проявлениями интоксикации

о Увеличение печени, нередко в сочетании с увеличением селезенки

о Короткий преджелтушный период (4-6 дней), преимущественно протекающий с диспепсическими расстройствами

о Улучшение общего состояния больных при появлении желтухи

о Слабая интоксикация и малая продолжительность желтухи

о Редкое развитие тяжелых форм болезни, преимущественно у неиммунных лиц пожилого возраста

о Отсутствии хронизации процесса

о Повышение АлАТ, увеличение показателей тимоловой пробы

о Обнаружение в крови анти-HAV-IgM, а в начальном периоде и HAV-РНК. Обнаружение в фекалиях HAV-Ag.

ПЦР позволяет выявлять HAV-РНК практически с первых дней после заражения. Сроки выявления РНК вируса, как правило, совпадают со сроками выявления HAV-Ag. Как и HAV-Ag, РНК вируса является прямым показателем инфекционной опасности. В крови РНК обнаруживается у большинства больных в острый период инфекции, что подтверждает возможность постранифузионного и других парентеральных путей заражения ГА. В целом, индикация HAV-РНК может явиться арбитражным методом подтверждения диагноза и оценки активности инфекционного процесса.

Лечение

Как уже отмечалось, в подавляющем большинстве случаев наблюдается благоприятное течение острого гепатита А. В связи с ранним спонтанным окончанием инфекционного процесса, необходимость в противовирусной терапии, в частности, назначении препаратов интерферона, не возникает. Лечение не включает в себя воздействие на вирус и ограничивается средствами, поддерживающими функцию печени.

Согласно инструктивным материалам, все больные гепатитом А подлежат госпитализации в инфекционные стационары. Больным в острый период инфекции назначают постельный режим. Некоторые больные жалуются на тошноту и рвоту. При повторной рвоте показана инфузионная терапия (жидкость, растворы электролитов и питательных веществ).

Больные, у которых острый гепатит сопровождается холестазом, иногда испытывают мучительный зуд. В таких случаях назначают лекарственные средства, связывающие желчные кислоты, или антигистаминные средства.

Использование препаратов кортикостероидов быстро приводит у многих больных к улучшению субъективного самочувствия, к снижению уровня билирубина и активности трансаминаз. Однако общая длительность заболевания не уменьшается и сохраняется опасность рецидивов.

Профилактика

Санитарно-гигиенические и противоэпидемические мероприятия при гепатите А соответствуют основным направлениям профилактики других антропонозных инфекций с энтераль-

ным механизмом передачи. Нейтрализация источников инфекции реализуется на основе ранней диагностики и изоляции заболевших. Это относится не только к желтушным, но и, по возможности, безжелтушным и субклиническим формам болезни. При гепатите А активная элиминация вируса продолжается сравнительно недолго, 2-4 недели после заражения. Наблюдения в эпидемических очагах продолжают-ся 35 дней со дня изоляции последнего больного. При выявлении вновь заболевших отсчет времени начинается заново (Соринсон С.Н., 1997). Для пресечения путей передачи инфекции наиболее эффективным было бы радикальное повышение санитарно-гигиенических условий жизни, включающее улучшение благоустройства и коммунального хозяйства, контроль за общественным питанием и системой водоснабжения, пропаганду правил общественной и личной гигиены. Значительное снижение заболеваемости гепатитом А в развитых странах во многом достигнуто за счет этих мероприятий.

Другое направление профилактики гепатита А—повышение невосприимчивости населения к инфекции, достигаемое за счет активной и пассивной иммунизации.

В 90-е годы на основе живого и инактивированного цельновирионного вирусного антигена были созданы вакцины против гепатита А. Результаты их применения свидетельствуют о высокой эпидемиологической эффективности, что позволяет всерьез обсуждать вопрос о полной ликвидации заболеваемости гепатитом А. Активный иммунитет вырабатывается у подавляющего большинства вакцинированных (98%) и сохраняется в течение 10-12 лет. Первичная задача вакцинации заключается в защите кон-

кретного человека от инфекции. Стратегия вакцинации направлена на общее снижение и даже ускорение заболеваемости путем предотвращения передачи вируса. Приказом №229 МЗ РФ от 27.06.2001 вакцинация против гепатита А введена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. В первую очередь, иммунизации подлежат дети, так как это позволит не только снизить заболеваемость в этой группе, но и во многом предотвратить дальнейшее распространение инфекции. Кроме того, вакцинацию рекомендуется проводить в группах риска, к которым относятся:

- 1) лица, выезжающие в регионы с высокой заболеваемостью ГА;

- 2) медицинские работники, персонал детских учреждений;

- 3) работники сферы обслуживания населения (особенно занятые в организациях общественного питания), работники по обслуживанию водопроводных и канализационных сооружений, солдаты, гомосексуалисты.

Естественно приобретенный после инфекции гепатита А иммунитет сохраняется в большинстве случаев пожизненно, поэтому необходимость вакцинации каждого конкретного человека должна решаться индивидуально. Производители вакцин заявляют об их высокой эффективности и отсутствии побочных эффектов. Однако, для оценки до и поствакцинального иммунитета, важно оценить уровень протективных антител класса G к вирусу. Положительный результат на анти-HAV-IgG говорит о том, что в вакцинации нет необходимости. После проведения иммунизации защитная концентрация антител к HAV в сыворотке должна составлять не менее 20 мМЕ/мл. Именно этот уровень обеспечивает защитный эффект от заражения гепатитом А.

В ответ на введение вакцины в организме начинается наработка антител к капсиду вируса. В ранний период закономерно выявляются анти-HAV-IgM. В связи с этим, в лабораторной диагностике важно разграничивать анти-HAV-IgM, появившиеся в результате инфекции гепатита А, от поствакцинальных антител. Это возможно при использовании в качестве антигенной основы тест-систем неструктурных белков HAV.

Эффективность пассивной иммунизации (иммуноглобулино-профилактики) заведомо ниже активной. В целях пассивной иммунизации применяется нормальный иммуноглобулин человека, содержащий антитела к вирусу гепатита А в высоком титре. Интересно, что при других вирусных гепатитах (В, С, D, Е) нормальный иммуноглобулин профилактическим действием не обладает. Эффективность использования иммуноглобулина—85%. Длительность максимального защитного действия пассивной иммунизации, даже при использовании оптимальных доз нормального иммуноглобулина, составляет 3-5 месяцев. При повторном введении наблюдается снижение профилактического эффекта, возможны аллергические реакции. На современном этапе, иммуноглобулинопрофилактику используют исключительно по эпидпоказаниям при условии введения препарата не позже 10-14 дней после контакта, позволяющего предположить заражение ГА. При применении препарата в более поздние сроки эффективность резко снижается. Использование иммуноглобулина можно сочетать с вакцинацией, например, для защиты лиц, экстренно выезжающих в гиперэндемичные регионы.

Имуноферментные тест-системы для диагностики гепатита А

Все зарегистрированные в России тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита А (HAV) основаны на использовании цельновирионного антигена, полученного путем культивирования вируса на различных клеточных линиях с последующей инактивацией. Как уже упоминалось, в таком антигене в основном представлены конформационно-зависимые детерминанты, обусловленные четвертичной структурой вирусного капсида и входящие в состав так называемого "нейтрализующего сайта". Однако, анти-HAV-IgM, направленные к капсиду вируса, могут циркулировать на протяжении 6-12 месяцев, что создает ряд трудностей в интерпретации результатов лабораторных исследований и выборе лечебной тактики. Кроме того, при вакцинации против гепатита А с использованием вакцины, представляющей собой инактивированный штамм вируса, у части лиц (20-30%) в первые месяцы могут быть выявлены анти-HAV-IgM. Их образование связано с первичным иммунным ответом на введение вакцинного антигена, а не с HAV-инфекцией (Stepleton J., 1995, Михайлов М.И., 2002).

В НПО "Диагностические системы" разработаны 2 иммуноферментные тест-системы для определения антител классов М и G к вирусу гепатита А: "ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ" и "ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ". Обе тест-системы сконструированы на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа. На твердой фазе иммобилизованы рекомбинантные антигены, воспроизводящие иммунодоминантные фрагменты структурных и неструктурных белков, кодируемых VP4-VP2-, VP3-, VP1-P2A-P2B-,

P3C-областями генома вируса гепатита А. В качестве конъюгата использованы моноклональные антитела к IgM и IgG человека. Исследуемые образцы разводятся в 10 раз. Эту процедуру можно производить непосредственно в лунках планшета, что делает тест-систему очень удобной в практическом применении (отмечено многими потребителями во время проведения клинических испытаний).

Проведение анализа осуществляется по следующей схеме:

На первом этапе осуществляется инкубация исследуемых контрольных образцов сыворотки крови в лунках планшета с иммобилизованными HAV-антигенами. При наличии в образцах сыворотки крови антител классов М или G к вирусу гепатита А образуются комплексы "антиген-антитело". Не связавшиеся иммуноглобулины удаляются промыванием солевым раствором.

На втором этапе в лунки планшета вносится раствор конъюгата и к имеющимся комплексам "антиген-антитело" присоединяются меченные ферментом антитела, специфичные к IgM или IgG человека. Избыток конъюгата удаляется промыванием.

На третьем этапе в лунки планшета вносится раствор субстрата (буферный раствор, содержащий перекись водорода и хромоген: тетраметилбензидин—ТМБ). Происходит взаимодействие фермента с субстратом, в результате чего развивается цветная реакция, интенсивность которой зависит от количества сывороточных антител. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Результат оценивается спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Рекомендуется проводить учет результатов при двух длинах волн: 450 нм и 630 нм.

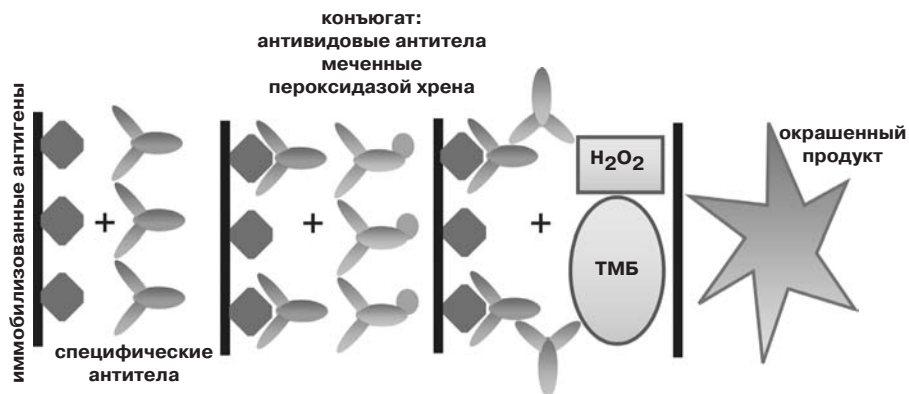


Рис. 6. Схема непрямого варианта иммуноферментного анализа.

Перспективность использования рекомбинантных антигенов в диагностике гепатита А определяется следующим:

- высокая чувствительность и специфичность при выявлении анти-HAV в образцах сыворотки крови больных острым гепатитом А;
- возможность разграничения больных в остром периоде инфекции и реконвалесцентов гепатита А;
- возможность дифференциации естественной инфекции гепатита А от поствакцинального иммунитета;
- в отличие от культурального антигена, рекомбинантные полипептиды неинфекционны, что обеспечивает эпидемиологическую безопасность тест-системы;
- возможность стандартизации физико-химических и биологических свойств рекомбинантных белков, что обеспечивает повышение качества тест-системы;
- по сравнению с культуральным антигеном, себестоимость производства рекомбинантных белков и синтетических пептидов ниже в несколько раз, что дает возможность снижения стоимости анализа.

Тест-система "ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ" предназначена для определения антител класса М к вирусу гепатита А в образцах сыворотки/плазмы крови человека с целью специфической диагностики этой инфекции.

Лабораторные испытания тест-системы проведены с использованием образцов сыворотки крови от больных гепатитом А (желтушная и безжелтушная формы), от реконвалесцентов гепатита А, от больных вирусными гепатитами другой этиологии, от здоровых доноров. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, чувствительность тест-системы "ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ" при исследовании образцов сыворотки крови от больных острым гепатитом А (желтушная и безжелтушная формы) составила 100,0%. Среди реконвалесцентов гепатита А было выявлено 30,0% образцов. Специфичность тест-системы составила 99,1%. У 1 больного гепатитом С и 2 больных гепатитом В, сыворотки которых были положительны по результатам тестирования в "ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕ-

Таблица 1.

Результаты исследования сывороток больных вирусными гепатитами с использованием тест-системы "ИФА-АНТИ-НАV-М-РЕКОМБ"

Группы обследованных	Количество исследованных образцов	Количество положительных образцов	
		Абсолютное количество	%
1	2	3	4
Больные гепатитом А (желтушная форма)	124	124	100
Больные гепатитом А	46	46	100
Реконвалесценты гепатита А (4-6 месяцев)	54	18	30,0
Больные гепатитом С	153	1	0,7
Больные гепатитом В	176	2	1,1
Здоровые доноры	421	0	0

КОМБ", диагноз гепатита А подтверждён не был.

На рисунке 7 представлена шестимесячная динамика выявления анти-НАV-IgM с помощью цельновирионного (культурального) и рекомбинантных антигенов в образцах сыворотки крови от больных из очага гепатита А (n=15). Кроме того, в этих же сыворотках проводилось определение анти-НАV-IgG (с помощью рекомбинантных антигенов). Частота определения анти-НАV-IgM с помощью культурального антигена достигала максимума (100%) на 2 месяце болезни и далее постепенно снижалась до 36% на 6 месяце. Это соответствует классической динамике данного маркера (Михайлов М.И., 2002). Частота определения анти-НАV-IgM с помощью рекомбинант-

ных белков на 2 месяце также составляла 100%, а далее резко снижалась, составляя на 4 месяце 33%, а на 6 месяце 3,3%. Антитела класса G были выявлены в 25% случаев уже в первый месяц болезни. Ко второму месяцу частота их обнаружения достигала 100,0% и далее не изменялась на протяжении всего периода наблюдения.

На рисунке 8 показана динамика изменения уровней анти-НАV, определяемых с помощью культурального и рекомбинантных антигенов, на протяжении 7 месяцев у конкретного больного гепатитом А (желтушная форма). Определение антител класса М в обоих случаях начинается одновременно на 2 неделе заболевания. Максимальные значения регистрируются через

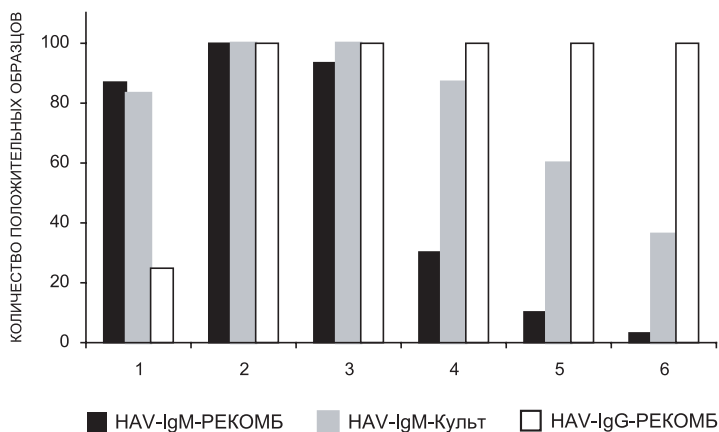


Рис. 7 Динамика выявляемости анти-HAV у больных гепатитом А

1,5-2 месяца. Далее наблюдается резкое падение уровня антител, выявляемых рекомбинантными белками, такое, что уже через 4 месяца они практически не определялись. С помощью культурального антигена антитела класса М были выявлены и на 7 месяце после инфицирования.

Полученные нами результаты свидетельствуют, что динамика продукции антител класса М к вирусному капсиду и отдельно к структурным и неструктурным белкам HAV значительно отличается. Это соответствует литературным данным о том, что антитела к неструктурным протеинам вируса являются относительно короткоживущими и в большинстве случаев элиминируются через 3-4 месяца (Khudyaev et al., 1999). В образцах сыворотки крови реконвалесцентов представлены в основном антитела класса М к вирусному капсиду. Рекомбинантные белки, используемые в тест-системе "ИФА-АНТИ-HAV-М-РЕКОМБ", воспроизводят другие антигенные сайты белков вируса гепатита А. Именно это и является причиной наблюдаемых

различий в динамике определения антител класса М с помощью культуральных и рекомбинантных антигенов.

В таблице 2 представлены результаты сравнения тест-системы "ИФА-АНТИ-HAV-М-РЕКОМБ" с аналогичными наборами других производителей: "HAV-AB-M-EIA" (фирма "Abbot") и "Векто-геп-А-IgM-стрип" ("Вектор-Бест"). При тестировании образцов сыворотки крови здоровых доноров все 3 сравниваемых тест-системы продемонстрировали 100% специфичность (ни одного положительного результата среди 67 образцов). В группе больных гепатитом А чувствительность тест-систем "ИФА-АНТИ-HAV-М-РЕКОМБ" и "HAV-AB-M-EIA" составила 100%, а тест-системы "Вектогеп-А-IgM-стрип"—98,6% (в 1 образце зарегистрирован отрицательный результат).

Таким образом, проведенные лабораторные испытания свидетельствуют, что тест-система "ИФА-АНТИ-HAV-М-РЕКОМБ" обладает высокой специфичностью и чувствительностью, не уступающей имеющимся ана-

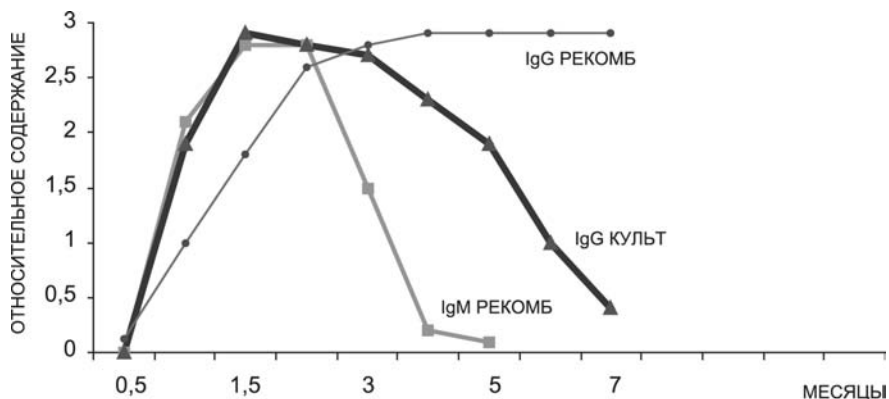


Рис. 8 Динамика изменения относительного содержания анти-HAV, выявляемых с помощью рекомбинантных белков и культурального антигена

логам. Тест-система позволяет эффективно определять антитела класса М в образцах сыворотки крови именно в острый период инфекции. Положительный результат определения анти-HAV-IgM на стадии реконвалесценции уже не влечет за собой каких-либо клинических мероприятий и может быть интересен только для эпидемиологических исследований. Разработанная нами тест-система позволяет дифференцировать истинных потенциально опасных больных гепатитом А от эпидемиологически безопасных

реконвалесцентом.

Тест-система "ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ" предназначена для обнаружения и оценки уровня антител класса G к вирусу гепатита А в сыворотке/плазме крови человека и препаратах крови с целью диагностики и профилактики этой инфекции.

Для оценки чувствительности тест-системы "ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ" использовали стандартный образец, аттестованный в ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Для сравнения использовали тест-систему "Вектогеп

Таблица 2

Результаты сравнения тест-системы "ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ" с лучшими отечественными и импортными аналогами

Группа обследованных	N	Количество положительных в сравниваемых тест-системах		
		"ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ" ("Диагностические системы")	"HAV-AB-M-EIA" ("Abbott")	"Вектогеп-А-IgM-стрип" ("Вектор-Бест")
Больные гепатитом А	71	71	71	70
Здоровые доноры	67	67	67	67

Сравнительная оценка чувствительности тест-систем "ИФА-АНТИ-НАV-G-РЕКОМБ" и "Вектоген А-IgG-стрип" относительно стандартного образца

Количество анти-НАV-IgG в стандартном образце (МЕ\мл)	Показатель оптической плотности	
	"ИФА-АНТИ-НАV-G-РЕКОМБ"	"Вектоген А-IgG-стрип"
50	1,002 (положит.)	1,401 (положит.)
25	0,504 (положит.)	0,748 (положит.)
12,5	0,257 (положит.)	0,402 (положит.)
6,0	0,189 (отрицат.)	0,263 (отрицат.)
3,0	0,104 (отрицат.)	0,147 (отрицат.)

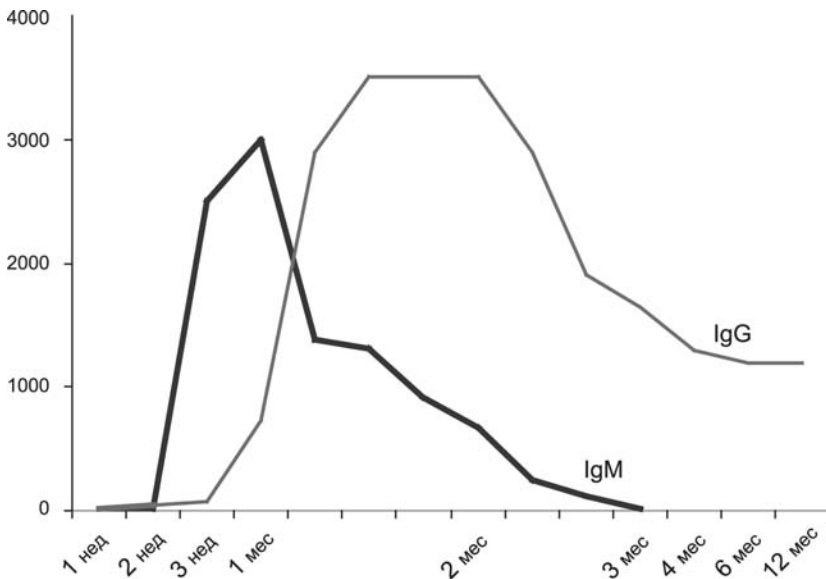


Рис.9. Динамика продукции антител классов М и G к НАV у экспериментально инфицированного шимпанзе.

А-IgG-стрип" ("Вектор-Бест"). Как видно из данных, представленных в таблице 3, обе сравниваемые тест-системы позволяли выявлять анти-HAV в концентрации 12,5 МЕ/мл. Выше уже упоминалось, что защитный уровень антител к HAV составляет 20 МЕ/мл. Следовательно, чувствительность обоих диагностикумов достаточна для детекции антител к вирусу гепатита А в самых низких концентрациях, обеспечивающих протективный эффект.

Тест-системы "ИФА-АНТИ-HAV-G-РЕКОМБ" и "ИФА-АНТИ-HAV-M-РЕКОМБ" были апробированы на образцах сыворотки крови экспериментально зараженного вирусом гепатита А шимпанзе. На рис.9 представлена динамика продукции специфических антител класса IgG и IgM к вирусу. Забор образцов сыворотки крови производился в течение года с интервалом в 1-2 недели.

Антитела класса М к HAV были выявлены спустя 3 недели после заражения шимпанзе. Пик антителопродукции пришелся на 4-5 неделю. Далее было зарегистрировано резкое снижение уровня анти-HAV-IgM до нулевых значений к концу 3 месяца наблюдений. Антитела класса G к HAV впервые были выявлены через месяц после инфицирования шимпанзе. Через 1,5 месяца их концентрация достигала максимума и сохранялась на этом уровне еще месяц. В течение еще 3 месяцев наблюдалось снижение уровня антител. К шестому месяцу концентрация анти-HAV-IgG стабилизировалась и уже не менялась на протяжении оставшегося срока наблюдения.

Таким образом, результаты определения антител классов М и G у инфицированного шимпанзе практически совпадают с подобными данными полученными для больного из очага гепатита А.

Список литературы

1. Балаян М.С., Михайлов М.И. Энциклопедический словарь. Вирусные гепатиты\М.-1999.
2. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита\М.-1999.
3. Михайлов М.И. Современное состояние проблемы гепатита А\Мир вирусных гепатитов.-М.-2002.-№11.
4. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты, 2-е издание\С.-Пб.-1997.
5. Feinstone S.M., Kapikian A.Z., Purcell R.H. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness \ Science.-1973.-№182.-P.1026-1028.
6. Stepleton J.T. Host immune response to hepatitis A virus\J.Infect.Dis.\\1995.-v.171.-suppl.1.-S.9-14.
7. Gomara M.J., Riedemann S., Vega I., Ibarra H., Ercilla G., Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection\J.Immunol.Methods.-2000.-v.234.-№1-2.-P.23-34.
8. Yokosuka O. Molecular biology of hepatitis A virus: significance of various substitutions in the hepatitis A virus genome\J. of Gastroenterology and Hepatology.-2000.- v.15.-P.91-97.
9. Van Hattum J., Chen X.Q. Hepatitis A: infection, detection, vaccination and immunity\The Netherlands Journal of medicine.-1999.-v.55.-№3.-P142-50.
10. Khudyakov Y., Lopareva E., Jue D.L. et. al. Antigenic epitopes of the hepatitis A virus polyprotein\Virology.-1999.-v.260.-P.260-272.



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