

УДК 616.36-002.1

Острый гепатит неуточненной этиологии

Е.В. Цыганова¹, О.О. Знойко¹, Н.Д. Ющук¹, К.Р. Дудина¹, М.Г. Исагулянц²,
Н.В. Петракова², Т.В. Петрова³, М.И. Михайлов⁴

¹Московский государственный медико-стоматологический университет, кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии;

²ГУ Институт вирусологии им Д.И. Ивановского РАМН, Москва;

³НПО «ДНК-Технология», Москва;

⁴Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Московская обл.)

Acute hepatitis of non-specified etiology

Ye.V. Tsyganova, O.O. Znoyko, N.D. Yushchuk, K.R. Dudina, M.G. Isagulyants,
N.V. Petrakova, T.V. Petrova, M.I. Mikhaylov

Цель исследования. Оценить патогенетическое и диагностическое значение обнаружения компонентов гепатотропных вирусов (ДНК, РНК, антигенов) и противовирусного иммунного ответа при остром гепатите неуточненной этиологии методами иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и Т-клеточной пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV.

Материал и методы. В исследование были включены больные острым гепатитом неуточненной этиологии – ОГНЭ ($n=42$), пациенты с острым гепатитом С ($n=33$) и острым гепатитом В ($n=36$), которые составляли группы сравнения, а также контрольная группа здоровых лиц ($n=15$). Обследование паци-

Aim of investigation. To estimate pathogenic and diagnostic value of detection of hepatotropic viruses components (DNA, RNA, antigens) and antiviral immune response at acute hepatitis of non-specified etiology by the methods of *enzyme-linked immunoassay* (EIA), *polymerase chain reaction* (PCR) and T-cellular lymphocytes proliferation in response to HCV antigens stimulation.

Methods. Overall 42 patients with *acute hepatitis of not specified etiology* (AHNSE) were included in original study. Thirty three patients with acute hepatitis C and 36 patients with acute hepatitis B made groups of comparison, control group included 15 healthy persons. Investigation of patients with acute hepatitis of non-specified etiology included clinical, epidemiologic,

Цыганова Елена Валерьевна – старший лаборант кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (МГМСУ). Контактная информация для переписки: TsyganovaElena@yandex.ru

Знойко Ольга Олеговна – доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГОУ ВПО МГМСУ

Ющук Николай Дмитриевич – академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГОУ ВПО МГМСУ

Дудина Кристина Романовна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГОУ ВПО МГМСУ

Исагулянц Мария Георгиевна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник группы химии вирусных нуклеиновых кислот и белков ГУ «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН». Контактная информация для переписки: Москва, ул. Гамалеи, 16

Петракова Наталия Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы химии вирусных нуклеиновых кислот и белков ГУ «Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН». Контактная информация для переписки: Москва, ул. Гамалеи, 16

Петрова Татьяна Викторовна – кандидат биологических наук, заведующая отделом ПЦР-исследований многопрофильной диагностической лаборатории, Государственный научный центр «Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства России». Контактная информация для переписки: Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

Михайлов Михаил Иванович – доктор медицинских наук, профессор, директор Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН (ИПВЭ). Контактная информация для переписки: 142782, Московская область, Ленинский район, 27 км. Киевского шоссе, ИПВЭ

ентов с острым гепатитом неуточненной этиологии включало клинико-эпидемиологический, стандартный лабораторный, серологический методы; молекулярно-биологический метод (РНК вирусов гепатитов A, C, E, G; ДНК вирусов гепатита B, TTV, CMV, EBV, HHV 1, 2, 6 и 8-го типов, PV B-19, NV-f – качественный анализ); метод иммунофлюоресценции (определение антимитохондриальных и антинуклеарных антител); иммунологические методы (лабораторные диагностические) – раздельное определение в сыворотке крови методом ИФА специфических антител на спектр индивидуальных антигенов HCV, включающих структурные и неструктурные белки и пептиды из их состава, представляющие весь полипротеин HCV (всего 38 антигенов – 34 антигена HCV и 4 контрольных антигена); исследование Т-клеточного иммунного ответа на антигены HCV методом бласттрансформации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV с количественной оценкой секреции цитокинов; инструментальный метод – ультразвуковое исследование органов брюшной полости.

Выводы. В результате исследования в структуре больных острым гепатитом, не выезжавших в эндемичные регионы, выявлен вирусный гепатит E – в 4,8% случаев с использованием ИФА, в том числе в 2,4% одновременно методами ИФА и ПЦР. Можно предполагать, что доля острой HCV-инфекции с атипичным серологическим профилем (по данным коммерческих тест-систем) составляет у больных ОГНЭ 17%, а при условии введения мультипараметрического диагностического критерия, включающего 6 параметров, – 43,5%.

Ключевые слова: острый гепатит неуточненной этиологии, вирусный гепатит, иммунный ответ, цитокины.

routine laboratory, serological methods; molecular biological method (RNA of hepatitis A, C, E, G viruses; DNA of hepatitis B virus, TTV, CMV, EBV, HHV of 1, 2, 6 and 8 types, PV B-19, NV-f – qualitative analysis); method of immunofluorescence (assessment of antimitochondrial and antinuclear antibodies); immunologic methods (laboratory diagnostic methods) – independent assessment of specific antibodies for individual HCV antigens spectrum, including structural and unstructural proteins and compound peptides, representing the whole HCV polyprotein (overall 38 antigens: 34 HCV antigens and 4 control antigens) in blood serum by EIA method; investigation of T-cellular immune response to HCV antigens by blast-cell lymphocytes transformation method under stimulation by HCV antigens with quantitative evaluation of cytokine secretion; instrumental method – ultrasound investigation of abdominal organs.

Conclusions. As a result of the study within the group of patients with acute hepatitis, that never visited precinctive regions, viral hepatitis E was revealed by EIA in 4,8% of cases, including 2,4% when it was detected both by EIA and PCR. It is possible to assume, that the portion of acute HCV-infection with atypical serological profile (according to commercial tests-systems data) reaches 17% of AHNSE patients, and at application of multiparametric diagnostic criterion, including 6 parameters, – 43,5%.

Key words: acute hepatitis of non-specified etiology, viral hepatitis, immune response, cytokines.

Вирусные гепатиты традиционно являются одной из наиболее острых проблем здравоохранения. В качестве этиологических факторов вирусных гепатитов рассматриваются как минимум 8 агентов (HAV, HBV, HDV, HCV, HEV, HGV, TTV и SENV, NV-f), 6 из которых передаются парентеральным путем. Однако до настоящего времени роль отдельных вирусов (HGV, TTV и SENV, NV-f) и их сочетаний в развитии поражения печени не вполне ясна и требует дальнейшего уточнения.

Особое место в практике клиницистов занимают *острые гепатиты неуточненной этиологии* (ОГНЭ). Известно, что в Российской Федерации их удельный вес последовательно увеличивается – с 1–2,2% в 1993–1997 гг. до 4,1–4,2% в 2004–2005 гг. и 5,7–6,7% в 2006–2008 гг. [2]. Некоторая доля больных (15–20%), перенесших явно посттрансфузионный гепатит, остается серонегативной в отношении всех маркёров известных вирусных гепатитов человека [1], и даже при использовании самых современных методов диагностики в ряде случаев невозможно установить этиологию гепатита.

С точки зрения интересов как фундаментальной медицины, так и практического здравоохранения углубленное обследование больных ОГНЭ крайне актуально в аспекте детального изучения иммунного ответа на антигены вирусов – кандидатов в этиологические агенты гепатитов, а также в плане клинического значения выявления генетического материала данных возбудителей в крови больных. Результаты подобных исследований, возможно, приведут к внедрению в практику новых подходов при обследовании больных.

В исследованиях последнего десятилетия, посвященных изучению HCV-инфекции, многими авторами демонстрируется, что при наличии РНК HCV в крови нередко отсутствуют антитела к HCV [3, 5, 7]. В ряде работ убедительно показано, что в остром периоде заболевания предиктором реконвалесценции от гепатита С является мощный Т-клеточный ответ на антигены HCV [4, 10–12], который может регистрироваться при отсутствии в крови больных как серологических маркёров HCV, так и РНК HCV [6, 8].

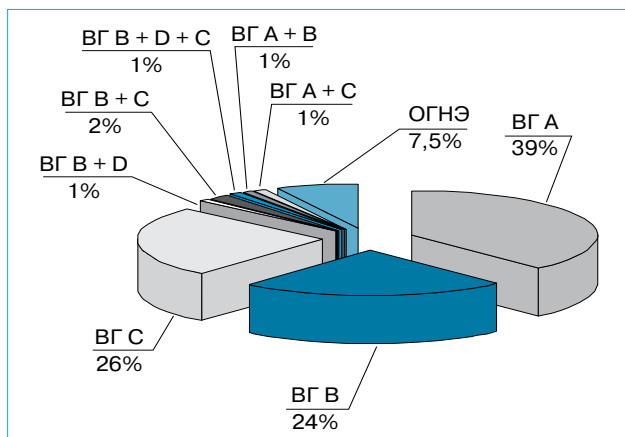


Рис. 1. Этиологическая структура острых гепатитов по данным ИКБ № 1 в 2005–2006 гг. ($n = 1392$)

В настоящее время регистрируемый специфическими методами Т-клеточный ответ на антигены HCV в отсутствии антител к вирусу гепатита С рассматривается, с одной стороны, в качестве доказательства предшествующей встречи с HCV, а с другой, в качестве мощного защитного фактора, предотвращающего возможность повторного инфицирования человека. Это продемонстрировано, в частности, на лицах, длительно употребляющих внутривенно психоактивные вещества при отсутствии у них анти-HCV и РНК HCV в крови, но наличии Т-клеточного ответа [5], а также на группе работников клинической лаборатории, контактирующих с кровью больных, у которых в отсутствии РНК HCV и анти-HCV регистрируется Т-клеточный ответ, причем более мощный, чем у больных хроническим гепатитом С [9].

Изучение Т-клеточного ответа на стимуляцию антигенами HCV лимфоцитов крови у больных ОГНЭ ранее не проводилось и в настоящем исследовании это сделано впервые. Кроме того, HCV-инфекция с атипичным серологическим профилем впервые рассматривается в качестве этиологического фактора ОГНЭ.

Цель работы — оценить патогенетическое и диагностическое значение обнаружения компонентов гепатотропных вирусов (ДНК, РНК, антигенов) и противовирусного иммунного ответа при остром гепатите неуточненной этиологии методами иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и Т-клеточной пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV.

Материал и методы исследования

В течение 2005–2006 гг. в Инфекционной клинической больнице № 1 г. Москвы были обследованы 1392 больных острым гепатитом. Этиологическая структура острых гепатитов представлена на рис. 1.

В исследование были включены: больные острым гепатитом неуточненной этиологии ($n=42$), пациенты с острым гепатитом С ($n=33$) и острым гепатитом В ($n=36$), а также здоровые лица, составившие группу контроля ($n=15$). Группа больных ОГНЭ была сформирована с учетом критериев включения и исключения. Критерии включения: клиническая картина желтушной формы острого гепатита, более чем 10-кратное повышение активности АлАТ, отсутствие маркеров острых вирусных гепатитов А, В, С при первичном обследовании, возможность динамического наблюдения за пациентом в течение не менее 6 мес, письменное информированное согласие больного на участие в исследовании. Критерии исключения: тяжелые соматические и психические заболевания, в том числе онкологическая и аутоиммунная патология по данным анамнеза, признаки острой и хронической алкогольной интоксикации, наркозависимость, химиотерапия и системная гормональная терапия в течение 6 мес перед заболеванием, наличие ВИЧ-инфекции и сифилиса. В группу контроля вошли здоровые лица с отсутствием маркеров вирусных гепатитов А, В, С по данным коммерческих тест-систем.

Обследование пациентов с острым гепатитом неуточненной этиологии осуществлялось по следующей схеме: в первые 10 дней желтушного периода, через 1, 3, 6 и 12 мес после выписки из стационара. В каждом образце крови определяли биохимические показатели, HBsAg и анти-HCV методом ИФА. Трижды (в первые 10 дней желтушного периода и через 3 или 6 мес) проводилось исследование на наличие нуклеиновых кислот гепатотропных вирусов методом ПЦР, определение антител к некоторым гепатотропным вирусам методом ИФА. В качестве основных применялись: метод клинко-эпидемиологического обследования пациентов (сбор анамнеза, оценка состояния и жалоб, физикальный осмотр); стандартный лабораторный метод (общеклинический и биохимический анализы крови); серологический метод (определение маркеров вирусных гепатитов А, В, С, D, E, антител к EBV, PV B-19, вирусу клещевого энцефалита, вирусу лихорадки Западного Нила, вирусу лихорадки Денге, вирусу Крым-Конго геморрагической лихорадки методом ИФА); молекулярно-биологический метод (РНК вирусов гепатитов А, С, E, G; ДНК вирусов гепатита В, TTV, CMV, EBV, HHV 1, 2, 6 и 8-го типов, PV B-19, NV-f — качественный анализ); метод иммунофлюоресценции (определение анти-митохондриальных и антинуклеарных антител); иммунологические (лабораторные диагностические) методы — раздельное определение в сыворотке крови методом ИФА специфических антител на спектр индивидуальных антигенов HCV, включающий структурные и неструктурные белки и пептиды из их состава, представляющие весь

Таблица 1

Лабораторные показатели
больных острым гепатитом неуточненной этиологии в остром периоде ($n=42$)

Показатель	Диапазон колебаний	Среднее значение
АЛАТ, мкмоль/(мин·л)	603–5242	1809±76
АсАТ, мкмоль/(мин·л)	97–4193	1369±94
Общий билирубин, мкмоль/л	64–408	152±27
ЩФ, мкмоль/(мин·л)	149–528	204±28
γ-ГТП, мкмоль/(мин·л)	119–801	322±36
Протромбиновый индекс	96–109	99±7
Общий белок	67–86	76±12
Количество эритроцитов, $\times 10^6/\text{мм}^3$	3,96–5,02	5,0±0,1
Количество лейкоцитов, $\times 10^3/\text{мм}^3$	5,6–12,3	6,75±0,5
Количество тромбоцитов, $\times 10^3/\text{мм}^3$	192–341	198,9±14,9
Гемоглобин, г/л	121–176	124,7±9,3

полипротеин HCV (всего 38 антигенов – 34 антигена HCV и 4 контрольных антигена)*; исследование Т-клеточного иммунного ответа на антигены HCV методом бласттрансформации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV** с количественной оценкой секреции цитокинов; инструментальный метод – ультразвуковое исследование органов брюшной полости.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе пациентов с острым гепатитом неуточненной этиологии ($n=42$) соотношение мужчины/женщины было 15/27. Преобладали лица в возрасте 40–59 лет – 19 человек (45,2%), в возрасте 15–40 лет было 12 (28,6%) и в возрастной группе 60 лет и старше – 11 (26,5%).

Больные ОГНЭ поступали в стационар от 3-го до 18-го дня болезни (в среднем на $7,4\pm 0,3$ день),

от 1-го до 9-го дня желтухи (в среднем на $2,8\pm 0,2$ день). У 29 (69%) пациентов продолжительность преджелтушного периода составила $4,5\pm 0,4$ дня (от 1 до 14 дней), у 13 (31%) он отсутствовал. Длительность желтушного периода составила $13,8\pm 0,7$ дня. В продромальном периоде преобладали диспептический и интоксикационный синдромы. В желтушном периоде интенсивность симптомов уменьшалась.

Из анамнеза больных известно, что у 74% из них ($n=31$) проводились парентеральные вмешательства в течение 6 мес до возникновения первых симптомов заболевания. Все пациенты отрицали употребление алкоголя в количестве более 30 г в сутки (в пересчете на этанол) и психоактивных веществ. На прием различных лекарственных препаратов и биологически активных добавок (БАД) на протяжении 6 мес до развития симптомов заболевания указывали 28,6% больных ($n=12$). Препараты с возможным гепатотоксичным действием (антимикробные, противопроtoзойные и нестероидные противовоспалительные средства – НПВС) применяли 3 пациента в течение не более 2 дней в продромальном периоде. Среди применяемых антимикробных и противопроtoзойных препаратов были названы ципрофлоксацин и метронидазол, а среди НПВС – парацетамол. В группу биологически активных добавок входили: капилар (дигидрокверцетин) и флоравит (БАД, содержащая фосфолипиды, антиоксиданты, эссенциальные полиеновые кислоты, ферменты, полисахариды, микроэлементы, витамины), а также концентрированный настой чистотела.

Средний койко-день составил $15\pm 4,3$ дня (от 6 до 22). Средние показатели активности АсАТ и АЛАТ в крови у больных ОГНЭ в остром периоде составили 1369 ± 94 (97–4193) и 1809 ± 76 (603–5242) мкмоль/(мин·л) соответственно, средние

* Белки нуклеокапсида/core HCV, оболочки E1 и E2, неструктурные белки NS3, NS4, NS5A и NS5B. Пептиды представляли участки полипротеина HCV (в аминокислотных остатках – ак): 774–796 и 802–821 HCV 1a и 1b генотипов; 1–20, 13–33, 34–56, 63–80, 67–81, 76–90, 106–126, 129–145, 140–160, 155–177 белка нуклеокапсида/core; 1030–1058¹, 1073–1097², 1098–1132³, 1157–1178⁴, 1184–1218⁵, 1227–1252⁶, 1241–1280⁷, 1287–1313⁸, 1304–1330⁹, 1349–1379¹⁰, 1382–1415¹¹, 1438–1471¹², 1473–1497¹³, 1482–1510¹⁴, 1515–1546⁵, 1544–1579¹⁶, 1584–1619¹⁷, 1632–1657¹⁸ белка NS3 HCV генотипа 1b и консенсусные пептиды HVR-N и HVR-C, представляющие гипервариабельную петлю 1 белка оболочки E2).

** Для стимуляции лимфоцитов использовали смеси пептидов (пулы): core HCV пул № 1, представляющий пептиды, перекрывающие участок ак 1–56; № 2 – ак 63–126, № 3 – ак 129–177; NS3 пул № 1, представляющий пептиды, перекрывающие участок ак 1030–1132, № 2 – ак 1157–1218, № 3 – 1227–1313, № 4 – 1304–1415, № 5 – 1438–1510, № 6 – 1515–1579 и № 7 – 1584–1657, а также индивидуальные белковые антигены: core HCV, NS3, NS4, NS5A и NS5B.

значения показателей γ -ГТП и ЩФ — 204 ± 28 ($149-528$) и 322 ± 36 ($119-801$) мкмоль/(мин·л), билирубина — 152 ± 27 ($64-408$) мкмоль/л. Параметры клинического анализа крови были в пределах нормы (табл. 1).

В желтушном периоде у 4 из 42 пациентов выявлена РНК HCV (9,5%), у 1 (2,4%) — РНК HAV, при повторном обследовании этих пациентов на маркёры вирусных гепатитов методом ИФА в стационаре у 4 были обнаружены анти-HCV и у 1 — анти-HAV IgM.

У 1 (2,4%) больного в сыворотке крови определялась РНК HGV, у 1 (2,4%) — ДНК HHV-6-го типа, сочетание РНК HEV и ДНК EBV выявлено у 1 (2,4%) пациентки, РНК HGV и ДНК EBV — у 1 (2,4%) больного. У 2 (4,8%) обследованных найдена ДНК PV B19. Генетического материала HDV, HHV-1, 2 и 8-го типов, CMV, TTV, NV-f не обнаружено ни у одного пациента. Таким образом, генетический материал ряда гепатотропных вирусов выявлен у 33,5% больных ОГНЭ.

При обследовании в первые 10 дней желтушного периода у больных отсутствовали маркёры гепатитов А, В, С (анти-HAV IgM, HBsAg, анти-HBcore IgM и G, анти-HCV). При повторном обследовании на маркёры вирусных гепатитов к 12-му дню пребывания в стационаре у 1 пациента найдены анти-HAV IgM (2,4%), к 14-му дню у 4 (9,5%) человек выявлены анти-HCV. Ретроспективно в замороженных образцах сывороток крови больных ОГНЭ в 3 (7,1%) случаях были обнаружены антитела (IgM) к вирусу гепатита Е (HEV).

Итак, на основании результатов иммунологического исследования и прямой детекции нуклеиновых кислот гепатотропных вирусов у 8 (19%) пациентов во время их пребывания в стационаре диагноз был верифицирован как вирусный гепатит А, С или Е и в группе больных ОГНЭ осталось 34 человека (8 мужчин и 26 женщин), среди которых преобладали пациенты среднего возраста (40–69 лет) — 67,7%. У 24 (70,6%) из них в анамнезе были парентеральные вмешательства в течение 6 мес до возникновения первых симптомов заболевания. За пределы Москвы в течение 3 мес до начала болезни выезжали 4 (11,8%) пациента: 3 (8,8%) — в Московскую область, 1 (2,9%) — в Дагестан.

На прием различных лекарственных препаратов и БАД на протяжении 6 мес до развития симптомов заболевания указывали 10 (29,4%) человек.

Больные поступали в стационар в период от 4-го до 18-го дня болезни, в среднем на $7,6 \pm 0,3$ день, от 1-го до 8-го дня желтухи ($2,7 \pm 0,2$). Средняя продолжительность желтушного периода составила $12,9 \pm 0,7$ дня. Показатели активности АсАТ и АлАТ в крови у больных ОГНЭ в остром

периоде равнялись в среднем 1294 ± 84 ($116-4293$) и 1987 ± 76 ($638-5748$) мкмоль/(мин·л) соответственно, γ -ГТП и ЩФ — 218 ± 67 ($118-511$) и 348 ± 41 ($175-801$) мкмоль/(мин·л), билирубина — 163 ± 29 мкмоль/л ($78-396$). Показатели клинического анализа крови и мочи, уровень общего белка, альбумина и белковых фракций, протромбинового индекса и тимоловой пробы в биохимическом анализе крови у больных ОГНЭ были в пределах нормы.

Аутоиммунную природу гепатита исключили у 100% больных по результатам обследования на наличие аутоиммунных антител в крови — ни у одного из 34 пациентов АМА и АНА не были выявлены в диагностическом титре.

Средний койко-день у больных составил $14 \pm 5,3$ дня (от 6 до 22). При динамическом наблюдении через 1 мес от начала желтушного периода у всех пациентов в крови значительно уменьшились активность трансаминаз — АлАТ до 187 ± 32 мкмоль/(мин·л), АсАТ до 106 ± 12 мкмоль/(мин·л) и содержание билирубина до 24 ± 8 мкмоль/л. При обследовании через 1, 3 и 6 мес ни у одного больного ОГНЭ не выявлены HBsAg, анти-HCV в крови, биохимические показатели к 6-му месяцу наблюдения были в пределах нормальных значений.

В остром периоде заболевания и при динамическом наблюдении было проведено определение антител к EBV, PV B-19 методом ИФА. У пациентов с наличием ДНК EBV в сыворотке крови иммуноглобулины к EBV классов А, М и G отсутствовали. В то же время в остром периоде анти-EBV IgM были выявлены у 2 пациентов при наличии в крови РНК HGV и ДНК HHV-6. У пациентки с наличием РНК HEV и ДНК EBV найдены анти-EBV IgG и анти-HEV IgM и G, что дало возможность диагностировать острый гепатит Е, но не позволило установить реактивацию EBV-инфекции. У больных с наличием ДНК PV B-19 в крови иммуноглобулины к парвовирусу B-19 классов М и G не выявлены в остром периоде, что не укладывается в типичную клинко-лабораторную картину острой парвовирусной инфекции.

Таким образом, этиологическая роль EBV, HHV-6, PV B-19 и NV-f в структуре острых гепатитов неуточненной этиологии не подтверждена в большинстве наблюдений, а РНК HGV выявлена только в 9% случаев.

Результаты обследования больных ОГНЭ на наличие иммунологических маркёров HCV-инфекции. В группах больных ОГНЭ ($n=23/34$), ОГС ($n=10$) и контрольной группе ($n=15$) было проведено определение специфических антител на широкий спектр антигенов HCV. Согласно полученным данным, в контрольной группе не выявлены антитела ни на один из указанных антигенов HCV (титр антител <200). Результат

считался положительным при наличии антител в титре >200 к пяти и более антигенам HCV и зарегистрирован у 15 из 23 больных ОГНЭ: антитела в титре >200 к HCV и пептидам из его состава, E1 и E2, HVR-N и HVR-C, p7 HCV 1a и 1b и в титре >1000 к NS3 и пептидам из его состава, NS4, NS5A и NS5B. В группе больных ОГ С в высоком титре были определены антитела к core HCV и пулам из его состава, E2, NS3 и пулам из его состава, NS4 и NS5b.

Для исключения ложнопозитивных результатов за счет присутствия в крови антител к флавивирусам, родственным HCV, было проведено исследование сывороток крови больных ОГНЭ на наличие антител классов IgM и IgG к некоторым флавивирусам (вирусу клещевого энцефалита, вирусу лихорадки Западного Нила, вирусу лихорадки Денге) методом ИФА. С целью выявления возможной неспецифической серореактивности за счет полиспецифических антител проведено определение в крови иммуноглобулинов классов M и G к вирусу, не принадлежащему к семейству *Flaviviridae* (Крым-Конго геморрагической лихорадки). Полученные результаты также были отрицательными и таким образом были исключены как перекрестные, так и неспецифические положительные реакции.

Исследование Т-клеточного иммунного ответа на антигены HCV методом бласттрансформации лимфоцитов и количественная оценка секреции цитокинов. При ОГНЭ исследование Т-клеточной пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV было проведено у 18 из 23 пациентов, при ОГ С — у 10 пациентов, в группу контроля включены 10 здоровых лиц.

Среди больных ОГНЭ уровень *индекса стимуляции* (SI) $\geq 1,7$ в ответ на воздействие тремя и более антигенами HCV был выявлен у 7 из 18 (39%), из них к 3 антигенам (пептиды из состава HCV core и NS4) — у 1 пациента, к 5 антигенам — у 2 пациентов (у одного к пептидам из состава NS3, а также к NS4, NS5A и NS5B, у другого — к пептидам из состава HCV core, NS3, NS4), к 6 антигенам — у 1 пациентки (к пептидам из состава NS3, NS5B), к 10 и более антигенам — у 3 пациентов (к пептидам, представляющим core HCV и NS3, а также NS4, NS5A и NS5B).

В группе больных ОГ С уровень SI $\geq 1,7$ был зарегистрирован в ответ на стимуляцию тремя и более антигенами HCV, которые были представлены белками core HCV, NS3 и пептидами из их состава, а также белком NS4.

У здоровых лиц уровень SI $\geq 1,7$ был выявлен в единичных случаях — у 1 обследованного к HCV core, у 2 — к NS3, что не позволяет считать указанные образцы сывороток положительными, так как нет соответствия условию позитивности (т. е. величина SI $\geq 1,7$ не регистрировалась к 3 и более индивидуальным антигенам HCV).

При сравнении результатов Т-клеточной пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV группа больных ОГНЭ достоверно отличалась от группы контроля по уровню средних значений SI в ответ на стимуляцию NS3 пул № 1 — ак 1030–1132 ($p=0,03$), NS4 ($p=0,001$), NS5B ($p=0,001$). Группа больных ОГ С также достоверно отличалась по уровню SI в ответ на стимуляцию core HCV пул № 3 — ак 129–177 ($p=0,004$), NS3 ($p=0,005$), NS4 ($p=0,03$), NS5A ($p=0,01$) от группы здоровых лиц и не отличалась от группы ОГНЭ.

Полученные результаты демонстрируют, что группы ОГНЭ и ОГ С схожи как по качественно-му, так и по количественному показателю — среднему уровню SI $\geq 1,7$, отражающему существующий Т-клеточный иммунный ответ на антигены HCV, который выявляется методом бласттрансформации лимфоцитов. В то же время обе эти группы по указанным параметрам достоверно отличаются от группы контроля.

Кроме того, у обследованных было проведено определение уровня секреции цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и перфорин) в ответ на стимуляцию антигенами HCV. Результат считался положительным при уровне секреции цитокинов $>6,5$ пкг/мл в ответ на стимуляцию тремя и более антигенами HCV.

Исследование уровней секреции ИЛ-10 и перфорина не давало возможности выявить достоверные различия в изучаемых группах. Так, низкая концентрация ИЛ-10 — менее 5 пкг/мл, что ниже уровня cut-off по рекомендациям производителя тест-системы, и чрезмерно высокий уровень концентрации перфорина — более 1000 пкг/мл не позволяли учитывать эти цитокины в качестве иммунологических маркёров в нашем исследовании.

В группе больных ОГ С ($n=10$) и ОГНЭ ($n=23$) наблюдали секрецию ИФН- γ в количестве 20 пкг/мл и более в ответ на стимуляцию антигенами HCV — core HCV, NS3 и пулы из его состава, NS4, NS5A и NS5B. У здоровых лиц ($n=10$) уровень секреции ИФН- γ был значительно ниже (менее 6,5 пкг/мл) на единичные антигены HCV.

При ОГ С наблюдалась секреция ИЛ-2 в количестве более 60 пкг/мл в ответ на стимуляцию core HCV, NS3, NS5B, у больных ОГНЭ продукция ИЛ-2 в концентрации более 60 пкг/мл регистрировалась на стимуляцию core HCV и пептидами из его состава, NS3 и пептидами из его состава, NS4, NS5A и NS5B. У здоровых лиц секреция ИЛ-2 составляла менее 10 пкг/мл в ответ на стимуляцию core HCV пул 3.

В группе больных ОГ С выявлена секреция ИЛ-4 более 10 пкг/мл в ответ на стимуляцию core HCV пулы 2, 3, NS3 пулы 3, 6, 7, NS5B, в группе ОГНЭ — более 10 пкг/мл в ответ только на стимуляцию NS3 пул 1. У здоровых лиц секреция ИЛ-4 составляла менее 10 пкг/мл.

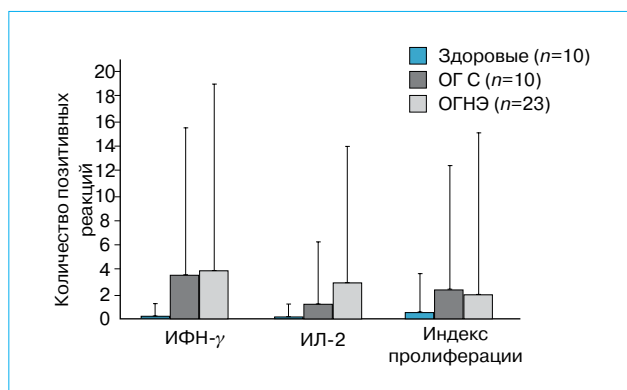


Рис. 2. Средние суммарные значения позитивных реакций при проведении Т-клеточной пролиферации и секреции цитокинов в ответ на стимуляцию антигенами HCV в группах обследованных больных ОГ С и ОГНЭ и у здоровых лиц

Таким образом, регистрировалась идентичная картина при определении среднего уровня секреции цитокина ИФН-γ в ответ на стимуляцию антигенами HCV в группах больных ОГ С и ОГНЭ. Продукция ИЛ-2 при ОГНЭ резко отличалась от таковой при ОГ С – в группе больных ОГНЭ она наблюдалась в большей концентрации в ответ на стимуляцию core HCV и пулы из его состава, NS3 и пулы из его состава, а также NS4, NS5A и NS5B, а в группе больных ОГС ИЛ-2 секретировался периферическими мононуклеарами в ответ на стимуляцию только core HCV, NS3.

Алгоритм выявления пациентов с иммунологическими маркерами HCV-инфекции с применением мультипараметрического критерия по результатам экспериментального исследования. С целью корректной оценки полученных результатов для каждого пациента групп ОГНЭ и ОГ С, а также лиц контрольной группы было введено понятие «суммарное количество позитивных реакций» при исследовании Т-клеточной

пролиферации и секреции цитокинов в ответ на стимуляцию антигенами HCV: $SI \geq 1,7$, уровень секреции цитокинов $>6,5$ пкг/мл в ответ на стимуляцию как минимум тремя индивидуальными антигенами HCV. Средние суммарные значения позитивных реакций при исследовании Т-клеточной пролиферации и секреции цитокинов в ответ на стимуляцию антигенами HCV в группах больных ОГНЭ, ОГ С и у здоровых лиц представлены на рис. 2.

Учитывая результаты проведенного статистического анализа, было сделано заключение, что только уровень секреции цитокинов ИФН-γ и ИЛ-2, количество позитивных реакций при определении в сыворотке крови методом ИФА специфических антител на спектр индивидуальных антигенов HCV (core HCV, NS3, NS4, NS5a, NS5b), а также SI можно рассматривать в качестве критериев, позволяющих выявить пациентов с иммунологическими маркерами HCV-инфекции. По данным параметрам группы больных ОГНЭ и ОГ С достоверно отличаются от группы контроля.

Поскольку только у 17% больных ОГНЭ (4/23), которым были проведено экспериментальное исследование, регистрировалось сочетание всех 3 показателей (обнаружение в сыворотке крови специфических антител на спектр индивидуальных антигенов HCV методом ИФА, наличие Т-клеточного иммунного ответа на антигены HCV методом бласттрансформации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами HCV с регистрируемой секрецией цитокинов), а у остальных имелось сочетание только 2 показателей в различных комбинациях, для выявления пациентов с иммунологическими маркерами HCV-инфекции был введен мультипараметрический критерий позитивности. Критерий включал 6 параметров: суммарные уровни секреции ИФН-γ и ИЛ-2, количество позитивных реакций при Т-клеточной пролифе-

Таблица 2

Параметры выявления пациентов с иммунологическими маркерами HCV-инфекции (по результатам экспериментальных методов исследования сыворотки крови у больных ОГНЭ)

Параметр	Значение
Суммарный уровень, пкг/мл:	
ИФН-γ	≥ 150
ИЛ-2	≥ 100
Количество позитивных реакций при определении секреции:	
ИФН-γ	≥ 3
ИЛ-2	≥ 1
Количество позитивных реакций:	
при проведении Т-клеточной пролиферации	≥ 2
при определении в сыворотке крови методом ИФА специфических антител на спектр индивидуальных антигенов HCV (core HCV, NS3, NS4, NS5a, NS5b)	≥ 5

рации лимфоцитов и секреции цитокинов в ответ на стимуляцию антигенами HCV, а также количество позитивных реакций при определении в сыворотке крови методом ИФА специфических антител на спектр индивидуальных антигенов HCV (core HCV, NS3, NS4, NS5a, NS5b). Результат рассматривали как положительный при наличии 4 и более параметров из 6 предложенных, причем учитывались различные их сочетания (табл. 2).

После введения мультипараметрического критерия были проанализированы результаты экспериментального исследования сывороток крови 23 больных ОГНЭ. Различные сочетания 4 и более параметров из 6 были выявлены у 43,5% из 23 пациентов данной группы.

Таким образом, полученные результаты позволили на основании введения мультипараметрического критерия позитивности, включающего 6 параметров, выявить у 43,5% больных ОГНЭ, обследованных в динамике (1 и 3–6-й месяцы от

начала заболевания) иммунологические маркеры перенесенной HCV-инфекции.

Выводы

1. В структуре больных острым гепатитом, не выезжавших в эндемичные регионы, выявлен вирусный гепатит E — в 4,8% случаев с использованием метода ИФА, в том числе в 2,4% одновременно методами ИФА и ПЦР.

2. Можно предполагать, что доля острой HCV-инфекции с атипичным серологическим профилем (по данным коммерческих тест-систем) составляет 17% при ОГНЭ, а при условии введения мультипараметрического диагностического критерия, включающего 6 параметров, — 43,5%.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Список литературы

1. Михайлов М. И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К. и др. Групповая заболеваемость гепатитом E в г. Коврове Владимирской области (предварительное сообщение) // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН. — Т. 26 / Материалы науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы медицинской вирусологии», посвященной столетию со дня рождения основателя института Михаила Петровича Чумакова. — С. 239–245.
2. Онищенко Г.Г., Жебрун А.Б. Вирусные гепатиты в Российской Федерации: Справочник. — СПб: ФГУН НИИЭИ им. Пастера, 2009. — С. 6.
3. Alter H.J., Sanchez-Pescador R., Urdea M.S. et al. Evaluation of branch DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA // J. Viral Hepat. — 1995. — Vol. 2. — P. 121–132.
4. Bronowiski J.P., Vetter D., Uhl G. et al. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients // J. Infect. Dis. — 1997. — Vol. 176, N 2. — P. 518–522.
5. Cox A.L., Mosbruger T., Lauer G.M. et al. Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C // Hepatology. — 2005. — Vol. 42, N 1. — P. 104–112.
6. Hitziger T., Schmidt M., Schottstedt V. et al. Cellular immune response to hepatitis C virus (HCV) in nonviremic blood donors with indeterminate anti-HCV reactivity // Transfusion. — 2009. — Vol. 49. — P. 1306–1313.
7. Hoofnagle J.H. Course and outcome of hepatitis C // Hepatology. — 2002. — Vol. 36. — P. 21–29.
8. Kamal S.M., Amin A., Madwar M. et al. Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients // J. Virol. — 2004. — Vol. 78, N 22. — P. 12252–12258.
9. Koziel M.J., Wong D.K., Dudley D. et al. Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons // J. Infect. Dis. — 1997. — Vol. 176, N 4. — P. 859–866.
10. Quinti I., Hassan N.F., Salman D. et al. Hepatitis C virus-specific B-cell activation: IgG and IgM detection in acute and chronic hepatitis C // J. Hepatol. — 1995. — Vol. 23, N 6. — P. 640–644.
11. Scognamiglio P., Accapezzato D., Casciaro M.A. et al. Presence of effector CD8+ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors // J. Immunol. — 1999. — Vol. 162, N 11. — P. 6681–6689.
12. Takaki A., Wiese M., Maertens G. et al. Cellular immune response persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C // Nat. Med. — 2000. — Vol. 6. — P. 578–582.