

УДК [616.36-002.12:578.891]-07:616.155.32-07

Клиническое значение динамического определения уровня вирусной нагрузки в крови у пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции

С.А. Шутько¹, К.Р. Дудина¹, О.О. Знойко¹, Е.А. Климова¹, В.И. Каширин²,
Д.С. Чешик², Н.Д. Ющук¹

¹ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет Росздрав»,
кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии,

²Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы)

Clinical value of dynamic testing of viral load level in blood at patients with natural course of chronic HBV-monoinfection

S.A. Shutko, K.R. Dudina, O.O. Znoyko, Ye.A. Klimova, V.I. Kashirin,
D.S. Cheshik, N.D. Yushchuk

Цель исследования. Определить клиническое значение уровня вирусной нагрузки (УВН) HBV в крови у пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции.

Материал и методы. Обследовано 149 пациентов. Среди них 68 (45,6%) женщин и 81 (54,4%) мужчина в возрасте от 16 лет до 71 года. Молекулярно-биологическое исследование на наличие в крови ДНК вируса гепатита В проводилось трехкратно с интервалом в 6 мес методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» (чувствительность метода 10^3 копий/мл).

Результаты. При проведении трехкратного комплексного обследования было выделено 20% неактивных носителей HBsAg. При однократном ПЦР-исследовании у большинства (59,5%) пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ) ДНК HBV в крови не определялась, в то время как при двукратном и трехкратном исследовании число больных с неопределяемым уровнем ДНК HBV заметно сократилось (41 и 12,5% соответственно). Анализ показал, что у больных ХГВ существует прямая корреляционная зависимость между активностью аланинаминотрансферазы (АлАТ) и УВН ДНК HBV ($r=0,385$, $p=0,008$). Лишь в 9% случаев регистрировался постоянно высокий УВН, преимущественно на фоне повышенной активности АлАТ. У 21,7% пациентов с естественным течением хронической HBV-моно-

Aim of investigation. To determine clinical value of viral load level (VLL) of HBV in blood at patients with natural course of chronic HBV-monoinfection.

Material and methods. Overall 149 patients were investigated. Of them 68 (45,6%) were women and 81 man (54,4%) in the age of 16 to 71 years. Molecular-biological analysis for the presence of hepatitis B virus DNA in blood was carried out three times with 6 months intervals by polymerase chain reaction (PCR) method in a «real time» mode (test-sensitivity 10^3 copies/ml).

Results. At triple complex investigation 20% of HBsAg inactive carriers have been selected. At a single PCR – test at the majority (59,5%) of patients with chronic hepatitis B (CHB) no HBV DNA was determined in a blood, while at two-times and triple study the number of patients with not determined HBV DNA level reduced apparently (41 and 12,5% respectively). Analysis has indicated, that CHB patients have direct correlation between alanine transaminases (ALT) activity and HBV DNA VLL ($r=0,385$, $p=0,008$). Only in 9% of cases constantly high VLL was registered, mainly, on a background of elevated activity of ALT. The progressing form of CHB has been diagnosed in 21,7% of patients with natural course of chronic HBV-monoinfection for this they have been recognized as candidates for antiviral therapy.

Conclusions. In original study the direct correlation between parameters of HBV VLL and ALT activity at

Шутько Светлана Анатольевна — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГОУ ВПО «МГМСУ Росздрав»; контактная информация для переписки — svetadindyayeva@yandex.ru; 125367, г. Москва, Волоколамское ш., д. 63, ИКБ №1

инфекции была диагностирована прогрессирующая форма ХГВ, в связи с чем они были признаны кандидатами для назначения противовирусной терапии.

Выводы. В проведенном исследовании выявлена прямая корреляционная зависимость между показателями УВН HBV и активностью АлАТ у пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции. Только комплексное динамическое обследование таких больных поможет выделить абсолютных кандидатов для назначения противовирусной терапии и определить долю неактивных носителей HBsAg.

Ключевые слова: ДНК HBV в крови, хронический гепатит В, уровень вирусной нагрузки.

В настоящее время продолжается активное изучение молекулярной биологии HBV-инфекции и ее связи с клиническими характеристиками основных вариантов течения *хронического гепатита В* (ХГВ). Появление методов генодиагностики позволило улучшить диагностику хронического вирусного гепатита В и выделять хроническую HBV-инфекцию с высокой и низкой репликативной активностью. В прошлом уровень виремии ДНК HBV 10^5 копий/мл являлся пределом чувствительности неамплификационных методов (гибридизация). Пациенты с уровнем ДНК HBV в крови менее 10^5 копий/мл считались ДНК HBV-негативными и при наличии постоянно нормальной активности *аланинаминотрансферазы* (АлАТ) считались неактивными носителями HBsAg [1].

С внедрением в практику амплификационных методов выявления ДНК (чувствительность большинства коммерческих амплификационных тест-систем составляет 10^2 – 10^3 копий ДНК в 1 мл образца) стало ясно, что у неактивных носителей HBsAg концентрация ДНК HBV может варьировать в пределах 10^3 – 10^4 копий/мл, также у части анти-HBs-положительных реконвалесцентов гепатита В выявляются низкие концентрации ДНК HBV в крови (10^2 – 10^3 копий/мл) [4].

Проведенные за последние 10 лет несколько крупномасштабных, длительных, проспективных когортных исследований выявили взаимосвязь между постоянно высоким *уровнем вирусной нагрузки* (УВН) и неблагоприятными исходами заболевания — *циррозо печени* (ЦП) и *гепатоцеллюлярной карциномы* (ГЦК). Продемонстрирована корреляция вирусной нагрузки с *индексом гистологической активности* (ИГА), а также было показано, что постоянно высокий уровень вирусной нагрузки достоверно повышает риск развития ЦП и ГЦК [2, 3].

Методы оценки уровня ДНК HBV в сыворотке крови сегодня не полностью стандартизированы, не установлены динамические характеристики колебаний уровня виремии в крови паци-

patients with natural course of chronic HBV-monoinfection was revealed. Only complex dynamic assessment of such patients helps to define absolute candidates for prescription of antiviral therapy and to determine proportion of inactive HBsAg carriers.

Key words: HBV DNA in blood, chronic hepatitis B, viral load level.

ента, которые могли бы служить показателем прогрессирования ХГВ и риска развития ЦП, отсутствуют четкие представления о клинической значимости выявления низких концентраций ДНК HBV.

Целью исследования было оценить значение вирусной нагрузки при динамическом обследовании пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции для выявления доли неактивных носителей в популяции HBsAg-положительных пациентов и отбора кандидатов для назначения противовирусной терапии в случаях прогрессирования болезни.

Материал и методы исследования

В период с октября 2006 г. по июль 2009 г. в исследование было включено 149 пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции, состоящих на учете в Консультативном специализированном гепатологическом отделе при ИКБ № 1 и регулярно посещающих лечащих врачей, а также поступающих в отделения вирусных гепатитов ИКБ № 1 на обследование по направлению районного военного комиссариата и из районных поликлиник для уточнения клинического диагноза.

Критериями включения больных в исследование являлись: выявление в анамнезе HBsAg в течение 6 мес и более, возможность наблюдения за пациентом в течение полутора — двух лет, письменное информированное согласие на участие в исследовании, отсутствие онкологических и психических заболеваний, ЦП и ВИЧ-инфекции.

Диагноз «неактивное носительство HBsAg» устанавливали на основании отсутствия жалоб у больных при динамическом наблюдении, постоянно нормального уровня активности трансаминаз (АлАТ, АсАТ) в биохимическом анализе крови, персистенции HBsAg в течение 6 мес и более, отсутствия ДНК HBV и HBeAg в сыворотке крови при трехкратном исследовании.

При наличии 3 из 4 перечисленных ниже критериев у пациентов устанавливался диагноз

«хронический вирусный гепатит В»: персистенция HBsAg в течение 6 мес и более, обнаружение ДНК HBV (даже однократно) в сыворотке крови, постоянно нормальный, волнообразный или повышенный уровень трансаминаз в сыворотке крови, гистологическая картина хронического гепатита (ИГА $\geq$ 6).

На основании полученных в ходе исследования клинико-лабораторных данных при динамическом исследовании у 24 из 80 пациентов при трехкратном обследовании с интервалом в 6 мес ДНК HBV в крови не выявлена. Критериям диагноза «неактивное носительство HBsAg» отвечали только 16 из 24 больных (у 8 больных был зарегистрирован повышенный уровень АлАТ). Таким образом, пациенты с хронической HBV-моноинфекцией были разделены на 2 группы: группа № 1 — неактивные носители HBsAg ($n=16$); группа № 2 — больные ХГВ ($n=133$). По результатам динамического наблюдения за больными ХГВ было выявлено 3 диапазона УВН ДНК HBV в крови: постоянно высокий ($>10^5$ копий/мл), волнообразный (от 10^3 до 10^{10} копий/мл) и постоянно низкий ($<10^3$ – 10^4 копий/мл).

Всем пациентам, включенным в исследование, проводилось стандартное клиническое обследование: общий анализ крови, определение биохимических показателей крови с интервалом в 6 мес, серологическое исследование для определения маркеров вирусных гепатитов методом иммуноферментного анализа. Дополнительно для уточнения диагноза 26 больным выполнена *пункционная биопсия печени* (ПБП) и 46 пациентам — транзитная фиброэластография.

Молекулярно-биологическое исследование на наличие в крови ДНК вируса гепатита В проводилось трехкратно с интервалом в 6 мес в лаборатории НПФ «Литех» с использованием наборов реагентов для выявления ДНК HBV в крови методом *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) с детекцией результатов в режиме «реального времени» (чувствительности метода 10^3 копий/мл). Для количественной оценки ДНК HBV использован набор реагентов «БИОТИТР В» (ООО НПФ «Литех»), в состав которого входят праймеры, подобранные к консервативному участку вирусного генома, кодирующему HBsAg.

Результаты исследования

Среди 149 больных с хронической HBV-моноинфекцией было 68 (45,6%) женщин и 81 (54,4%) мужчина, распределение их по возрасту показано в табл. 1.

Подавляющее большинство больных (83,8%, 129/149) составили лица с давностью выявления HBsAg в крови от года до 10 лет, в основном до 5 лет (57%, 85/149).

В **группу № 1** вошли 16 пациентов (6 мужчин и 10 женщин) в возрасте от 16 лет до 71 года, у которых в процессе динамического наблюдения и обследования был установлен диагноз «неактивное носительство HBsAg». Средний возраст больных в группе составил $37,6 \pm 4,1$ года, в одинаковой пропорции представлены молодые пациенты — до 30 лет (50%) и пациенты более старшего возраста — 31–60 лет (50%). У подавляющего большинства неактивных носителей HBsAg (81%, $n=13$) давность обнаружения HBsAg по данным анамнеза составляла от 1 года до 5 лет.

При проведении динамического наблюдения и обследования в течение 1,5–2 лет у пациентов группы № 1 отсутствовали жалобы при осмотре, регистрировался постоянно нормальный уровень аминотрансфераз в сыворотке крови, не выявлены маркеры репликации HBV (ДНК HBV, анти-HBcore IgM и HBeAg).

В **группу № 2** включены 133 пациента с хроническим вирусным гепатитом В: 75 (56,4%) мужчин и 58 (43,6%) женщин в возрасте от 16 лет до 71 года (средний — $39,24 \pm 1,4$ года), преобладали больные старше 30 лет (57,7%).

У большинства пациентов (92,5%, 123/133) диагностирован HBeAg-негативный ХГВ, у 10 (7,5%) — HBeAg-позитивный.

На момент окончания исследования однократно были обследованы 42 (31,6%) больных из 133, двукратно — 22 (16,5%) и трехкратно — 69 (51,9%). Из 149 пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции трехкратно с интервалом в 6 мес было обследовано 80 человек, среди них доля неактивных носителей HBsAg составила 20%.

Средние показатели АлАТ и АсАТ ($M \pm m$, минимальные и максимальные значения в группе) в биохимическом анализе крови больных данной группы, обследованных однократно, двукратно и трехкратно, приведены в табл. 2. При однократ-

Таблица 1

Возрастная структура пациентов с хронической HBV-моноинфекцией

Общее количество пациентов	Возраст, количество лет				
	16–30	31–40	41–50	51–60	Старше 60
Абс. число ($n=149$)	65	17	21	29	17
%	43,6	11,4	14	19,5	11,4

Таблица 2

Средние показатели АлАТ и АсАТ* у обследованных больных ХГВ, М±m

Кратность обследования	При включении в исследование		Через 6 мес		Через 12 мес	
	АлАТ	АсАТ	АлАТ	АсАТ	АлАТ	АсАТ
Однократно, n=42	41,29±6,3 (13–267)	33,1±3,6 (12–109)	—	—	—	—
Двукратно, n=22	35,01±5,2 (13–96)	30,49±5,9 (14–132)	24,17±5,1 (10–102)	22,84±2,9 (13–68)	—	—
Трехкратно, n=64	37,75±4,0 (9,2–210)	29,63±1,9 (10,2–85)	34,97±2,8 (11–101)	29,03±1,5 (6–72)	48,52±7,2 (11–326)	37,24±4,2 (14–186)

*Норма АлАТ, АсАТ 0–40 мкмоль/(мин·л).

Таблица 3

Диапазон УВН у больных ХГВ при однократном, двукратном, трехкратном обследовании

Кратность обследования	Уровень вирусной нагрузки ДНК HBV в крови			
	ДНК HBV(–)	Низкий и постоянно низкий	Волнообразный	Высокий и постоянно высокий
Однократно, n=42	25/42 59,5%	10/42 23,8%	—	7/42 16,7%
Двукратно, n=22	9/22 41%	5/22 22,7%	5/22 22,7%	3/22 13,6%
Трехкратно, n=64	8/64 12,5%	29/64 45,3%	21/64 32,8%	6/64 9,4%

ном обследовании у 69% пациентов регистрировались нормальные показатели АлАТ и АсАТ. При двукратном обследовании доля таких больных составила 72,7%. Как видно из табл. 2, у больных ХГВ как при однократном, так и при динамическом обследовании средние показатели АлАТ и АсАТ в биохимическом анализе крови в основном не превышали 1,5 нормы.

Колебания УВН ДНК HBV в крови обследованных представлены в табл. 3. У большинства из них (59,5%) при однократном ПЦР-исследовании ДНК HBV в крови не определялась, в то время как при двукратном и трехкратном исследовании доля больных с неопределяемым уровнем ДНК HBV заметно сократилась (41 и 12,5% соответственно).

Таким образом, при однократном, двукратном и трехкратном обследовании пациентов с естественным течением ХГВ большинство составили больные с неопределяемым и низким уровнем ДНК HBV в сыворотке крови — соответственно 83,3% (35/42), 63,6% (14/22) и 57,8% (37/64).

Среди больных ХГВ как с нормальными, так и с повышенными значениями АлАТ в крови преобладали лица с низким и неопределяемым уровнем вiremии ДНК HBV: нормальные показатели АлАТ отмечены у 93,0% (27/29), 68,75% (11/16) и 63,4% (26/41) пациентов, повышенные — у 61,6% (8/13), 50,0% (3/6) и 47,8% (11/23) при однократном, двукратном и трехкратном исследовании соответственно.

При динамическом обследовании в течение 1,5–2 лет зарегистрировано снижение частоты

выявления больных с высоким УВН ДНК HBV в сыворотке крови: 16,7% (7/42), 13,6% (3/22), 9,4% (6/64) при аналогичной кратности исследования. У больных с повышенным уровнем АлАТ также наблюдалось снижение частоты выявления высокого УВН ДНК HBV (однократное исследование — 38,4%, трехкратное — 26,1%). Среди больных ХГВ с нормальным уровнем АлАТ, обследованных однократно и двукратно, высокий УВН ДНК HBV зафиксирован только у 7,0% (2/29) и 12,5% (2/16) соответственно и не зарегистрирован постоянно высокий УВН при трехкратном исследовании.

Был осуществлен корреляционный анализ активности АлАТ и УВН ДНК HBV в образцах крови больных ХГВ с максимальным уровнем вiremии. Сопоставление полученных результатов показало, что существует прямая корреляционная зависимость между уровнем АлАТ и УВН ДНК HBV ($r=0,385$, $p=0,008$).

У большинства больных, обследованных трехкратно, диагностирован *НВеАg-негативный ХГВ* (92,2%, 59/64). В их числе пациенты с неопределяемым и постоянно низким УВН встречались в 61% случаев, с волнообразным — в 32% и постоянно высоким — в 7%. У лиц, обследованных двукратно и трехкратно, образцы крови с неопределяемым УВН получены в 42,3% случаев и с постоянно низким (10^4 копий/мл) — в 57,7%. У больных с волнообразным УВН ДНК HBV большую часть (53,8%) составили образцы крови с уровнем вiremии $<10^5$ копий/мл, не было ни одного образца

с его значением $>10^7$ копий/мл, 46,2% составили образцы с УВН 10^5 – 10^7 копий/мл. В группе больных НВеAg-негативным ХГВ и постоянно высоким УВН ДНК HBV большинство образцов (66,6%) имели диапазон УВН 10^5 – 10^6 копий/мл, а остальные 33,4% – 10^7 – 10^8 копий/мл.

При трехкратном обследовании пациентов с НВеAg-позитивным ХГВ (5/64, 7,8%,) не выявлены образцы крови с постоянно низким УВН ДНК HBV. У больных с волнообразным УВН в большинстве случаев (62,5%) встречались образцы с уровнем виремии $\geq 10^5$ копий/мл, у пациентов с постоянно высоким УВН в 100% зарегистрирован показатель $\geq 10^8$ копий/мл.

В настоящем исследовании 21,7% (15/69) пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции вошли в число абсолютных кандидатов для назначения противовирусной терапии на основании повышенного уровня активности АлАТ в биохимическом анализе крови, высокого уровня виремии (ДНК HBV $>10^5$ копий/мл), гистологической картины гепатита (ИГА ≥ 6) по данным ПБП и/или фиброэластографии (F ≥ 2), т. е. у данной группы пациентов была диагностирована прогрессирующая форма заболевания. Среди НВе-позитивных больных ХГВ кандидатами для проведения противовирусной терапии признаны 30% пациентов, из числа НВе-негативных – 9,7%.

Среди 15 больных ХГВ, признанных кандидатами для назначения противовирусной терапии, было 12 мужчин и 3 женщины в возрасте $40,13 \pm 4,5$ года, преобладали пациенты старше 40 лет (53,3%). Средний уровень АлАТ – $121,93 \pm 24,48$ (22–326) мкмоль/лмин. НВеAg-позитивный ХГВ диагностирован у 20% (3/15) больных. В данной группе у 60% (6/10) пациентов был постоянно высокий УВН ДНК HBV в крови, у 30% (3/10) – волнообразный. У одной пациентки этот показатель колебался на неопределяемом уровне (до 10^4 копий/мл): она была отобрана в группу абсолютных кандидатов на лечение в связи с гиперферментемией в биохимическом анализе крови и картиной активного гепатита по результатам ПБП.

Пяти (33,3%) из 15 больных ХГВ, включенных в исследование, противовирусная терапия была назначена после однократного обследования на основании повышенных показателей активности АлАТ, АсАТ (среднее значение АлАТ 130 мкмоль/лмин, высокого УВН (ДНК HBV $>10^5$ копий/мл), гистологической картины активного гепатита (у 2 пациентов по результатам ПБП: ИГА по Knodell >9 баллов, F-2 по METAVIR, у 3 пациентов: F-2 по данным транзитной фиброэластографии). Десять (66,7%) пациентов были признаны кандидатами для назначения противовирусной терапии после трехкратного динамического обследования, т. е. биопсия печени или фибро-

эластография были назначены в связи с выявленным высоким уровнем виремии и/или вследствие регистрации повышенной активности АлАТ.

Обсуждение результатов исследования

В последние годы с развитием новых технологий и высокочувствительных методов ПЦР-диагностики, а также во многом благодаря проведенным ранее исследованиям постоянно высокий УВН ДНК HBV в крови всеми ведущими специалистами как Европы, так и США предлагается рассматривать в качестве одного из критериев назначения пациенту с хронической HBV-инфекцией противовирусной терапии. Проведенные проспективные исследования показали, что сама по себе вирусная нагрузка ДНК HBV в крови, даже на фоне нормального уровня АлАТ и независимо от наличия ЦП, является фактором высокого риска развития ГЦК [3].

В ходе настоящего исследования установлено, что динамическое определение УВН ДНК HBV в крови позволяет выявить долю неактивных носителей HBsAg в популяции HBsAg-позитивных пациентов. При проведении трехкратного обследования у 30% пациентов с естественным течением ХГВ ДНК HBV в крови не определялась и только у 20% (16/80) больных отсутствие виремии было зарегистрировано на фоне постоянно нормальной активности АлАТ. Таким образом, неоднократное динамическое обследование на наличие ДНК HBV в сыворотке крови в течение 1,5–2 лет позволило нам выявить пациентов с постоянно неопределяемым уровнем вирусной нагрузки и постоянно нормальной активностью АлАТ, что дало возможность сформулировать диагноз – «неактивное носительство HBsAg».

Среди больных с естественным течением ХГВ при первичном ПЦР-исследовании ДНК HBV в крови выявлена у 40,5% пациентов, но при динамическом (двукратном, трехкратном) исследовании количество ДНК-позитивных больных ХГВ заметно увеличилось (87,5%). При этом у большинства (57,8%, 37/64) регистрировался неопределяемый или низкий уровень ДНК HBV. Доля больных с волнообразным УВН составила 32,8% и в большинстве образцов крови (53,8%) у них регистрировался уровень виремии менее 10^5 копий/мл. Пациентов с постоянно высоким УВН было лишь 9%, регистрировался он преимущественно на фоне повышенной активности АлАТ. Однако в группе больных, признанных кандидатами для проведения противовирусной терапии, доля пациентов с постоянно высоким УВН ДНК HBV на фоне повышенной активности АлАТ составила 60%, у 30% пациентов данной группы регистрировался волнообразный УВН и у 10% – постоянно низкий. На основании опре-

деления уровня виремии и активности АлАТ у 33,3% больных ХГВ были установлены показания для противовирусного лечения по результатам первичного обследования, у 66,7% только после динамического наблюдения удалось установить точный диагноз и определить показания для назначения противовирусной терапии.

Выводы

1. Трехкратное биохимическое и вирусологическое исследование, проведенное у больных с естественным течением хронической HBV-моноинфекции с интервалом в 6 мес, позволило установить долю неактивных носителей HBsAg (20%) в популяции HBsAg-положительных пациентов.

2. Выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем вирусной нагрузки и показателями активности АлАТ у пациентов с

естественным течением хронической HBV-моноинфекции.

3. Среди больных ХГВ с определяемым уровнем виремии 21,7% были признаны кандидатами для назначения противовирусной терапии (7,2% — на основании данных анамнеза, однократного определения УВН ДНК HBV в крови и результатов морфологии печени, 14,5% — по данным анамнеза и результатам динамического обследования в течение 1,5–2 лет, включающего определение в крови УВН ДНК HBV, активности АлАТ и морфологическую картину биоптата печени). Средний возраст кандидатов для противовирусной терапии — 41 год, 79% пациентов составили лица мужского пола.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы ННПК шифр «2009-1.1-202-019»

Список литературы

1. Agalar C., Diri C., Ucubutum S. The role of HBV DNA and liver histopathology in HBsAg carriers // Hepatogastroenterology. — 1997. — Vol. 44, N 16. — P. 1196–1199.
2. Chen C.J., Yang H.I., Su J. et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load // Gastroenterology. — 2006. — Vol. 130, N 3. — P. 678–686.
3. Chen C.J., Yang H.I., Su J. et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level // JAMA. — 2006. — Vol. 295, N 1. — P. 65–73.
4. Emmet B., Douglas T. A treatment algorithm for the management of chronic HBV infection in the U.S. // Clin. Gastroenterol. Hepatol. — 2004. — Vol. 2, N2. — P. 87–106.