

НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ Росздрава
 Научно – производственная фирма “ЛИТЕХ”
 МГУ им. М.В. Ломоносова, Кафедра терапии Факультета фундаментальной медицины
 Центральная клиническая больница Медицинского Центра УД Президента РФ (отд. гастроэнтерологии)

Ильина Е.Н., Фомина Е.Е., Артемов Е.К., Говорун В.М., Иваников И.О., Сюткин В.Е.

ХРОНИЧЕСКИЕ ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕЧЕНИ

(методическое пособие для врачей)

МОСКВА 2001 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	1
Определение. Классификация. Хронизация инфекции.	
Механизмы прогрессирования ХЗП	3
Клиническая картина и естественное течение.....	3
Лабораторная диагностика вирусных гепатитов В и С.....	4
Биохимический анализ	5
Выявление серологических маркеров вирусных гепатитов	7
Серодиагностика вирусного гепатита В	7
Серодиагностика гепатита С.....	10
Генодиагностика гепатита С	12
Лечение.....	17
Литература	21

Список сокращений:

АЛТ – аланиновая аминотрансфераза	ХГ – хронический гепатит
АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза	ХЗП – хронические заболевания печени
АТ – аминотрансферазы	ЦП – цирроз печени
ГГТ – гаммаглутамилтрансфераза	ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома
ИФА – иммуноферментный анализ	ПЦР – полимеразная цепная реакция
ОВГ – острый вирусный гепатит	ИФНа – интерферон альфа
ЩФ – щелочная фосфатаза	РИБ – рибавирин
ХВЗП – хронические вирусные заболевания печени	

Введение

Вирусные гепатиты – группа инфекционных заболеваний, вызванных гепатотропными вирусами (А, В, С, D, E, G, TTV), при которых воспалительные и некротические процессы в печени определяют развитие основных клинических и лабораторных проявлений болезни. Диагностика и лечение вирусных гепатитов, занимающих одно из ведущих мест среди заболеваний желудочно-кишечного тракта человека, представляют трудную глобальную проблему, далекую от своего решения. По данным ВОЗ в разных странах мира вирусными гепатитами инфицировано или перенесло в прошлом около 2 млрд. человек, что существенно превышает распространенность ВИЧ инфекции. Вирусные гепатиты включают в себя широкий круг состояний: от легких, субклинических, до тяжелых, быстро прогрессирующих форм болезни; от острых, самоограничивающихся до хронических поражений с развитием цирроза и рака печени.

По крайней мере, пять вирусов (А, В, С, D, E), принадлежащих к различным семействам, способны вызывать поражение печени. Четыре из них содержат РНК, а пятый (HBV), хотя и является ДНК-содержащим вирусом, использует транскрипты РНК в качестве прегенома. Таким образом, ни один из них не является типичным ДНК-содержащим вирусом. С клинической точки зрения вирусы гепатита следует группировать с позиции способов их передачи и возможности хронизации. Три из пяти вирусов (В, С и D) покрыты оболочкой, передаются парентерально и способны вызывать не только острый, но и хронический гепатит. Вирусы гепатита А и E передаются фекально-оральным путем и вызывают только острый гепатит.

В дополнение к основным пяти возбудителям в последнее время описано несколько новых вирусов, роль которых в развитии поражения печени полностью не ясна. Не установлено даже, являются ли эти вирусы (G, TTV) гепатотропными.

Среди всех инфекционных болезней вирусные гепатиты остаются на третьем месте по распространенности, причем пять упомянутых выше вирусов гепатита являются причиной развития 95% острых и 80% хронических гепатитов. Вирусам гепатита ни-А-ни-Е приписывается этиологическая роль в развитии оставшейся доли гепатитов, криптогенных циррозов и, возможно, гепатоцеллюлярной карциномы.

Наибольшую угрозу для здоровья населения представляют вирусные гепатиты с парентеральным путем передачи (В, С и D). По данным ВОЗ около 300.000 человек ежегодно заболевают вирусным гепатитом В. Сегодня в мире насчитывается 3 млн. больных ХГ В, что составляет 6-10 % от общего числа хронических заболеваний печени. Еще более серьезную опасность представляет вирусный гепатит С. В разных странах от 1 до 5% населения поражены этим вирусом. В России частота встречаемости инфекции HCV составляет около 4,5 %. Среди ХЗП вирусный гепатит С стоит на первом месте и составляет 40-60 % больных.

Современные представления о вирусных гепатитах во многом обусловлены развитием междисциплинарных исследований в вирусологии, иммунологии, молекулярной биологии. Открытие В. Blumberg в 1965 году австралийского антигена (HBsAg) позволило выделить в отдельные нозологические формы вирусные гепатиты А и В, детально их изучить и обосновать меры профилактики. В 1989г. группе японских и американских специалистов удалось выделить и идентифицировать геном ранее не известного вируса, ответственного за развитие трансфузионного вирусного гепатита (HCV). Использование молекулярно-биологических методов позволило за относительно короткий период идентифицировать еще ряд гепатотропных вирусов, получивших, соответственно, названия вирус гепатита D (HDV), вирус гепатита Е (HEV) и вирус гепатита G (HGV). Важнейшим достижением биологической науки явилось доказательство этиологического единства острых и хронических форм сывороточных гепатитов В и С, положившее конец господствующим представлениям о вирусной природе исключительно острых гепатитов и неинфекционном генезе хронических форм (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика форм вирусных гепатитов.

ФОРМА/ возбудитель	Путь заражения	Вирусоносительство	Склонность к хронизации	Методы специфической диагностики
Гепатит А / HAV-РНК	Фекально-оральный	НЕТ	Не обнаружена	АЛТ, Anti-HAV-Ig M, Anti-HAV
Гепатит В /HBV-ДНК	Парентеральный, контактный, половой	ЕСТЬ	Выражена	АЛТ, HBV DNA, HBsAg, HBeAg, Anti-HBc- Ig M
Гепатит С / HCV-РНК	Парентеральный, контактный, половой	Вероятно ЕСТЬ	Выражена	АЛТ, Anti-HCV, HCV RNA
Гепатит D / HDV-РНК	Парентеральный	Вероятно	Выражена	HDV RNA
Гепатит Е / HEV-РНК	Фекально-оральный	НЕТ	Не обнаружена	АЛТ, HEV RNA
Гепатит G/ HGV-РНК	Парентеральный	Пока не уточнено	Выражена	HGV RNA

Современные подходы диагностики и мониторинга развития вирусных гепатитов В и С реализуют принцип комплексного обследования пациента, включающего характерную клиническую картину и данные лабораторных исследований (рис. 1).

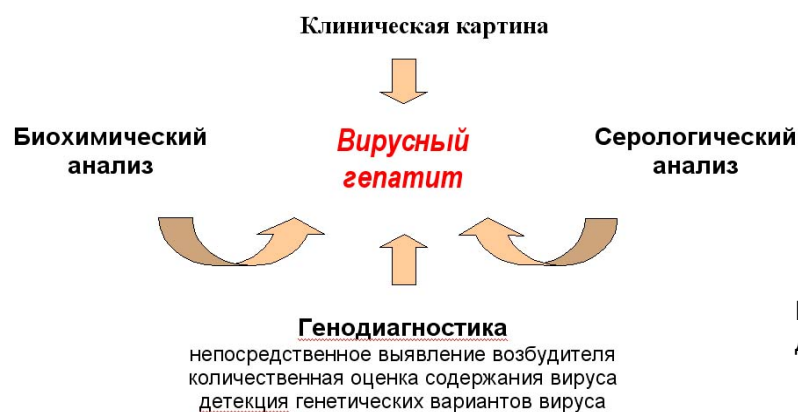


Рис. 1. Краткая схема установления диагноза "вирусный гепатит"

Определение. Классификация. Хронизация инфекции. Механизмы прогрессирования ХЗП

Термин “хронические вирусные гепатиты” был предложен в 1970-х гг. для описания случаев хронических активных заболеваний печени вирусной этиологии, при которых в сыворотке крови определялся HBsAg. В настоящее время это понятие приложимо ко всем диффузно-воспалительным заболеваниям печени, обусловленным вирусами гепатита В, С и D, при которых клинико-лабораторные и морфологические изменения сохраняются 6 и более месяцев. При этом предполагается наличие в печени той или иной степени воспаления и/или фиброза.

В классификации ХЗП, принятой в 1994г. в Лос-Анджелесе, требуется указание этиологии, степени активности гепатита и выраженности фиброза в печени. Активность гепатита характеризуют количество обострений в течение заболевания, выраженность паренхиматозной желтухи, биохимические показатели воспаления и цитолиза, а также выраженность инфильтративных и некротических изменений в печени. Стадия ХЗП характеризуется клиническими признаками декомпенсации, а также выраженностью и локализацией фиброза и сохранностью долькового строения печени, определяемыми на основании гистологического исследования.

Таким образом, современная классификация ХЗП позволяет квалифицировать персистенцию вирусной инфекции более 6 месяцев при нормальных показателях активности аминотрансфераз сыворотки и нормальной гистологической картине в печени (хроническое вирусоносительство) как “хронический гепатит (В, С), неактивный” (активность - 0, фиброз-0). Активный цирроз печени, следует квалифицировать как “хронический гепатит (В, С), высокой степени активности, с циррозом” (активность - 4, фиброз-4).

При инфицировании HBV взрослого хронизация инфекции наблюдается в 10% случаев, из которых в 2/3 формируется “здоровое” носительство вируса и лишь в 30% случаев прогрессирующий гепатит. Инфекция HCV по мнению большинства авторов является первично хронической в 80 - 90% случаев. При этом лишь у 20% инфицированных можно предполагать отсутствие гепатита. Уровень хронизации в результате перенесенной коинфекции HBV/HDV сравним с уровнем хронизации в результате перенесенного ОВГ В. Большинство случаев развития ХГ D являются результатом суперинфекции HDV носителя HBsAg.

Среди механизмов прогрессирования ХГ В и D преобладают воспалительно-некротические повреждения паренхимы. При инфекции HCV прогрессирующий фиброз преобладает над явлениями гепатита. Неспособный к интеграции в геном хозяина вирус, непрерывно реплицируясь, поддерживает слабую, но постоянную воспалительную активность, уровень которой также возрастает в процессе заболевания, что приводит к нарастанию фиброза даже на стадии ЦП.

Клиническая картина и естественное течение

Хронические вирусные гепатиты, как правило, малосимптомны и нередко впервые выявляются на стадии цирроза печени. Наиболее частыми признаками ХГ являются слабость, недомогание, быстрая утомляемость, снижение аппетита, тошнота, тяжесть в правом подреберье, увеличение печени. Могут наблюдаться боли в мышцах, суставах. Классические “печеночные” симптомы, такие как желтуха, кожный зуд, увеличение селезенки, сосудистые паучки, покраснение ладоней и стоп встречаются в основном на поздних стадиях болезни. Активность аминотрансфераз может быть несколько повышена, другие “функциональные печеночные пробы” остаются в пределах нормы. При морфологическом исследовании ткани печени могут наблюдаться любые изменения от незначительных до массивных некрозов с выраженной инфильтрацией на фоне сформированного ЦП. Наиболее тяжелые изменения наблюдаются у 20% больных с высокой активностью аминотрансфераз и только у 1% больных с постоянно нормальной активностью ферментов.

Ранняя стадия ХГ В, как правило, полностью бессимптомна, несмотря на высокий уровень репликации вируса, что отражает толерантность иммунной системы к вирусу. В последующем иммунный ответ нарастает, и иммунное удаление инфицированных гепатоцитов приводит к развитию активного воспаления, некрозов, на месте которых формируется фиброз. Исчезновение HBeAg и реплицирующихся форм вируса приводит к стиханию воспаления, однако, в сыворотке сохраняется HBsAg, что свидетельствует об интеграции вируса в геном гепатоцита. В этой стадии болезни преобладают мутантные штаммы вируса, которые могут поддерживать активную репликацию после сероконверсии в HBe-системе или появляются позднее, вызывая реактивацию гепатита. Несмотря на то, что эти варианты вируса не представляют

HBsAg, они не ускользают от иммунной системы, и как только репликация вируса возрастает, иммунное удаление инфицированных гепатоцитов приводит к вспышке воспалительных и некротических изменений в печени. В ряде случаев реактивация вирусной репликации может быть столь значительна, а иммунный ответ столь силен, что возможны тяжелые и даже фульминантные вспышки гепатита, которые можно расценить как острый гепатит. Титр анти-HBs IgM повышается до уровня, характерного для острого гепатита В. В этих случаях, если больной выживает, возможно полное удаление вируса с развитием сероконверсии в HBs-системе. ХГ В, приобретенный в детстве, протекает десятилетиями. Течение болезни может осложниться суперинфекцией HCV или HDV, привести к развитию декомпенсированного цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Внепеченочные проявления инфекции HBV обычно наблюдаются у больных с нетяжелыми формами гепатита. К ним относятся узелковый периартериит, мембранозный гломерулонефрит, криоглобулинемия, сухой синдром и некоторые другие патологические состояния.

Поскольку поверхностный антиген HBV (HBsAg) является оболочкой частиц HDV (D), инфекция HDV зависит от HBV. Несмотря на необходимость HBV для передачи и распространения HDV "из клетки в клетку" внутри пораженной печени, репликация HDV происходит независимо от HBV, но частицы HDV не формируются в отсутствие HBV. Таким образом, теоретически гепатит дельта может наблюдаться в отсутствие инфекции HBV, но убедительных клинических доказательств этого к настоящему времени не получено. Выделяют два варианта течения инфекции HDV. При коинфекции происходит одновременное попадание в гепатоцит HBV и HDV. Коинфекция развивается у лиц, неиммунных в отношении HBV. При этом возникает совместный В и D гепатит с соответствующим серологическим ответом на оба вируса. Вторая модель (суперинфекция HDV) реализуется, когда HDV инфицируются носители HBsAg. Такой вариант чаще всего проявляется клиникой ОБГ D и сопровождается быстрым появлением анти-HDV класса G при одновременном снижении титра HBsAg в сыворотке крови и гепатоцитах, что связывают с потреблением его реплицирующимся HDV.

Субклинические формы ХГ D встречаются в 2-4 раза чаще, чем манифестные, особенно в эндемичных для этой инфекции районах. Течение болезни характеризуется быстрым прогрессированием с развитием печеночно-клеточной недостаточности в течение 1-2 лет у 15% больных, у 70% инфицированных болезнь длится десятилетиями, в 15% случаев наблюдается ремиссия и даже полное освобождение организма от инфекции. Как правило, цирроз печени развивается у больных гепатитом D быстрее, чем у больных гепатитом В. На стадии цирроза печени прогрессирование болезни замедляется и не отличается от прогрессирования цирроза у больных с моноинфекцией HBV, а ГЦК развивается реже, чем у больных ХГ В.

Высокая частота хронизации инфекции HCV обусловлена, главным образом, характеристиками вируса, а прогрессирование болезни печени - характеристиками хозяина. Развитие цирроза печени наблюдается у 30% больных в среднем, через 30 лет с момента инфицирования. У мужчин старшего возраста, особенно употребляющих в значительных количествах алкоголь, цирроз печени формируется быстрее, чем у женщин, инфицированных в молодом возрасте. У большинства больных гепатит длительно протекает бессимптомно и случайно выявляется при обследовании. Стойко нормальный уровень сывороточных АТ не исключает возможности тяжелого поражения печени, а у больных с высокими показателями АТ могут иметь место ранние стадии болезни, что обуславливает необходимость проведения биопсии печени всем больным ХГ С. Из лабораторных признаков для больных ХГ С более чем при других вирусных гепатитах, характерны тромбоцитопения в отсутствие гиперспленизма и раннее повышение g-глобулинов сыворотки. Вирус гепатита С характеризуется не только гепато-, но и лимфотропизмом, что обуславливает широкий спектр внепеченочных проявлений болезни. Основными являются: смешанная криоглобулинемия, клиническими проявлениями которой могут быть васкулиты, мезангио-капиллярный гломерулонефрит, лимфоцитарный сиалоаденит; развитие лимфопролиферативных заболеваний, тиреоидит, красный плоский лишай. Спектр внепеченочных проявлений хронической инфекции HCV продолжает непрерывно пополняться клиническими синдромами и нозологическими формами.

Основные клинические проявления, обусловленные поражением печени, наблюдаются при всех вариантах гепатитов. Спектр внепеченочных проявлений и способность к хронизации и прогрессивному течению в большей степени зависят от этиологии. Тем не менее, несмотря на различия, наблюдающиеся в клинической картине и течении гепатитов, дифференциальный диагноз между ними возможен только на основании серологической и генодиагностики.

Лабораторная диагностика вирусных гепатитов В и С

Результаты лабораторных исследований играют существенную, если не ведущую, роль для подтверждения диагноза вирусного гепатита, установления его этиологии, выборе тактики лечения, оценки эффективности терапии и прогнозе исхода заболевания.

Биохимический анализ крови

Биохимический анализ крови пациентов давно вошел в практику клинических лабораторий. Совокупность получаемых данных о показателях обмена билирубина, сывороточных белках и ферментах позволяют обнаружить воспалительные процессы, происходящие в организме человека, предположить их локализацию и помогает оценить характер патологического процесса в печени, оценить тяжесть поражения гепатоцитов. Эти критерии не специфичны и не характеризуют этиологию вирусных гепатитов, вместе с тем существенны для оценки функционального состояния печени. Таким образом, выявление сывороточных маркеров гепатита, идентификация вирусов с помощью ПЦР анализа позволяют поставить диагноз вирусный гепатит, а комплексное биохимическое обследование помогает оценить степень тяжести поражения печени (хронизация вирусных гепатитов, осложнения – цирроз, рак).

Оценка активности ферментов

Определение активности аминотрансфераз сыворотки (аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ)) является высокочувствительным показателем цитолиза гепатоцитов, что определяет ее ведущую роль в диагностике гепатитов различной этиологии. Активность АЛТ в крови возрастает уже в инкубационный период – на 6-10 день после заражения, хотя отмечено, что при ОВГ С активность АЛТ может быть в норме на протяжении всего периода заболевания. Одновременное определение активности АЛТ и АСТ является весьма ценным диагностическим тестом. Соотношение активности АСТ/АЛТ (коэффициент де Ритиса) в норме составляет $1,33 \pm 0,42$ и резко снижается (менее 0,7) при поражении ткани печени. При цитолитическом процессе, развивающимся в печени больного вирусным гепатитом, преобладает “вымывание” АЛТ, степень повышения АСТ существенно меньше. Для дополнительного подтверждения гепатогенной природы ферментемии можно определить активность печеночноспецифических ферментов – сорбитдегидрогеназы (норма до 17 Ед/л), фруктозо-1-фосфатаальдозазы (норма до 1 ЕД), урокиназы (норма до 1 ЕД) и др. Они локализуются преимущественно в гепатоцитах и их повышение их активности в крови однозначно связано с патологией печени. Вместе с тем, эти тесты уступают по чувствительности определению активности АЛТ.

В целом биохимический анализ крови помогает в оценке функционального состояния печени, позволяет оценить разрешение ОВГ в ХГ и его возможный исход – цирроз или рак, как финальную и необратимую стадию гепатита (таблица 2).

Таблица 2. Определение активности ферментов в сыворотке крови * значения приведены в соответствии с рекомендациями диагностических тест-систем, используемых в КДЛ НПФ “Литех”

Фермент	Нормальные* значения	ОВГ	ХВГ	Цирроз	Онкозаболевание
АЛТ	до 40 Ед/л	↑↑↑	↑↑	↑ или N	N
АСТ	до 40 Ед/л	↑↑	↑	↑ или N	↑↑↑
АЛТ/АСТ	$1,33 \pm 0,42$	менее 0,7	до 1	до 2,0	до 5,0
Билирубин общ	1,7 – 17,1 мкмоль/л	↑↑↑	↑ или ↑↑	↑ или N	↑↑
Билирубин прямой	до 3,4 мкмоль/л	↑↑↑	↑ или ↑↑	↑ или N	↑↑
Билирубин не прямой	1,7 - 12,7 мкмоль/л	N или ↑	N или ↑	↑ или N	↑↑
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) общ	160-450 Ед/л	N	↑	↑ или N	↑↑
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	31-115 Ед/л дети: до 350 Ед/л	N	↑	↑	↑
ГТГ	Ж – до 40 Ед/л М – до 61 Ед/л	N	↑ или N	↑	↑↑↑
Общий белок	65-87 г/л	N или ↑	↓ или N	↓↓	↓↓
Альбумин	35-55 г/л	N	N	↓↓	↓↓

Показатели обмена билирубина

Оценить у пациента состояние обмена билирубина можно на основании биохимического анализа крови, мочи и кала. Свободный билирубин является производной гемоглобина, высвобождающегося в процессе гемолиза эритроцитов. В физиологических условиях каждые сутки гемолизируется примерно 1% циркулирующих эритроцитов, из которых образуется 200-250 мг билирубина. Основная часть билирубина поступает в кровяное русло из клеток системы мононуклеарных фагоцитов селезенки и костного мозга. Билирубин нерастворим в воде, поэтому в крови его перенос осуществляют неспецифические транспортные белки - альбумины. Свободный билирубин является токсичным соединением, способным проникать через гемато-энцефалический барьер, вызывая энцефалопатии. Детоксикация билирубина происходит в клетках печени, где к нему присоединяется глюкуроновая кислота, образуя *глюкурониды билирубина*. Эти соединения уже не токсичны и водорастворимы, что облегчает их выведение из организма в составе желчи. В кишечнике под действием бактериальных ферментов образуются две группы продуктов распада билирубина – *уробилиногены* и *стеркобилиногены*, основная часть которых выводится с калом. В нормальных физиологических условиях почки в выведении билирубина не участвуют.

Билирубин в крови здорового человека содержится в концентрации 1,7 – 17,1 мкмоль/л и представлен двумя фракциями: нерастворимый билирубин, связанный с альбумином – *непрямой билирубин*, и растворимые глюкурониды билирубина – *прямой билирубин*. В норме их соотношение составляет 3 : 1.

При гепатитах повреждаются клетки печени и, вследствие этого, снижается продукция желчи. Кроме того, в результате повреждения паренхимы печени желчь поступает не только в желчные каналцы, но и в кровь. Эти процессы приводят к увеличению общего билирубина крови за счет обоих его фракций. Отмечено, что уже в конце преджелтушного периода у части больных на фоне нормального общего билирубина начинает расти фракция прямого билирубина, что является ранним показателем цитолитических процессов в печени. В моче начинают выявляться билирубин и уробилины, а концентрация стеркобилина в кале резко снижается (таблица 3).

Таблица 3. Соотношение показателей обмена билирубина в норме и при развитии печеночной желтухи.

Показатели	Нормальные значения	Печеночная желтуха
Общий билирубин сыворотки крови	1,7 – 17,1 мкмоль/л	Значительное повышение
Прямой билирубин сыворотки крови	до 3,4 мкмоль/л	Повышение
Непрямой билирубин сыворотки крови	1,7 - 12,7 мкмоль/л	Повышение
Реакция мочи на билирубин и уробилин	Отрицательная	Положительная
Реакция кала на стеркобилин	Положительная	Отрицательная

Следует отметить, что показатели обмена билирубина для диагностики вирусного гепатита играют роль только при развитии желтухи. Безжелтушная форма и преджелтушная фаза вирусных гепатитов в своем большинстве остаются нераспознанными.

При постановке диагноза гепатитов и оценки их тяжести нередко приходится проводить дифференциальную диагностику желтух и определять тип гипербилирубинемии: надпеченочная – за счет непрямого билирубина (гемолитическая); внутripеченочная – за счет снижения конъюгации билирубина в гепатоцитах (паренхиматозная); подпеченочная – холестааз, приводящий к нарушению желчевыделения (обструкционная). Соответствующие изменения биохимических показателей крови приведены в таблице 4.

Таблица 4. Дифференциальная диагностика желтух

Биохимические показатели	Гемолитическая	Паренхиматозная	Обструкционная
АЛТ	N	↑↑	↑
АСТ	N	↑↑	↑
Билирубин общий	↑↑	↑↑	↑↑
Билирубин прямой	N	↑	↑↑
Билирубин непрямой	↑↑	↑	N
ЩФ	N	N или ↑	↑
ГГТ	N	N	↑

Показатели обмена белков

При острых вирусных гепатитах общее содержание белков плазмы крови и их состав практически не изменяются. Исключение представляет тимоловая проба, в норме имеющая значения до 4 ЕД и возрастающая до 6-8 ЕД при гепатитах. При хронизации процесса может возникнуть синдром печеночно-клеточной недостаточности, когда отмечается уменьшение содержания общего белка в крови за счет снижения концентрации альбумина, с возможным переходом в стадию цирроза (таблица 2).

При ХГ на стадии цирроза печени могут наблюдаться уменьшение концентрации общего белка и альбумина в сыворотке крови, снижение протромбинового индекса (менее 70%), уменьшение концентрации других факторов свертывания крови в рамках синдрома печеночно-клеточной недостаточности. Дополнительными показателями активности гепатита являются ускорение СОЭ (более 15 мм/ч), повышение концентрации глобулинов сыворотки.

Выявление серологических маркеров вирусных гепатитов

Установить вирусную природу гепатита и получить информацию об его этиологии возможно только путем выявления серологических маркеров вирусов гепатита. К таким маркерам относят вирусные белки (антигены), специфичные антитела, вырабатываемые организмом в ответ на инфекцию, и нуклеиновые кислоты вируса (ДНК или РНК), представляющие его геном.

Совокупность методов, позволяющих выявлять в биологических тканях и жидкостях специфические вирусные или бактериальные белки (антигены) или антитела, вырабатываемые в организме хозяина в присутствии того или иного возбудителя, относят к иммунологическим методам лабораторного анализа. За последние несколько десятилетий иммунологические методы исследования получили повсеместное распространение. Причиной этого явилось тесное слияние иммунологии и биотехнологии, которое позволило разработать и внедрить в практику широкий спектр тест-систем, основанных на взаимодействии антиген - антитело. Применительно к вирусным гепатитам, иммуноферментный анализ относится к непрямым методам обнаружения возбудителя, позволяющим установить этиологию болезни.

Сравнительно недавно в практику клинико-диагностических лабораторий вошли методы генодиагностики, позволяющие обнаруживать и характеризовать гены или бессмысловые последовательности ДНК и/или РНК. Своим развитием эти методы обязаны разработкой в 1983 г принципа полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первые сообщения по практическому применению ПЦР появились в 1985 г и с тех пор количество публикаций, где ПЦР используется в качестве одного из методов исследования, занимает одно из первых мест в мировой научной литературе. Эти подходы приложимы для обнаружения и исследования геномов инфекционных агентов, обнаружения маркеров онкологических заболеваний, выявления генетических изменений в геноме человека, связанных с теми или иными функциональными нарушениями. В отличие от ИФА, ПЦР-анализ относится к прямым методам обнаружения возбудителя в клиническом материале, что позволяет оценить активность вирусного процесса и проследить процессы распространения возбудителя в различных органах и тканях.

Серодиагностика вирусного гепатита В

Вирус гепатита В (hepatitis B virus, HBV) относится к семейству *Hepadnaviridae*. Геном вируса представлен частично сдвоенной кольцевой молекулой ДНК размером 3200 п.н. При электронной микроскопии HBV выглядит сферической частицей диаметром 42 нм (частица Дейна), состоящей из ядра - нуклеоида, имеющего форму икосаэдра диаметром 28 нм, внутри которого находится двуцепочечная ДНК, концевой белок и фермент ДНК-полимераза. В состав нуклеоидного белка входят HBcAg и HBeAg. Внешняя оболочка (толщиной 7 нм) образована поверхностным антигеном HBV - HBsAg (рис. 2, 3). Вирус гепатита В является псевдоретровирусом, т. е. его ДНК может частично встраиваться в геном гепатоцитов.

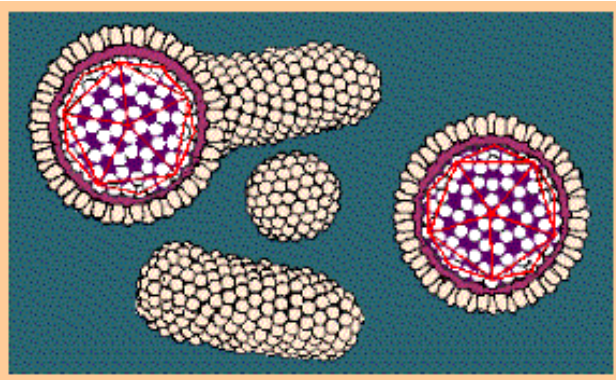


Рис. 2. Схема строения вириона HBV и компонентов поверхностного антигена. Избыточная продукция поверхностного белка (HBsAg) приводит к его нахождению в сыворотке крови больного в свободном виде.

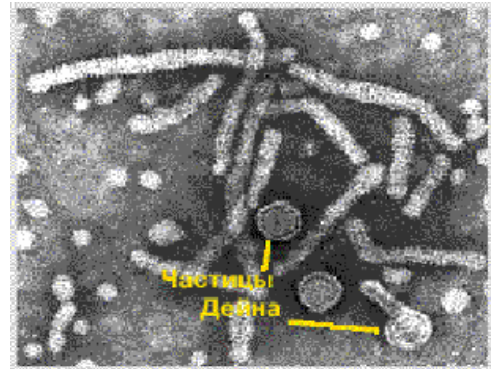


Рис. 3. Частицы Дейна в сыворотке крови больного (электронная микроскопия)

При ОВГ и обострении ХГ вирусные частицы можно обнаружить в гепатоцитах и сыворотке крови больного. При интегративной форме ХГ В и в стадии ремиссии HBV в сыворотке крови не выявляется.

Основой лабораторной диагностики инфекции HBV является определение серологических маркеров инфицирования вирусом: HBsAg, HBeAg, анти-HBc класса IgM и IgG, анти-HBe и анти-HBs, HBV ДНК и активности вирусной ДНК - полимеразы. В зависимости от течения вирусного гепатита В спектр изменения серологических маркеров выглядит по-разному (рис 4, 5).

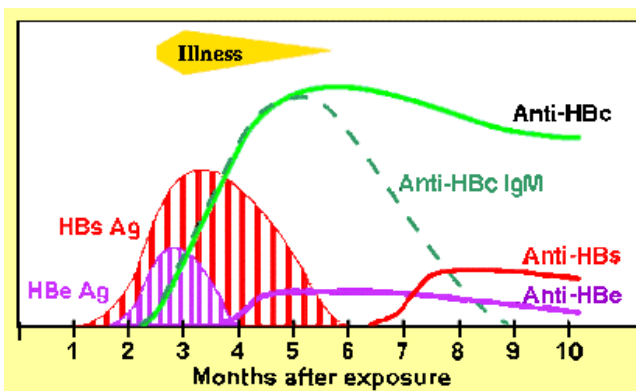


Рис. 4. Спектр изменения серологических маркеров при остром гепатите В со стадией разрешения

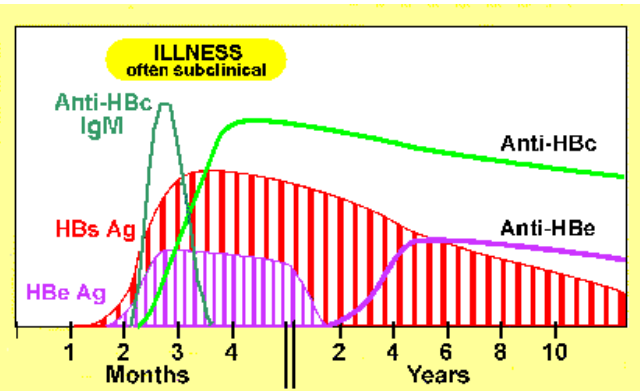


Рис. 5. Спектр изменения серологических маркеров при хронизации острого гепатита В

HBsAg - основной маркер инфицирования HBV. При остром вирусном В в большинстве случаев (90-80 %) HBsAg удается выявить в инкубационном периоде, начиная с 3-5-й недели заражения. Средняя продолжительность циркуляции антигена - 70-80 дней. Быстрое исчезновение HBsAg (в первые дни желтухи) с появлением антиHBs - плохой прогностический признак. При хроническом гепатите В HBsAg может циркулировать в крови больного на протяжении многих лет. Следует отметить, что применяющиеся в настоящее время методы определения HBsAg, в том числе ИФА, имеют порог чувствительности. Поэтому при наличии клинических признаков гепатита и отсутствии HBsAg в сыворотке крови необходимо исследовать другие маркеры инфекции HBV. Наличие HBsAg в крови свидетельствует о присутствии вируса в печени и с большой долей вероятности в крови. Не всякая сыворотка, содержащая HBsAg, содержит вирус гепатита В. В ряде случаев ДНК вируса встраивается в ДНК гепатоцита не полностью, а частично, только тем участком, который кодирует синтез HBsAg. В этих случаях синтезируется HBsAg без других компонентов вириона (то есть без других антигенов). Считают, что такая ситуация возникает при "здоровом" носительстве HBsAg.

HBeAg вируса гепатита В характеризует высокую инфекционность крови, являясь показателем активной репликации HBV. HBeAg циркулирует в крови больного только в присутствии HBsAg. В первую неделю желтушного периода он выявляется у 85-95 % больных. Выявление HBeAg в течение двух и более месяцев служит прогностическим признаком развития хронического гепатита. У большинства больных хроническим гепатитом с высокой активностью процесса HBeAg сохраняется на длительный срок (до нескольких лет).

Антитела к ядерному антигену вируса гепатита В класса М (*анти-НВс IgM*) - маркер активной репликации HBV и острой инфекции. Выявляются через 1-2 недели после обнаружения HBsAg и сохраняются на протяжении 2-18 месяцев. У 4-20 % больных острым гепатитом В анти-НВс IgM являются единственным маркером инфекции. При ХГ В анти-НВс IgM могут быть выявлены у некоторых больных в меньших титрах, чем при острой инфекции, причем титр антител отражает тяжесть гепатита.

Антитела к НВсAg класса G (*анти-НВс IgG*) появляются практически одновременно с анти-НВс IgM. Как правило, они остаются у всех лиц, переболевших гепатитом В, пожизненно. У 95 % носителей HBsAg наряду с НВсAg циркулируют и анти-НВс IgG.

Антитела к НВсAg (*анти-НВс*) свидетельствуют о ранее перенесенной инфекции или о наличии поствакцинального иммунитета (защитный уровень - 10 МЕ/мл). Они появляются в период выздоровления, через 4 недели после исчезновения НВсAg, достигая максимальной концентрации через 1-2 года, с последующим постепенным снижением уровня, недоступного выявлению современными методами диагностики. В некоторых случаях анти-НВс могут циркулировать пожизненно. Появление анти-НВс на фоне клинического улучшения у больного гепатитом В является хорошим прогностическим признаком. Важно отметить, что в динамике острой инфекции HBV имеется "окно", когда НВсAg уже не определяется, а анти-НВс еще не появились. При этом выявляются анти-НВс IgM и IgG. Из этого следует вывод о необходимости обследования больных ОВГ на анти-НВс IgM даже при отрицательных результатах исследования НВсAg и анти-НВс.

Антитела к НВеAg (*анти-НВе*) появляются в крови после элиминации НВеAg и завершения репликации вируса. К концу 9-й недели острого периода гепатита В более 90 % больных имеют анти-НВе. В период выздоровления анти-НВе могут исчезать. Однако, наличие анти-НВе не является показателем отсутствия инфекционности конкретной сыворотки крови. Показано, что у ряда больных в ходе развития гепатита В (около 10%) под влиянием "иммунного давления" на вирус возникают мутантные формы, которые "избегают" иммунного надзора и не элиминируются. У носителей анти-НВе был выделен мутант, неспособный продуцировать НВеAg из-за дефектов в области ргсого и получивший обозначение НВеAg-отрицательного. Появление НВеAg-отрицательного мутанта приводит к прогрессированию поражения печени при продолжающейся репликации вируса (наличие ДНК HBV в сыворотке крови). При первичном инфицировании НВеAg-отрицательным мутантом существенно возрастает риск развития фульминантно-го гепатита.

Описанные маркеры гепатита В исследуются методом ИФА. Спектр антител (анти-НВе, анти-НВс, анти-НВс IgM, анти-НВс IgG) и антигенов (НВсAg, НВеAg) позволяет установить диагноз гепатита В и определить стадию заболевания (таблица 5). Недостатком данного метода является невозможность его использования при заражении мутантными формами вируса, при иммуносупрессии (больные онкологическими заболеваниями, наркоманы и т.д.) и для количественной оценки присутствующего в организме возбудителя. Решение этих задач стало возможным в результате внедрения молекулярно-биологических методов в практику клинико-диагностических лабораторий.

Таблица 5. Различные сочетания серологических маркеров инфицирования вирусом гепатита В и их интерпретация

HBsAg	НВеAg	антиНВс IgM	антиНВс сумм	антиНВе	антиНВс	HBV ДНК	Трактовка результата
+	+	+	+	-	-	+	Острый гепатит В. Дикий штамм
+	-	+	+	-	-	+	Острый гепатит В. Мутантный штамм
+	-	+ /-	+	+	-	- /+	Разрешившийся острый гепатит В. Сероконверсия.
+	+	+ /-	+	- /+	-	+	Хронический активный гепатит В
+/-	- /+	- /+	+	+ /-	-	+/-	Хронический интегративный гепатит В
+	-	-	+	-	- /+	-	"Здоровое" носительство
-	-	-	+	- /+	+	-	Перенесенный вирусный гепатит В
-	-	-	-	-	+	-	Состояние после иммунизации

Методы генодиагностики, к которым относится ПЦР, существенно расширяют возможности лабораторной диагностики вирусного В, позволяя непосредственно выявить возбудитель, установить тканевую и внутриклеточную локализацию HBV, выявить и охарактеризовать мутантные формы вируса, оценить уровень виремии в течение заболевания, в том числе - на фоне противовирусной терапии.

В настоящее время существует широкий спектр диагностических тест-систем для выявления ДНК HBV в лабораторных условиях, основанных на методах ПЦР - фирмы "Roche", НПФ "Литех", "ДНК технология", LCR (лигазная цепная реакция) - фирма "Abbott", bDNA (метод "разветвленных" ДНК зондов) - фирма "Chiron". Эти тест-системы позволяют проводить качественное определение наличия возбудителя в биологическом материале: сыворотке или плазме крови, ткани печени, мононуклеарах. Одним из вариантов качественного определения ДНК HBV является технология ПЦР in situ (в гистологических срезах), позволяющая установить внутриклеточную локализацию вируса в гепатоцитах.

Единственная коммерческая тест-система дифференциальной диагностики HBeAg-отрицательного гепатита В создана фирмой "Abbot" с использованием LCR. Существенным недостатком этой системы является выявление только одной из многих мутаций, приводящих к отсутствию синтеза HBeAg вирусом. Выявление всей совокупности генетических изменений, характерных для HBeAg-отрицательных вирусов гепатита В, возможно пока только прямым секвенированием ПЦР-амплифицированных фрагментов вирусного генома.

Количественная характеристика содержания ДНК HBV в клинических образцах важна для оценки эффективности противовирусной терапии и имеет прогностическое значение для определения хронизации HBV. При исходно низком уровне виремии (ДНК HBV менее 500 фг/мкл) процент хронизации острого гепатита В близок к нулю, при концентрации HBV ДНК от 500 до 2000 фг/мкл хронизация процесса наблюдается у 25-30% больных, а при высоком уровне виремии у пациента (более 2000 фг/мкл) острый гепатит В чаще всего переходит в хронический.

Известные коммерческие тест-системы оценки концентрации ДНК HBV реализуют принцип конкурентного ПЦР-анализа с последующей гибридизационной схемой определения продуктов амплификации (фирма "Roche", НПФ "Литех"). Этот подход основан на внесении в клинический образец внутреннего стандарта известной концентрации, качественно отличающегося от определяемой матрицы. После ПЦР концентрация ДНК HBV в исследуемом материале рассчитывается на основании известной концентрации внутреннего стандарта и соотношения накопления продуктов амплификации внутреннего стандарта и определяемой матрицы.

В настоящий момент развитие методов лабораторной диагностики гепатита В идет по направлению создания коммерческих тест-систем для идентификации клинически значимых мутантных штаммов HBV, а также использованию новых оптических приборов (биосенсоров) для комплексной диагностики инфекции HBV (вирусных белков, антител к ним и ДНК HBV)

Серодиагностика гепатита С

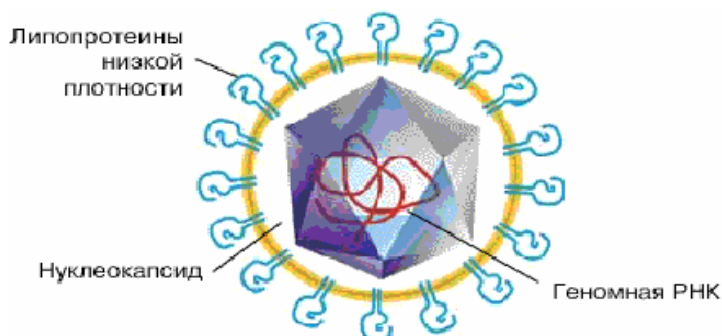
Вирус гепатита С (hepatitis C virus, HCV) является РНК содержащим гепатотропным и лимфотропным вирусом, относящимся к семейству Flaviviridae. Геном вируса представлен одноцепочечной молекулой (+) РНК размером около 9500 оснований, кодирующей структурные и неструктурные белки (рис. 6).

Рис. 6. Схема геномной РНК HCV и синтеза вирусных белков



К структурным белкам относят белок сердцевин (кор) и гликопротеины оболочки (Е1 и Е2). Неструктурную область представляет комплекс белков с ферментативной активностью, в первую очередь РНК-зависимая – РНК полимеразы. Помимо вирусных белков, снаружи вирион покрыт липидной оболочкой состоящей из липопротеинов низкой плотности организма хозяина (рис. 7).

Рис. 7. Схема строения вириона вируса гепатита С.



До 1990 г. ХГ ни-А-ни-В с парентеральным путем передачи диагностировали на основании повышенной активности АЛТ сыворотки в течение 6 месяцев, при отсутствии других известных маркеров вирусных гепатитов. Однако у части больных ХГ С уровень АЛТ не повышается. В современной диагностике гепатита С основная роль отводится определению антител к HCV и выявлению РНК HCV.

В отличие от гепатита В, при котором могут быть определены антигены вируса и антитела к ним, при гепатите С методом ИФА улавливаются только антитела. Антигены HCV, если и попадают в кровь, то в количествах, которые практически не улавливаются. Они могут быть обнаружены только в ткани печени при использовании иммуногистохимических методов исследования. Это существенно ограничивает возможность оценки течения и активности инфекционного процесса.

Анти-HCV не свидетельствуют о продолжающейся репликации вируса, и могут являться признаком как текущей, так и перенесенной инфекции. Приходится также учитывать, что у реципиентов, которым была перелита инфицированная кровь, могут обнаруживаться анти-HCV донора, не обязательно свидетельствующие о заражении HCV. У больных ХГ С анти-HCV обнаруживаются в крови не только в свободной форме, но и в составе циркулирующих иммунных комплексов.

Антитела образуются к каждому из вирусных белков, расположенных в структурной и неструктурной области вирусного генома. Этим определяется их различная специфичность и, соответственно, разная диагностическая информативность. Для скрининга гепатита С используют метод ИФА, а в качестве подтверждающего теста - метод иммуноблота (RIBA). Существует несколько поколений диагностических тест-систем для выявления анти-HCV, отличающихся своей чувствительностью и специфичностью (таблица 6).

Таблица 6. Сравнение разных поколений диагностических иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВГС.

Тест-система	Шифр фрагментов	Белок, содержащий данный фрагмент	Эффективность
1 поколение	C100-3	NS3 и NS4	до 82,2%
2 поколение	C100-3, C22, C33с	NS4, кор, NS3	до 97,5%
3 поколение	C100-3, C22, C33с, NS5	NS4, кор, NS3, NS5	до 99,7%
4 поколение*	C100-3, C22, C33с, NS5	NS4, кор, NS3, NS5	до 99,7%
RIBA-3	C100-3, C22, C33с, NS5, е1, е2	NS4, кор, NS3, NS5, E1, E2	до 99,6%

*Тест-системы 4-го поколения содержат синтетические и рекомбинантные вирусные антигены, размеры которых могут отличаться от фрагментов 3-го поколения.

Первая диагностическая тест-система на основе определения антител к С-100-3 была разработана в 1989 году в лаборатории М. Houghton и быстро получила повсеместное распространение. Она позволяла улавливать антитела в зоне, характеризующей всего 12% вирусного белка в неструктурной области (NS3, NS4). Кроме того, искусственный рекомбинантный антиген С-100-3 не полностью совпадает с натуральными вирусными белками, что предопределяет его слабую иммуногенность. Антитела к С-протеину (кор Ag) с помощью антигена С-100-3 вообще не улавливаются. Это предопределило низкую специфичность определения анти-HCV и большое число ложноотрицательных результатов, особенно при ХГ С. У больных с выраженной гипергаммаглобулинемией наоборот, тест С-100-3 часто является ложноположительным.

Тест-системы 2-го поколения, возникшие в 1991 году, позволяют улавливать антитела к белкам в разных зонах генома не только неструктурной, но и структурной области. Их преимуществом явилась, прежде всего, высокая специфичность, а также возможность более полного представительства спектра

антигенов HCV. Использование тест-систем 2-го поколения позволило существенно улучшить отбор доноров и уменьшить угрозу развития посттрансфузионного гепатита С.

При использовании тест-систем 2-го поколения также не исключены ложноотрицательные результаты, в частности, у больных с необычными для данного региона генотипами HCV. Наиболее совершенны тест-системы 3-го и 4-го поколения, используемые в клинической практике начиная с 1995 года.

Тест-системы 3-го и 4-го поколения позволяют выявить анти-HCV в 99,7% случаев. В некоторых случаях антитела к HCV могут не обнаруживаться, например, при запаздывании иммунного ответа, применении иммуносупрессивной терапии или иммуносупрессии на фоне онкологического заболевания, приема наркотических веществ и т.д. Очень редко наблюдаются ложноположительные результаты. Для их исключения сомнительные сыворотки анализируют в RIBA или INNO LIA тестах, которые выявляют антитела к каждому отдельному белку HCV.

Установление диагноза гепатита С и наблюдения за больными часто бывают затруднены при использовании только классических методов лабораторной диагностики. Это связано с особенностями протекания инфекции HCV, в течение которой могут наблюдаться: бессимптомное течение начальных стадий заболевания; низкий, часто нормальный уровень АЛТ; позднее появление антител (до 2-х лет от начала заболевания); отсутствие надежной тест-системы для выявления вирусных белков.

Генодиагностика гепатита С

Ведущую позицию в лабораторной диагностике инфекции HCV занимают методы генодиагностики, позволяя: непосредственно выявить генетический материал вируса в сыворотке крови и тканях человеческого организма (моноклеарах, гепатоцитах, ткани костного мозга и т.д.); оценить репликативную активность вируса в тканях; количественно определить концентрацию вируса в сыворотке крови; установить генотип вируса и вести наблюдение за изменчивостью HCV.

Обнаружение в сыворотке крови РНК HCV является “золотым стандартом” диагностики, свидетельствующем о продолжающейся репликации HCV. По рекомендации ВОЗ установление диагноза гепатита С возможно на основании трехкратного обнаружения HCV РНК в сыворотке крови больного при отсутствии других маркеров гепатита. В острую фазу гепатита РНК выявляется в крови уже через 1-2 недели после заражения, т.е. задолго до появления анти-HCV.

При всей неоднородности популяции HCV, все генетические варианты вируса имеют консервативный участок в 5'-нетранслируемой области генома, на обнаружении, которого основаны большинство известных диагностических тест-систем для выявления РНК HCV. До недавнего времени самым чувствительным тестом при определении РНК HCV считался тест Amplicor HCV фирмы “Roche”, позволяющий выявлять 700 копий РНК в 1 мл. С помощью нового набора Abbott LCx можно определять 200 копий РНК/мл. Менее чувствительным, но широко распространенным в настоящее время является тест bDNA Quantiplex (фирма “Chiron”).

Отечественные тест-системы основаны на определении РНК HCV в клиническом образце методом RT-PCR с использованием в качестве мишени амплификации консервативной 5' нетранслируемой области вирусного генома (НПФ “Литех”, НПФ “ДНК-технология”).

Проведение ПЦР позволяет выявить РНК HCV не только в сыворотке крови, но и в ткани печени, что важно в подтверждении роли HCV в формировании гепатоцеллюлярной карциномы. У данной категории больных РНК HCV регистрируется в гепатоцитах и при отсутствии анти-HCV и HCV РНК в сыворотке крови.

Отличительной особенностью течения инфекции HCV является развитие многочисленных внепеченочных проявлений, что требует наблюдения за распространением вируса в организме. Методом ПЦР РНК HCV определяется в моноклеарах крови, криопреципитатах, ткани клеточного мозга, биопсии печени и мышечной ткани.

Существует методологический подход, позволяющий не просто определять наличие вируса в ткани, но и оценивать его репликативную активность – реакция на (-) цепь РНК.

При наблюдении за больными ХГ С существенную роль играют количественная оценка содержания вируса в сыворотке или плазме крови больного и определение генотипа HCV. Наиболее благоприятный ответ на противовирусное лечение наблюдается у лиц с низким уровнем виремии и генотипом 2 или 3.

В основе известных диагностических тест-систем количественной оценки содержания HCV лежит подход, основанный на принципе конкурентной амплификации РНК HCV и внутреннего стандарта. В первую очередь это диагностикумы “Amplicor HCV monitor kit” фирмы “Roche” и “NASBA HCV” (“Organon”). Количественные тест-системы фирмы “Chiron” bDNA Quantiplex, которые позволяют непосредственно оценить концентрацию матрицы в образце по интенсивности регистрируемого сигнала. Эти тест-системы

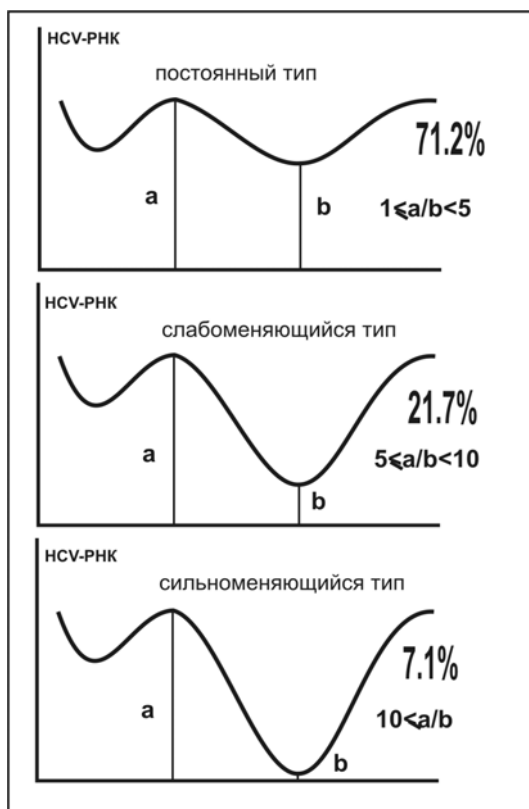
отличаются надежностью, лучшей воспроизводимостью, но более низким уровнем чувствительности, по сравнению с амплификационными. Сотрудниками фирм Gen-Probe и Bayer Diagnostics опубликованы результаты количественного определения РНК HCV методом TMA (transcription-mediated amplification) с очень низким порогом чувствительности - 50 eq/ml.

Большинство отечественных лабораторий для оценки концентрации РНК HCV используют метод предельных разведений. В основе его лежит разбавление анализируемой матрицы до исчезающих концентраций и вычисление исходной концентрации на основании результатов амплификации в сравнении с калибровочной кривой. К сожалению, этот метод не достаточно точен, так как не учитывает возможность подавления реакции амплификации в пробирке с исследуемым образцом. Тем не менее, метод достаточно прост в исполнении и до сих пор используется в ряде лабораторий для "внутреннего пользования" (in house).

В клиничко-диагностической лаборатории ООО НПФ "Литех" используется полуавтоматическая система регистрации продуктов амплификации путем прямой твердофазной гибридизации с флуоресцеин-меченым зондом. Использование высокочувствительного флуориметра фирмы "Labsystems" Fluoroskan Ascent позволяет проводить детекцию связавшегося со специфической матрицей зонда непосредственно после стадии гибридизации. Интенсивность сигнала в этом случае отражает концентрацию ампликона в анализируемой пробе. Подобранный система "гнездовой" амплификации позволяет максимально эффективно дискриминировать образцы с различной концентрацией РНК ВГС в клинически значимом диапазоне низко- (менее 30000 eq/ml) средне- (от 30000 до 100000 eq/ml) и высокотитражных (более 100000 eq/ml) сывороток.

Вопрос об информативности количественной оценки вирусной нагрузки при мониторинге HCV инфекции остается дискуссионным. Примерно равное число клинических школ придерживаются диаметрально противоположных точек зрения на вопрос о необходимости количественного мониторинга при HCV-инфекции. Известны исследования, демонстрирующие достоверную корреляцию уровня виремии пациента с уровнем тканевых трансаминаз и тяжестью течения заболевания (1994-1998 гг). В более поздних работах (2000-2001 гг) существование зависимости между концентрацией и гистологической активностью вируса отвергается. Многочисленные эпидемиологические исследования, проведенные в Америке, Японии, странах Западной Европы и Африки, показали, что концентрация HCV РНК в сыворотке крови HCV-инфицированных пациентов не постоянна. Всех обследованных можно условно разделить на три подгруппы по степени флюктуации уровня виремии (рис. 8).

Рис. 8. Характерные варианты изменения концентрации HCV РНК у пациентов с вирусным гепатитом С.

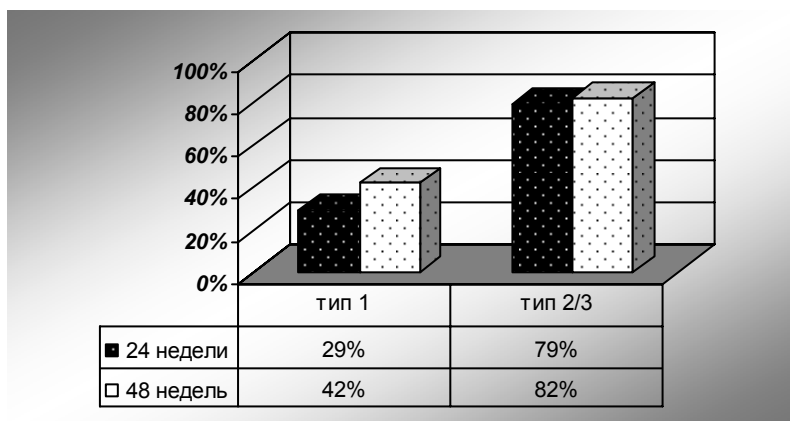


- 1 - постоянный тип
- 2- слабоменяющийся тип
- 3- сильноменяющийся тип

Наиболее многочисленную группу (71,2%) составляют пациенты “постоянного” типа, у которых соотношение максимальной и минимальной концентрации HCV РНК, регистрируемых в ходе мониторинга, не превышает 5, 21,7% - “слабоменяющийся” тип с соотношением максимума и минимума от 5 до 10 и 7,1% - “сильноменяющийся” тип (макс/мин >10). Существуют данные, что уровень HCV РНК более стабилен в группе больных с нормальным уровнем АЛТ, чем у больных с ярко выраженной биохимической активностью. Рядом исследователей обсуждается предположение, что именно “постоянный” тип уровня вирусемии у пациента является хорошим прогностическим признаком эффективного ответа на интерферонотерапию. Учитывая природные колебания концентрации HCV РНК, следует отметить низкую информативность единичного определения титра HCV. Более того, сомнительными оказываются и данные мониторинга на фоне интерферонотерапии. Тем не менее, большинство авторов сходятся на том, что пациенты, исходно, при первичном обследовании, имеющие низкий уровень вирусемии (менее 30000 eq/ml (или 5 МЕ/ml)) имеют больше шансов на успех при последующей интерферонотерапии.

Более достоверным прогностическим фактором развития HCV инфекции и ответа на противовирусную терапию является генотип ВГС. Достоверно показано, что пациенты, инфицированные 1ым типом вируса более толерантны к интерферонотерапии, чем все другие генотипы. По данным профессора Esterban (Испания) процент стойкой ремиссии на проводимую комплексную терапию PEG-интроном и рибавирином составил в группе пациентов с 1 типом вируса 42% и 82% в группе с типами 2 или 3 (рис. 9). Более того, генотипом вируса определяется и продолжительность курса лечения, что весьма актуально, учитывая широкий спектр побочных действий интерферона и низкую переносимость этого препарата больными.

Рис 9. Влияние генотипа HCV на успех комплексной противовирусной терапии. Приведены процентные соотношения пациентов, у которых наблюдалась стойкая вирусологическая ремиссия.



Существенной особенностью характеристики HCV является его генетическая неоднородность, соответствующая особенно быстрой замещаемости нуклеотидов. В результате образуется большое число разных генотипов и субтипов. По классификации Simmonds разграничивают 11 типов (генотипы 1-11), в свою очередь подразделяющихся на 70 подтипов (например, подтипы 1a, 1b, 1c) HCV. Особенно много субтипов HCV регистрируется в Африке и Юго-Восточной Азии. Это косвенно подтверждает существование HCV в этих регионах уже в течение нескольких столетий. Допускают, что в Европе и Северной Америке HCV появился позже, чему и соответствует существенно меньшее число субтипов. Для клинической практики достаточно разграничивать 5 субтипов HCV: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a. Установлены географические различия в распространении разных генотипов. Так, в Японии, на Тайване, частично в Китае, регистрируются преимущественно генотипы 1b, 2a, 2b. Тип 1b даже называют “японским”. В США преобладает 1a - “американский” генотип. В Европейских странах преобладает генотип HCV 1a, в Южной Европе заметно возрастает доля генотипа 1b. На территории Российской Федерации преобладающим генотипом является 1b, далее с убывающей частотой - 3a, 1a, 2a .

Обычным методологическим подходом для типирования HCV является обнаружение характерных генетических изменений (мутаций) в консервативных областях вирусного генома – 5' нетранслируемой, Кор, NS5A областях. Типирование HCV представляет собой амплификацию консервативных областей вирусного генома и анализ специфичных нуклеотидных последовательностей методами:

- прямого секвенирования амплифицированных фрагментов
- последующей ПЦП с типоспецифичными праймерами
- RFLP (анализ амплифицированных фрагментов с помощью ферментов рестрикции)
- обратной гибридизации с типоспецифичными зондами (LiPA)
- SSCP (анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК)

Для установления генотипа HCV создана коммерческая тест-система InnoLiPA HCV (“Innogenetics”), в основе которой лежит принцип обратной гибридизации с типоспецифичными зондами (рис. 10).

В ряде крупных диагностических центров типирование HCV проводят по оригинальным методикам, используя ПЦР с типоспецифичными праймерами, рестриктазный анализ фрагментов ДНК (RFLP), или конформационный анализ одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) (рис. 11).

Рис. 10. Установление генотипа вируса гепатита С с использованием тест-системы “InnoLiPA HCV”

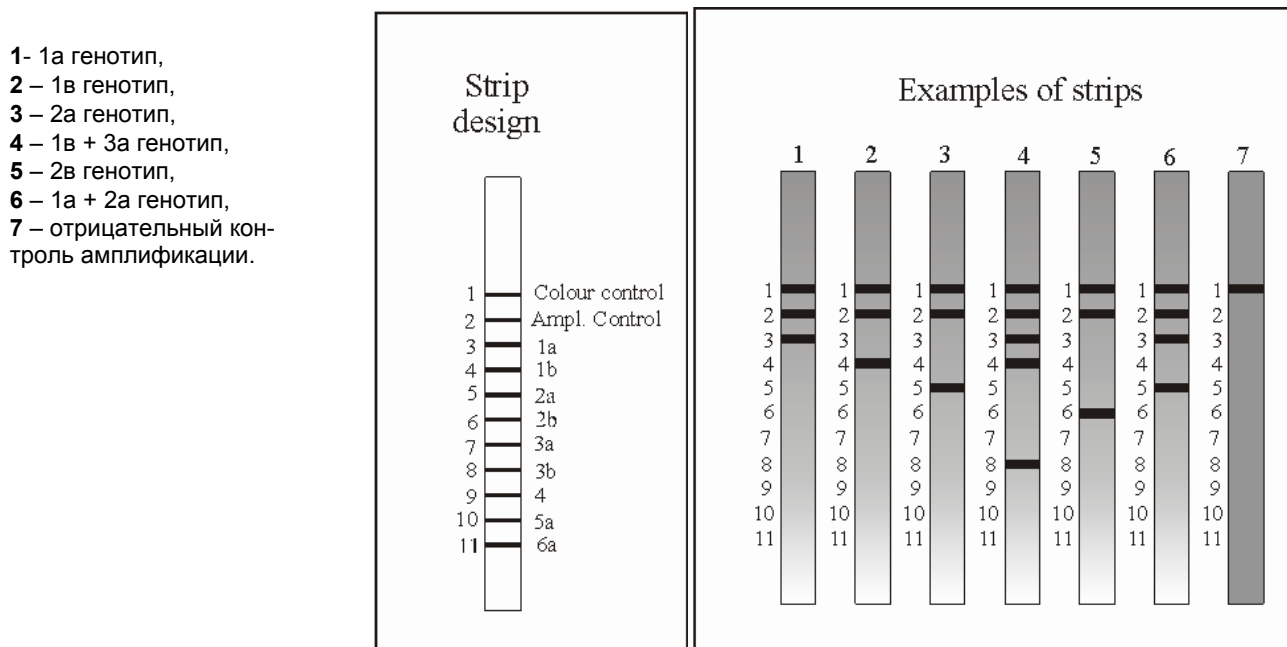
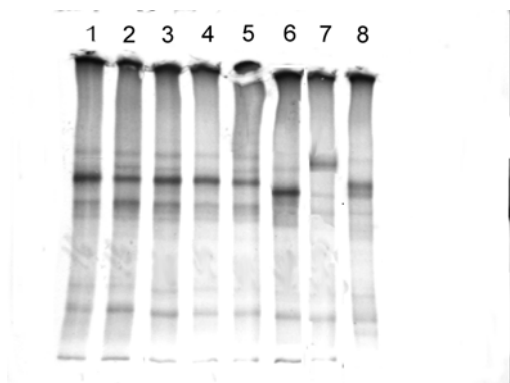
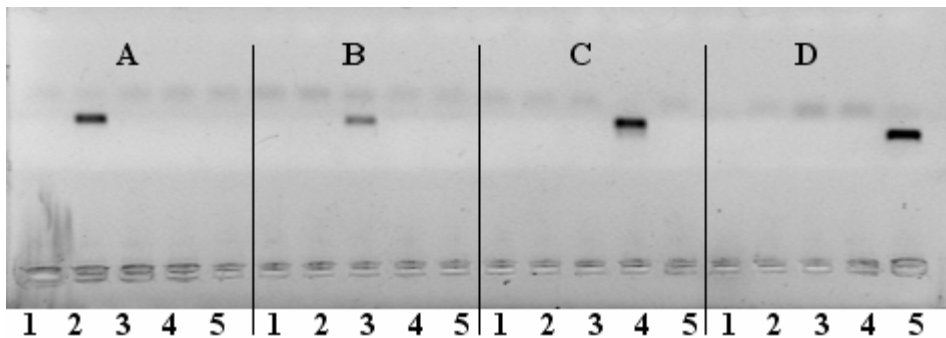


Рис 11. Генотипирование HCV РНК методом SSCP анализа:



В клиничко-диагностической лаборатории ООО НПФ “Литех” создана оригинальная система генотипирования ВГС, позволяющая дискриминировать четыре основных, клинически значимых генотипа ВГС, встречающихся на территории РФ, методом аллель-специфичной амплификации. Дизайн олигонуклеотидных праймеров позволяет выявлять характерные для определенного генотипа нуклеотидные последовательности наиболее консервативной 5’ нетранспируемой области вирусного генома. Подобраны оптимальные условия проведения аллель-специфичной амплификации, исключая возможность перекрестной реакции между кДНК различных генотипов вируса (рис 12).

Рис 12. Подтверждение специфичности работы предложенной системы праймеров для генотипирования РНК ВГС.

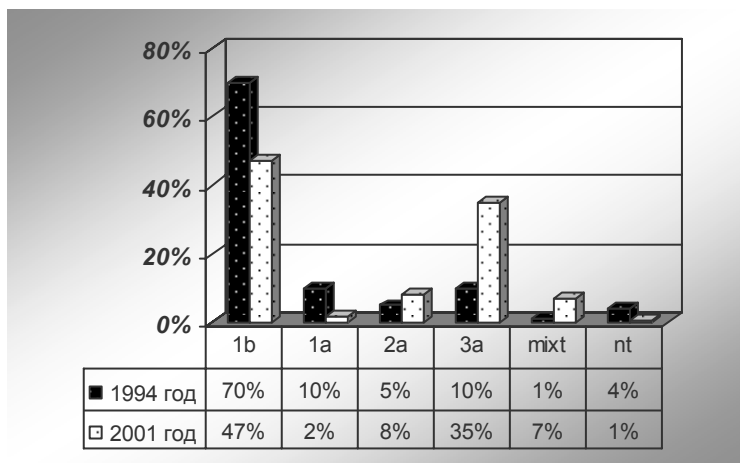


Образцы:
 1 - отрицательный контроль,
 2 - РНК ВГС 1в генотипа,
 3 - РНК ВГС 1а генотипа,
 4 - РНК ВГС 2а генотипа,
 5 - РНК ВГС 3а генотипа.

A: амплификация с типоспецифичным праймером HC1b
 B: амплификация с типоспецифичным праймером HC1a
 C: амплификация с типоспецифичным праймером HC2a
 D: амплификация с типоспецифичным праймером HC3a

Проведена клиническая апробация предложенного метода типирования на группе больных вирусным гепатитом С (481 пациент). Среди них HCV генотип "1в" был выявлен у 227 (47,4%) больных, "1а" – у 9 (1,8%), "2а" – у 39 (8%), "3а" – у 168 (35%), микст – у 34 (7%) и у 4 (0,8%) пациентов генотип вируса установить не удалось. Долгое время основным источником информации о распространенности различных генотипов HCV на территории РФ служили данные, полученные в Институте вирусологии им. Ивановского в 1994 году при проведении обширного мультицентрового исследования. В целом по России преобладающим был генотип 1в (70% популяции), с равной вероятностью выявлялись генотипы 1а и 3а (по 10%), у 5% обследованных был выявлен генотип 2а, 1% - микст инфекция и 4% - нетипируемые формы вируса. Эпидемиологическая картина распространенности различных генотипов HCV в Москве не отличалась от таковой по стране в целом. Данные, полученные в ООО НПФ "Литех" свидетельствуют об изменении за прошедшие 7 лет эпидемиологической ситуации среди HCV-инфицированных жителей Москвы. Достоверно снизился процент пациентов, инфицированных 1ым типом вируса (1в и 1а), при этом существенно возрасла доля пациентов, инфицированных 3а генотипом HCV и имеющих микст-инфекцию (рис. 13).

Рис. 13. Сравнение распределения генотипов ВГС среди ВГС РНК позитивных пациентов г. Москвы (данные ООО НПФ "Литех", 2001 год, и НИИ вирусологии им. Ивановского, 1994 год)



Важно отметить, что спектр выявляемых генотипов ВГС остался без изменений. Аналогичные тенденции прослеживаются в большинстве других странах, где проводились эпидемиологические исследования с разницей во времени от 3 до 7 лет. Изменяются процентные соотношения между различными генотипами вируса, но сохраняются географические отличия в спектре представленных генотипов, уже неоднократно описанные разными группами исследователей.

Отдельно следует оговорить приводимые проценты выявления микст инфекции. В зависимости от выбранной системы типирования частота обнаружения более одного генотипа в клиническом образце изменяется. Относительно высокий процент микст инфекций выявляется при использовании амплификационных методов типирования, в частности системы праймеров, предложенных Okamoto (до 28%), реже

при использовании типоспецифичной гибридизации (тест-система “InnoLiPA HCV”) и метода ELISA. Тогда как при непосредственном секвенировании геномной РНК вируса смешанные формы инфекции обычно не удается зарегистрировать. В ходе клинической апробации разработанной системы типирования генома HCV методом аллельспецифической амплификации микст инфекция была выявлена у 7% пациентов, что сопоставимо с частотой обнаружения микст инфекции при использовании коммерческой тест системы “InnoLiPA HCV” – от 3% до 9,8% в разных исследованиях.

Кроме “территориальной” неоднородности, установлено, что популяция HCV не однородна у каждого пациента. HCV циркулирует в организме человека в виде гетерогенной смеси близкородственных мутантных штаммов, принадлежащих к одному генотипу вируса, но имеющих генетические отличия в вариабельных областях вирусного генома. Генетически отличающиеся друг от друга варианты ВГС, циркулирующие в организме одного хозяина, получили название “квазивидов”.

Исключительной нестабильностью характеризуется регион E2/NS1, содержащий всего 80 нуклеотидов и получивший название гипервариабельного региона (HVR1). Предполагают, что именно антитела к белкам, кодируемым участком генома E2/NS1, обладают вируснейтрализующими свойствами. Исключительная нестабильностью HVR1 региона приводит к тому, что вирусу удается изменить свою антигенную структуру, в связи с чем иммунокомпетентные клетки не в состоянии распознать непрерывно обновляющиеся антигены.

С наличием “квазивидов” связывают феномен ускользания вируса от иммунного ответа, неэффективное удаление HCV, и, как следствие, его длительное сохранение в организме человека и высокий процент хронизации инфекции. Оценку гетерогенности индивидуальной популяции HCV принято проводить на основании регистрации числа генетических вариантов HVR1 вирусного генома методами гетеродуплексного анализа или SSCP. По данным некоторых зарубежных исследователей, высокий уровень гетерогенности индивидуальной популяции HCV по HVR локусу обуславливает более тяжелое течение ХГС с волнообразным характером колебания уровня тканевых трансаминаз и толерантностью к противовирусной терапии.

Собственные исследования, проведенные на базе НИИ Физико-химической медицины показали, что регистрация генетических изменений популяции HCV при остром гепатите С не имеет прогностической значимости, как и в ряде случаев ХГС. Таким образом, приходится рассматривать генетическую гетерогенность как адаптивную реакцию вируса, живущего в изменяющихся условиях организма хозяина, что подтверждается различиями в субпопуляциях HCV гепатоцитов, мононуклеаров и сыворотки крови человека. Кроме того, наблюдаемая в динамике генетическая изменчивость индивидуальной популяции HCV, наряду с изменением концентрации вируса в сыворотке крови больного, может служить косвенным маркером активности репликативного процесса, происходящего в клетках печени.

Лабораторная диагностика гепатита С развивается по пути создания новых, более совершенных тест-систем. Ortho Clinic Diagnostic начала выпуск нового иммуноферментного набора для определения кор антигена в крови. Первым этапом является освобождение антигенов из клеточных структур путем лизирования сыворотки, вторым - улавливание антигенов с помощью специфических моноклональных антител. Данный тест особенно удобен при выявлении ранней стадии инфекции HCV, когда еще не появились вирус-специфические антитела. Фирмы Chiron и Gen-Probe предлагают новый амплификационный тест – NAT assay – для выявления РНК как HCV, так и HIV, способный улавливать единичные копии вируса в анализируемом материале.

В заключении следует упомянуть о необходимости комплексного обследования больного с привлечением новейших достижений медицинской и биологической науки для правильной диагностики вирусных гепатитов и назначения адекватной терапии больному.

Лечение

Внедрение препаратов интерферона альфа (ИФНа) в клиническую практику в середине 80-х гг. открыло новую эру в лечении ХВЗП, позволив проводить этиотропную терапию этих болезней. В настоящее время препараты ИФНа являются самыми распространенными и наиболее изученными противовирусными агентами, применяемыми в лечении ХВЗП. ИФНа - цитокин, вырабатываемый мононуклеарами и трансформированными В-клетками в ответ на вирусную или антигенную стимуляцию, обладающий противовирусной и менее выраженной иммуномодулирующей активностью. Среди более чем 20 подтипов ИФНа наиболее биологически значим альфа-2, рекомбинантными аналогами которого являются препараты Роферонт (α2a), F.HOFFMAN-LaROCHE, Швейцария) и Интрон-АТ (α2b), SCHERING-PLOUGH, США), а также отечественный Реаферонт. В клинической практике широко используются также смеси различных подтипов ИФНа, представленные на российском рынке лейкоцитарным интерфероном (РФ). Все импортные препараты сравнимы по эффективности в лечении ХВЗП, но наибольший опыт примене-

ния в России нашли схемы лечения с использованием Интрона А, который, кроме того, несколько дешевле Роферона. Оценка эффективности отечественных препаратов в слепых рандомизированных плацебо-контролируемых клинических испытаниях не проводилась.

Перспективным представляется внедрение в клиническую практику пролонгированных (пегилированных) препаратов рекомбинантных ИФНа, фармакокинетика которых позволяет вводить их 1 р/неделю. В России в настоящее время проводится регистрация препаратов Пег-Инtron® (SCHERING-PLOUGH, США) и Пегасис® (F.HOFFMAN-LaROCHE, Швейцария). За счет конъюгации молекулы ИФНа и молекулы полиэтиленгликоля, имеющего линейную структуру с молекулярной массой 12кДа (Пег-Инtron), или ветвистую структуру с молекулярной массой 40кДа (Пегасис), достигается увеличение периода полувыведения ИФНа, что приводит к увеличению эффективности лечения.

Вся суточная доза ИФНа вводится п/к или в/м однократно. Наиболее типичным ранним побочным эффектом ИФНа является гриппоподобный синдром, особенно интенсивный после 1-2 инъекции. При продолжении лечения выраженность лихорадки, миалгий ослабевает, однако могут сохраняться раздражительность, тревожность, снижение фона настроения, субфебрилитет, диспепсия. Обычно имеет место дозо-зависимое угнетение гемопоза, проявляющееся снижением числа нейтрофильных лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови. При уменьшении числа лейкоцитов менее 1,5 тыс., нейтрофилов менее 750 и тромбоцитов менее 50 тыс. дозу препарата рекомендуется уменьшать вдвое, а при дальнейшем снижении указанных показателей лечение необходимо прервать. К более редким побочным эффектам относятся тяжелые депрессии, психозы, выпадение волос, обратимое после отмены препарата, бактериальные инфекции и индукция аутоиммунных болезней. В качестве казуистических описаны суицидальные попытки, нейропатия зрительного нерва.

Противопоказаниями к назначению ИФНа являются психические заболевания, судорожный синдром, декомпенсированный цирроз печени, тяжелые заболевания сердечно-сосудистой системы, декомпенсированный сахарный диабет, аутоиммунные болезни, особенно тиреозит.

До начала лечения необходимо установить наличие вирусной репликации, оценить функцию щитовидной железы, почек, сердечно-сосудистой системы, а также провести биопсию печени с полуколичественной оценкой признаков активности и фиброза. Больным ХГ С необходимо исследовать количественное содержание (уровень вiremии) и генотип вируса. Наблюдение в процессе лечения ИФНа включает регулярное исследование общего анализа крови, числа тромбоцитов, АЛТ, АСТ, ГГТ, уровня ТТГ (на 6-м, 12-м мес. и через 6 мес. после окончания лечения), а у больных циррозом - альбумина, билирубина и протромбинового времени (каждые 2 - 4 нед.).

Целью лечения больных ХВЗП является увеличение продолжительности и улучшение качества жизни пациентов. Это достигается при прекращении репликации вирусов, исчезновении HBeAg из сыворотки крови больных, сопровождающемся появлением HBeAb (сероконверсия), нормализации показателей сывороточных аминотрансфераз, уменьшении гистологических признаков активности и фиброза. В зависимости от динамики этих показателей различают "вирусологический", "биохимический" и "гистологический" ответ на лечение. В зависимости от сроков наблюдаемого улучшения оценивают ранний (через 1-3 мес. после начала лечения), непосредственный (по окончании лечения), стойкий (через 6 мес. по окончании лечения) и длительный (более 12 мес. по окончании лечения) ответ.

До 1998г. единственным одобренным международными экспертами препаратом, применявшимся для лечения ХГ В являлся ИФНа, рекомендованный в дозах 5 млн. МЕ е/д или 10 млн. МЕ ч/д в течение 4-х-6-ти мес. Такая схема лечения позволяет достичь стойкой ремиссии у трети больных HBeAg-положительным и у 15-20% больных анти-HBe-положительным ХГ. В процессе лечения больных HBeAg-положительным ХГ обычно отмечается обострение болезни ("цитолитический криз"), проявляющийся значительным увеличением активности АЛТ, АСТ, а в ряде случаев - декомпенсацией болезни, что ограничивает использование ИФНа при циррозе. Нецелесообразно лечение ИФНа носителей HBeAg с нормальными показателями АТ, а также больных, получающих иммуносупрессивное лечение. Факторы, увеличивающие вероятность ответа на лечение ИФНа: высокие лабораторные и морфологические показатели активности гепатита, низкий уровень вiremии, небольшая длительность болезни. Если после 4-6 мес. терапии в сыворотке крови сохраняется ДНК HBV лечение целесообразно продлить, что увеличит вероятность достижения стойкого ответа.

В настоящее время в лечении больных ХГ В изучается возможность использования нуклеозидных аналогов, наиболее изученным из которых является ламивудин (ЗеффиксТ, GLAXOSMITHKLINE, Великобритания). Основным механизмом действия ламивудина считается подавление синтеза РНК-зависимой ДНК полимеразы HBV. Ламивудин принимается ежедневно однократно в дозе 100 мг внутрь вне связи с приемом пищи и даже при длительном применении не вызывает существенных побочных эффектов. Назначение препарата в течение 12 мес. приводит к быстрому снижению уровня ДНК HBV, нормализации АТ в 70% и достижению стойкого ответа в 15-20% случаев. Это сопровождается улучше-

нием гистологической картины в печени и замедлением прогрессирования болезни. Увеличение длительности лечения приводит к увеличению частоты развития стойкого ответа. Имеется опыт эффективного и безопасного использования ламивудина у больных декомпенсированным циррозом печени. Ламивудин может применяться в качестве монотерапии, однако после его отмены наблюдается высокая частота рецидивов заболевания (серореверсия). Возможен феномен рикошета, приводящий к тяжелым обострениям болезни после отмены ламивудина. Сочетание ламивудина с ИФНа увеличивает эффективность лечения и представляется наиболее целесообразным в связи с принципиально различными механизмами противовирусного действия этих препаратов.

Основной проблемой, ставящей под сомнение перспективность использования аналогов нуклеозидов в качестве монотерапии вирусных гепатитов, является развитие устойчивости к препаратам. К году лечения у 15-25% больных наблюдается селекция устойчивых к ламивудину штаммов HBV (YMDD-мутантов), вероятность их появления нарастает с увеличением длительности лечения. Этот процесс, как правило, сопровождается увеличением активности АТ до уровня ниже исходного и не требует отмены лечения. Существуют данные, что подобное обострение в течение болезни является хорошим прогностическим признаком развития сероконверсии. Уровень виремии у таких больных ниже, чем был до лечения, а отдаленные результаты сравнимы с таковыми у больных, инфицированных “диким” (немутантным) типом HBV. Для преодоления устойчивости перспективным является сочетание ламивудина с другими нуклеозидными аналогами (лобукавиром, адефовиром), проходящими в настоящее время III фазу клинических испытаний.

Лечение ХГ D является наиболее трудным, хотя и абсолютно необходимо из-за неблагоприятного прогноза болезни. Единственным эффективным препаратом является ИФНа, назначаемый в дозах 9-10 млн. МЕ 3р/нед. или ч/д п/к или в/м сроком не менее 12 мес. Улучшение биохимических показателей и гистологической картины достигается при таком лечении у 30-50% больных, что сопровождается “вирусологическим” ответом. Однако прекращение лечения ведет к рецидиву в большинстве случаев. Стойкая ремиссия возможна при исчезновении HBsAg. В этом случае терапия может быть прервана. При отсутствии нормализации АТ после 6 мес. продолжение лечения нецелесообразно.

До 1998г. стандартом лечения больных хроническим гепатитом С (ХГ С) являлась монотерапия препаратами ИФНа, который назначался в/м или п/к по 3млн МЕ x 3р/нед в течение 12 месяцев. При этом стойкий ответ на лечение наблюдался в 20-25% случаев. Помимо указанных выше, специфическим для ХГ С побочным эффектом лечения ИФНа является парадоксальное увеличение активности болезни, наблюдающееся в 2-5% случаев. Это ухудшение связывают с индукцией ИФНа аутоиммунного гепатита, и лечение должно быть прервано, если уровень АТ двукратно превысит имевшийся до начала лечения.

В настоящее время в качестве “золотого стандарта” лечения больных ХГ С рекомендуется сочетанная терапия Интроном А и рибавирином (РебетолТ, SCHERING-PLOUGH, США). Рибавирин (РИБ) - нуклеозидный аналог с широким спектром противовирусной активности, особенно в отношении РНК-содержащих вирусов. РИБ принимается внутрь в два приема вне связи с приемом пищи и, как правило, хорошо переносится. Рекомендуемые дозы 1000 мг/сут (при весе <75 кг) и 1200 мг/сут (при весе >75 кг). Монотерапия РИБ ХГ С приводит к значительному снижению активности АТ и улучшению гистологической картины в печени. Эти эффекты не связаны со снижением уровня РНК HCV, что позволяет предположить наличие у РИБ не только противовирусных механизмов действия. Монотерапия РИБ не приводит к стойкому ответу, и при прерывании лечения у всех больных наступает рецидив. Основным побочным эффектом РИБ является гемолиз, требующий коррекции дозы препарата у 13% больных. Противопоказаниями к лечению РИБ являются терминальная почечная недостаточность, тяжелые анемии и гемоглобинопатии, беременность, тяжелые заболевания сердца и неконтролируемая артериальная гипертензия.

Основными факторами, неблагоприятно влияющими на успех лечения (ФНО), являются 1) мужской пол, 2) возраст старше 40 лет, 3) наличие распространенного фиброза и цирроза печени, 4) 1-ый генотип HCV и 5) высокий уровень виремии ($>3,5 \times 10^6$ копий/мл).

Больным, не получавшим ранее лечение ИФНа, рекомендуется назначать 3млн. МЕ Интрона А п/к или в/м 3 р/нед или через день в сочетании с Ребетолом 1000-1200мг/сут. на протяжении 6 мес., после чего исследовать РНК HCV в сыворотке (двукратно). При положительном результате продолжение лечения по данной схеме является малоперспективным. При отсутствии РНК HCV лечение следует продолжать до 12 мес. у больных, имеющих 3 и более ФНО. У больных, имеющих не более 2 ФНО, лечение может быть завершено.

Использование Пег Интрона в дозе 1,5 мкг/кг 1 раз/нед. вместо обычного ИФНа позволяет при необходимости уменьшить дозу РИБ до 800 мг/день. При хорошей переносимости обоих препаратов оптимальным является сочетание Пег Интрона в дозе 1,5 мкг/кг 1 раз/нед. и РИБ в суточной дозе 13 мг/кг \pm 2 мг/кг ежедневно. Такой протокол позволяет достичь стойкого ответа более чем в 60% случаев, в том числе в 88% случаев у больных, инфицированных HCV 2 или 3 генотипа. Особенно целесообразным явля-

ется применение пегилированных препаратов ИФНа у больных компенсированным ЦП, у которых вероятность достижения вирусологической ремиссии увеличивается с 6% до 30%, и у больных, инфицированных HCV 1 генотипа (эффективность 42%).

Больным, у которых возник рецидив после монотерапии ИФНа, и “неответчикам” на монотерапию может быть рекомендована описанная выше сочетанная терапия, а также лечение с применением более высоких доз ИФНа (индукция ответа) при ежедневном назначении препарата. Одна из возможных схем лечения: по 10 млн МЕ-2 дня, по 6 млн МЕ до 1 мес, по 3 млн МЕ до 3-6 мес е/д, далее ч/д. Эффективность такого режима связана с тем, что основное уменьшение вирусной массы приходится именно на первые дни лечения, а ежедневное введение ИФНа как правило лучше переносится больными из-за отсутствия синдрома отмены. (Возобновление лечения после любого перерыва вызывает гриппоподобный синдром). Сочетание высоких доз ИФНа с РИБ повышает вероятность излечения.

Готовится к регистрации для использования в России препарат ИФНа-конценсус (ИнфергенТ, YAMANOUCI EUROPE, Нидерланды), особенно эффективный при лечении рецидива болезни.

У больных, не ответивших на сочетанную терапию ИФНа и РИБ (РНК HCV+ после 6 мес. терапии), хорошие результаты (стойкий ответ в 48% случаев) продемонстрировала схема с использованием высоких доз ИФНа, РИБ (1000-1200мг/сут) и амантадина (ПК-Мерц Т, MERZ, Германия).

Больным, которым противопоказано назначение РИБ, следует рекомендовать лечение пегилированными препаратами ИФНа, либо обычными интерферонами в режиме индукции ремиссии высокими дозами. При достижении раннего ответа лечение следует продолжить до 12 мес.

Перспективным препаратом, применяющимся в настоящее время за рубежом в лечении ХГ В и С является тимозин а1 (тимальфасин), зарегистрированный фармацевтической компанией SciClone, США, под торговым названием ЗАДАКСИНв. Биологически активный полипептид, состоящий из 28 аминокислот, впервые был выделен из тимуса. Основным механизмом действия является стимуляция естественных киллеров и цитотоксических лимфоцитов (CD8+), а также увеличение продукции таких цитокинов, как ИФНγ, интерлейкин-2, что приводит к стимуляции Th-1 и иммуноопосредованной гибели инфицированных клеток. Задаксин применяют в качестве монотерапии у больных ХГ В в дозе 1,6 мг п/к 2 раза в неделю и при ХГ С в той же дозе в сочетании с ИФНа. Лечение проводят в течение года. Стойкий ответ наблюдается в 40% случаев, в том числе у больных, инфицированных HCV 1 генотипа.

При высоких показателях содержания железа в сыворотке крови (ферритин, процент насыщения трансферрина железом) использование противовирусных препаратов целесообразно сочетать с удалением избытков железа из организма посредством применения хелаторов или серии извлечений крови, что приводит к уменьшению активности АТ и прекращению репликации у “неответчиков” на противовирусное лечение. При наличии холестаза оправдано сочетание противовирусного лечения с назначением урсодезоксихолевой кислоты. В случае возникновения депрессивных расстройств на фоне лечения противовирусными препаратами возможно назначение гептрала. Применение так называемых “гепатопротекторов” (эссенциальных фосфолипидов, растительных препаратов и др.) не обосновано и может привести к ухудшению в течении болезни.

Литература

- 1 Апросина З.Г. Последние достижения в изучении вирусных гепатитов: от молекулярной биологии к лечению вирусного гепатита В. Лекция
- 2 Ильина Е.Н., Говорун В.М., Климова Е.А., Гаджикулиева М.М., Ющук Н.Д. Изменчивость генома вируса гепатита С при лабораторном мониторинге больных острым вирусным гепатитом. *Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* (сдана в печать).
- 3 Ильина Е.Н., Гуштин А.Г., Говорун В.М., Знойко О.О., Климова Е.А., Ющук Н.Д. Новый подход в генотипировании вируса гепатита С. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 1999, № 5, стр. 23-26.
- 4 Коган Э.М., Жукоцкий А.В., Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Потапов И.А., Якубова Н.И., Ялпаев В.В. Использование компьютерной морфоденситометрии в современной молекулярно-диагностической практике. *Вопросы медицинской химии, Москва,* 1998, т. 44, стр. 527-536.
- 5 Крель П.Е., Кабакова А.В., Лопаткина Т.Н., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Мухин Н.А., Апросина З.Г., Попова И.В. ПЦР в оценке эффективности лечения ламивудином хронического гепатита В. Тезисы докладов 3-ей Всероссийской научно-практической конференции "Генодиагностика в современной медицине", Москва, 2000, стр. 202.
- 6 Лопаткина Т.Н. Клиника гепатита С. Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. 1997. № 1, стр. 12-16.
- 7 Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С., Тсуда Ф., Селиванов Н.А., Окамото Х и др. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ. *Вопросы вирусологии,* 1997, № 4, стр. 157-161.
- 8 Рыжова Ю. Л., Фомин Е.А., Калинина О.В., Мукомолов С.Л. Индикация HBV ДНК в прогнозировании угрозы хронизации при остром гепатите В. *Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии,* 1995, т. V, стр. 206-207
- 9 Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. Теза, С.-Петербург, 1998 г.
- 10 Ш. Шерлок, Дж. Дули. Заболевания печени и желчных путей. М., Гэотар Медицина, 1999
- 11 Ющук Н.Д., Знойко О.О., Климова Е.А., Огиенко О.Л., Брагинский Д.М., Малышев Н.А. Диагностическая значимость метода ПЦР при обследовании больных с HCV инфекцией. Материалы II Всероссийской конференции "Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний", Москва, 1998, стр. 71-78.
- 12 Abravaya, K., Carrino, J. J., Muldoon, S., and Lee, H. H.. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-PCR). *Nucleic Acids Research.* 1995, v. 23, p. 675-682.
- 13 Bacon B., A. Di Bisceglie. Liver Disease. Diagnosis and management. Churchill Livingstone, 2000
- 14 Bathelier C., Mercier G., Lucotte G. A simplified semiquantitative determination of hepatitis C virus genome molecules by the end-point dilution method. *Mol and Cell Probes,* 1996, v. 10, p. 477-480.
- 15 Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H. Sequence analysis of the core gene of the 14 hepatitis C virus genotype. *Proc Nath Acad Sci USA,* 1994, v. 91, p. 8239-8243.
- 16 Bukh J., Purcell R.H., Miller R.H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Nath Acad Sci USA,* 1992, v. 89, p. 4942-4946
- 17 Chan S.W., McOmish F., Holmes E.C., Dow B., Peutherer J.F., Follett E., Yap P.L., Simmonds P. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol,* 1992, v. 73, p. 1131-1141.
- 18 Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *J Gen Virol,* 1995, v. 76, p. 1197-1204.
- 19 Davis GL, Lau JY Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology,* 1997, v. 26, Suppl 1, p. 122S-127S
- 20 Diseases of the liver and biliary tract. Standardization of nomenclature, diagnostic criteria and prognosis. Raven Press, Ltd., 1994
- 21 EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. *J. Hep.* 1999; 30: 956-961
- 22 Edward L. Krawitt. Medical Management of liver disease. Marcel Dekker, Inc., 1999
- 23 Enomoto N, Kurosaki M, Tanaka Y, Marumo F, Sato C Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J Gen Virol,* 1994, v. 75, p. 1361-1369.
- 24 Gonzalez-Peralta RP, Liu WZ, Davis GL, Qian KP, Lau JY Modulation of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by interferon-alpha and ribavirin therapy. *J Viral Hepat,* 1997, v. 4, p. 99-106.
- 25 Gonzalez-Peralta RP, Qian KP, She JY, Davis GL, Ohno T, Mizokami M, Lau JY Clinical implication of viral quasispecies heterogeneity in chronic hepatitis C. *J Med Virol,* 1996, v. 49, p. 242-247
- 26 Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol,* 1992, v. 176, p. 1-20.
- 27 Lareu R.R., Swanson R.N., Fox S.A. Rapid and sensitive genotyping of hepatitis C virus by single-strand conformation polymorphism. *J Virol Methods,* 1997, v. 64, p. 11-18.
- 28 Le Guen B., Squadrito G., Nalpas B., Berthelot P., Pol S., Brechot C. Hepatitis C virus Genome Complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology,* 1997, v. 25, p. 1250-1253.
- 29 Lee JH, Stripf T, Roth WK, Zeuzem S Non-isotopic detection of hepatitis C virus quasispecies by single strand conformation polymorphism. *J Med Virol,* 1997, v. 53, p. 245-251.
- 30 Liaw Y.F, Chien R.N., Yeh C.T., Tsai S.L., Chu C.M. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology,* 1999, v. 30, No. 2, p. 567 - 572.
- 31 Linnen J., Wages J., Zhang-Keck Z-y. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science,* 1996, 271, p. 221-226.

- 32 Lunel F., P. Cresta, D. Vitour, C. Payan, B. Dumont, L. Frangeul Comparative evolution of Hepatitis C Virus RNA Quantitation by Branched DNA, NASBA and Monitor Assay. *Hepatology*, 1999, v. 29, p 528-535.
- 33 Maggi F, Fornai C, Morrìca A, Vatteroni ML, Giorgi M, Marchi S, Ciccorossi P, Bendinelli M, Pistello M Divergent evolution of hepatitis C virus in liver and peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Med Virol*, 1999, v. 57, p. 57-63.
- 34 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 1992;24:17-27
- 35 Naito M, Hayashi N, Moribe T, Hagiwara H, Mita E, Kanazawa Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Hepatitis C viral quasispecies in hepatitis C virus carriers with normal liver enzymes and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology*, 1995, v. 22, p. 407-412.
- 36 Nishizawa T., Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *BBRC*, 1997, V. 241, P. 92-97.
- 37 Okamoto H, Kojima M, Sakamoto M, Iizuka H, Hadiwandowo S, Suwignyo S, Miyakawa Y, Mayumi M The entire nucleotide sequence and classification of a hepatitis C virus isolate of a novel genotype from an Indonesian patient with chronic liver disease. *J Gen Virol*, 1994, v. 75, Pt 3, p. 629-635
- 38 Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol*, 1992, v. 73, Pt 3, p. 673-679
- 39 Purcell R. The Hepatitis C Virus: Overview. *Hepatology*, 1997, v. 26, No. 3, Suppl. 1, p. 11S-14S
- 40 Purcell R. The hepatitis C virus: Overview. *Hepatology*, 1997, v.26, suppl 1, p. 11S-14S
- 41 Rossini A, Ravaggi A, Biasi L, Agostinelli E, Bercich L, Gazzola GB, Callea F, Radaeli E, Cariani E. Virological response to interferon treatment in hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels and chronic hepatitis. *Hepatology*, 1997, v. 26, p. 1012-1017.
- 42 Schiff E. *Diseases of the liver on CD-rom*, 8th ed.
- 43 Shimizu Y, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virology*, 1994, v. 68, p. 1494-1500.
- 44 Shindo M., Hamada K., Koya S., Arai K, Sokawa Y., Okuno T. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology*, 1996, v. 24, p.1018-1023.
- 45 Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*, 1994, v. 19, No. 5, p. 1321-1324
- 46 Smith DB, Davidson F, Simmonds P. Hepatitis C virus variants and the role of genotyping. *J Hepatol*, 1995, v. 23, Suppl 2, p. 26-31.
- 47 Sterneck M., Kalinina T., Gunther S., Fisher L., Santantonio T., Greten H., Will H. Functional analysis of HBV genomes from patients with fulminant hepatitis. *Hepatology*, 1998, v. 28, p. 1390-1397.
- 48 Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborcht B., Heuverswyn H., Maertens G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtype using a line probe assay. *J Gen Virol*, 1993, v. 74, p. 1093-1102.
- 49 Tipples G.A., Ma M.M., Fischer K.P., Bain V.G., Kneteman N.M., Trel D.L. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology*, 1996, v. 24, p. 714-717.
- 50 Wilson JJ, Polyak SJ, Day TD, Gretch DR Characterization of simple and complex hepatitis C virus quasispecies by heteroduplex gel shift analysis: correlation with nucleotide sequencing. *J Gen Virol*, 1995, v. 76, p. 1763-1771.
- 51 Yuki N, Hayashi N, Moribe T, Matsushita Y, Tabata T, Inoue T, Kanazawa Y, Ohkawa K, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T Relation of disease activity during chronic hepatitis C infection to complexity of hypervariable region 1 quasispecies. *Hepatology*, 1997, v. 25, p. 439-444.
- 52 Zein N.N. and Persing D.H. Hepatitis C genotypes: current trends and future implications. *Mayo Clin Proc*, 1996, v. 71, p. 458-462.