

УДК 616.36-002-047.3

КЛИНИЧЕСКАЯ АПРОБАЦИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ, ПОДТВЕРЖДАЮЩЕЙ ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С**В. М. Мицура, Е. В. Воропаев, С. В. Жаворонок,
Аль Ханса Аль-Шаби, А. В. Воропаева, Л. Г. Барри, Н. М. Голубых****Гомельский государственный медицинский университет**

Представлены результаты обследования 191 больного вирусным гепатитом С (ВГС), в том числе 15 больных острым вирусным гепатитом С (ОВГС), 176 больных хроническим вирусным гепатитом С (ХГС), а также 85 доноров крови с использованием иммуноферментной тест-системы, подтверждающей выявление антител к вирусу гепатита С, разработанной в Гомельском государственном медицинском университете. Рассчитаны показатели специфичности и чувствительности данного метода исследования относительно выявления РНК HCV методом полимеразной цепной реакции. Показатель специфичности тест-системы по сравнению с ПЦР составил 100%, чувствительности — 98%. У 92,0% обследованных больных ХГС и у 73,3% больных ОВГС одновременно выявлялись антитела к Core, NS3 и NS4-белкам. При обнаружении анти-NS5 чаще выявлялся повышенный уровень АЛТ ($p = 0,047$).

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, HCV-инфекция, спектр антител к HCV, полимеразная цепная реакция.

THE CLINICAL APPROBATION OF ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY KIT FOR CONFIRMATION OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS DETECTION**V. M. Mitsura, E. V. Voropaev, S. V. Zhavoronok,
Al-Khansa Al-Shabi, A. V. Voropaeva, L. G. Barri, N. M. Golubych****Gomel State Medical University**

The results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV) spectrum in 191 patients with HCV-infection, including 176 patients with chronic hepatitis C (CHC) and 15 patients with acute hepatitis C (AHC), and in 85 blood donors with the help of ELISA kit for confirmation of antibodies to hepatitis C virus detection produced in Gomel State Medical University are represented. The sensitivity and specificity parameters of the ELISA kit were calculated in comparison with RNA HCV detection by means of polymerase chain reaction (PCR) method. The specificity was 100%, sensitivity — 98%. In 92.2% of patients with CHC and in 73.3% of those with AHC antibodies to Core, NS3 and NS4 HCV proteins simultaneously were revealed. When anti-NS5 were detected, the ALT levels were higher.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay, HCV-infection, antibodies spectrum to HCV, polymerase chain reaction.

Введение

Гепатит С является инфекцией, возбудитель которой распространяется среди людей почти исключительно путем алиментарной «кровяной» трансмиссии. Вирусом гепатита С (HCV) инфицировано около 3% населения Земного шара, и фактически речь идет о пандемии, которая по масштабу в 5 раз превосходит зараженность вирусом СПИДа. После резкого снижения гемотрансфузионного гепатита С (благодаря лабораторному контролю донорской кро-

ви) инфицированность поддерживается за счет парентеральных инъекций наркотиков и (в меньшей степени) других процедур, связанных с повреждением кожи и слизистых оболочек [1, 2]. HCV-инфекция относится к индикаторам социального и медицинского благополучия общества. Именно так она рассматривается в ряде документов, изданных на государственном уровне.

Считается, что около 3% населения мира инфицировано HCV [6]. В некоторых регионах мира HCV инфицировано до 5–10%

взрослого населения. В Германии наличие антител к вирусу гепатита С (анти-НСV) обнаружено у 0,63% населения, в Европе и США — у 1–2% [8, 10], а в Египте примерно 15% к общей популяции [11]. В США от последствий гепатита С ежегодно умирает 8000–10000 человек и еще около 1000 становятся реципиентами донорской печени [12].

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

Характерный признак гепатита С — отсроченная сероконверсия. Первые анти-НСV антитела удается обнаружить не ранее 5 недель после инфицирования (переливание зараженной крови), но сроки их появления могут быть и гораздо длиннее (30–50 недель). Спектр антител достаточно сложен, отражая эпитопную поливалентность НCV-антигенов. Динамика антител к различным антигенам (точнее их эпитопам) неодинакова, что имеет диагностическое значение [1, 3].

Констатация НCV-инфекции базируется на выявлении специфических серологических маркеров, которые наиболее часто выявляют методом иммуноферментного анализа (ИФА). Это важно не только для дифференциальной диагностики гепатита С, но и для суждения о стадии заболевания, прогнозирования его течения, оценки активности процесса и эффективности противовирусной терапии [4, 5]. Наиболее широко практикуется определение анти-НСV и отдельно антител к различным полипептидам вирусного гепатита С. Принципиальное значение имеет генодиагностика, основанная на детекции РНК НCV.

Актуальной задачей является разработка отечественных средств лабораторной диагностики, основанных на иммуноферментном анализе. Данные разработки проводились в Гомельском медицинском университете в рамках государственной научно-технической программы «Инфекции и медицинские биотехнологии» и завершились созданием иммуноферментной тест-системы, подтверждающей выявление антител к вирусу гепатита С, клиническая апробация которой представлена в данном исследовании.

Цель исследования: клиническая апробация разработанной иммуноферментной

тест-системы, подтверждающей выявление антител к вирусу гепатита С.

Материалы и методы

С целью клинической апробации и уточнения практической значимости разработанной в Гомельском государственном медицинском университете в рамках ГНТП «Инфекции и медицинские биотехнологии» иммуноферментной тест-системы, подтверждающей выявление антител к вирусу гепатита С, нами обследовано 176 больных ХГС и 15 больных ОГС, находившихся на стационарном лечении, из них 109 больным было проведено определение РНК НCV методом ПЦР, в том числе и Real Time ПЦР с количественным определением вирусной нагрузки и 55 пациентам был определен генотип вируса. Кроме того, было обследовано 85 здоровых доноров крови.

Диагноз у 189 больных (98,9%) был подтвержден обнаружением тотальных антител к НCV (анти-НСV), у 2 больных диагноз был подтвержден методом ПЦР. РНК НCV методом ПЦР определялось у 109 (у остальных данное исследование не проводилось), а также морфологическим изучением биоптатов печени у 58 больных. У всех больных отсутствовали маркеры HBV- и ВИЧ-инфекции (HBsAg и ИФА ВИЧ отрицательные).

Среди больных были 117 мужчин (61,2%) и 74 женщины (38,7%) в возрасте от 16 до 63 лет, средний возраст — $34,0 \pm 1,1$ лет.

При клиническом осмотре выявлено увеличение печени у 91 пациента (47,6%), желтушность кожи и/или склер — у 48 (25,1%), увеличение селезенки — у 11 (5,8%).

Уровень АЛТ в сыворотке крови у больных соответствовал нормальным значениям у 48 человек (25,1%), минимальной биохимической активности — у 60 (31,4%), умеренной — у 45 (23,6%), высокой — у 38 (19,9%). Билирубин сыворотки крови был повышен у 57 больных (29,8%).

Генотип вируса определялся у 55 человек, при этом генотип 1a выявлялся у 1 (2%); генотип 1b — у 31 человека (56%), 3a — у 20 больных (36%), 2 — у 1 больного (2%).

Больные ХГС получали во время нахождения в стационаре диету (стол № 5 по Певзнеру), метаболическую терапию (рибоксин, поливитамины), гепатопротекторы (эссенциале, карсил), традиционные для инфекционной гепатологии [2]. В группу не включа-

лись пациенты, которые принимали глюкокортикоидные гормоны и иммуностимуляторы.

При наличии показаний к интерферонотерапии пациентам проводились ПЦР-анализ для количественного выявления РНК HCV в сыворотке крови, определение генотипа вируса и пункционная биопсия печени с морфологическим исследованием биоптата (больным ХВГ). После готовности результатов данных исследований больные осматривались консилиумом для решения

вопроса о дальнейшем лечении. Препараты α -интерферона (α -ИФН) назначались по стандартным показаниям, принятым в Республике Беларусь [7, 9].

Оценка раздельного выявления антител к белкам HCV (Core, NS3, NS4, NS5) методом ИФА проводилась в соответствии с инструкцией по применению разработанной тест-системы. Корреляции спектрального состава антител с генотипом HCV выявлено не было (таблица 1).

Таблица 1 — Анализ спектрального состава антител в зависимости от генотипа HCV

Наличие антител к области HCV				Генотип				
Core	NS3	NS4	NS5	1b	1 b + 3a	2	3a	1a
Да	Да	Да	Да	20 (64,51%)	2	0	17 (85%)	0
Да	Да	Да	Нет	11 (35,48%)	0	1	3 (15%)	1
Всего				31	2	1	20	1

Наиболее часто в группе лиц, позитивных по всем четырем антигенам, выявляется генотип 1b, который в то же время является наиболее часто встречаемым генотипом в популяции.

Всего из 191 обследованной сыворотки в 189 образцах ($98,95 \pm 1\%$) были выявлены антитела к Core-протеину (анти-Core), в 184 образцах ($96,3 \pm 1,3\%$) — антитела к NS3 (анти-NS3), в 169 образцах ($96,0 \pm 1,5\%$) — антитела к NS4 (анти-NS4), в 111 образцах ($58,1 \pm 3,1\%$) — антитела к NS5 (анти-NS5).

По спектру выявляемых антител к HCV больные разделились на несколько групп (таблица 2).

У большинства обследованных боль-

ных ХГС одновременно выявлялись антитела к Core, NS3 и NS4-белкам (92,0%) и в 73,3% — у больных ОГС. При этом частота выявления антител к NS5-белку при ХГС была вариабельной. У больных ХГС исследуемой группы отмечалось изолированное отсутствие анти-Core (1,1%) или анти-NS3 (2,3%). В 1 случае (0,6%) выявлялись лишь анти-NS4. Полученный результат, не подтвержденный аналогичными иммуноферментными тестами, трактуется как неопределенный и должен быть подтвержден другими методами. Следует отметить, что в данном случае результат был подтвержден выявлением РНК HCV методом ПЦР.

Таблица 2 — Наличие различных вариантов спектра антител к HCV у больных ВГС

Наличие антител к области HCV				Больные ХГС, n = 176	Больные ОГС, n = 15
Core	NS3	NS4	NS5		
Да	Да	Да	Да	105 (59,6 \pm 3,7%)	8 (53,3 \pm 2,7%)
Да	Да	Да	Нет	57 (32,4 \pm 3,5%)	3 (20 \pm 2,1%)
Да	Да	Нет	Нет	7 (4,0 \pm 1,5%)	2 (13,3 \pm 1,7%)
Да	Нет	Да	Да	4 (2,3 \pm 1,1%)	0
Нет	Да	Да	Да	2 (1,1 \pm 0,8%)	0
Нет	Нет	Да	Нет	1* (0,6 \pm 0,6%)	0
Нет	Нет	Нет	Нет	0	2 (13,3 \pm 1,7%)

* При проведении анализа на тест-системах сравнения получены негативные результаты.

У больных ХГС проведено сравнение частоты выявления анти-NS5 в зависимости от пола, возраста больных, уровней АЛТ, а также частоты выявления повышенного уровня АЛТ (более 0,20 мккат/л, что соответствует повышению в 1,5 раза от нормы) (таблица 3). Для оценки различий применялся t-критерий Стьюдента (возраст и процент повышенной АЛТ) и критерий χ^2 (пол), а также критерий Манна-Уитни для сравнения уровней АЛТ, учитывая их непараметрическое распределение (по критерию Колмогорова-Смирнова $p < 0,01$).

Как видно из таблицы 3, значимые различия в частоте выявления анти-NS5 в зависимости от пола и возраста отсутствовали ($p > 0,05$). Уровни АЛТ были выше у лиц с наличием анти-NS5, чем при их отсутствии ($p = 0,047$ и $p = 0,001$ соответственно). Анти-NS5

могут рассматриваться как дополнительные маркеры активности процесса при ХГС.

Затем больные ХГС были разделены на 2 группы в зависимости от получаемой интерферонотерапии. Контрольную группу составили 118 человек, получающих этиотропное и патогенетическое лечение (I группа). Интерферонотерапию получали 58 больных (II группа). Дальнейшее сравнение проводилось отдельно в I и II группах с целью выявить возможное влияние интерферонотерапии на некоторые показатели гуморального иммунитета. Больные II группы обследовались через 3–6 месяцев от начала интерферонотерапии.

Проведено сравнение частоты выявления различных антител к HCV у больных I и II групп с помощью t-критерия Стьюдента (таблица 4).

Таблица 3 — Сравнение частоты выявления анти-NS5 у больных ХГС, в зависимости от некоторых параметров (пола, возраста больных, уровней АЛТ)

Параметры	анти-NS5 + (n = 111)	анти-NS5 – (n = 65)	p
Пол: м/ж	74/37	36/29	0,14
Возраст, лет, $M \pm m$	35,2 \pm 1,3	33,7 \pm 1,8	0,25
АЛТ, мккат/л, $M \pm m$	0,57 \pm 0,08	0,49 \pm 0,08	0,09
% повышенного АЛТ	79,6 \pm 3,8	62,5 \pm 6,0	0,047

Таблица 4 — Сравнение частоты выявления антител к HCV у больных I и II групп

Группы больных	Анти-Core абс. (%)	Анти-NS3 абс. (%)	Анти-NS4 абс. (%)	Анти-NS5 абс. (%)
I гр. (n = 118)	116 (98,3 \pm 1,2)	114 (96,6 \pm 1,7)	112 (94,9 \pm 2,0)	81 (68,6 \pm 4,3)
II гр. (n = 58)	57 (98,3 \pm 1,7)	57 (98,3 \pm 1,7)	57 (98,3 \pm 1,7)	30 (51,7 \pm 6,6)
p	0,98	0,53	0,28	0,028

Значимо реже ($p = 0,028$) анти-NS5 регистрировались во II группе, значения остальных показателей в указанных группах статистически не различались ($p > 0,2$). По нашему мнению, этиотропная терапия препаратами α -ИФН подавляет вирусную репликацию, что приводит к снижению образования специфических антител. Антитела к NS5 могут считаться дополнительными маркерами вирусной репликации и активности процесса, в том числе при этиотропной терапии ХГС.

Для выявления возможной связи между обнаружением специфических антител и исходом интерферонотерапии ретроспективно проанализирована частота выявле-

ния анти-NS5 до начала интерферонотерапии в зависимости от вирусологического ответа (отрицательный результат РНК HCV методом ПЦР) к завершению курса лечения у больных II группы. При этом из 48 больных вирусологический ответ (ВО) на терапию зарегистрирован у 16 (33,3%), а отсутствие вирусологического ответа (вирусологический неответ, ВН) — у 32 (66,7%). Антитела к NS5-белку HCV выявлялись у 28 из 48 больных (58,3%). Оценка значимости различия частот наблюдений в четырехпольных таблицах проводилась с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Выявление анти-NS5 у больных II группы, в зависимости от вирусологического ответа на интерферонотерапию

Вирусологический ответ	Выявление анти-NS5	
	Анти-NS5 +	Анти-NS5 –
Ответ (n = 16)	6 (37,5%)	10 (62,5%)
Не ответ (n = 32)	22 (68,7%)	10 (31,3%)
χ^2, p	$\chi^2 = 4,29; p = 0,038$	

Как видно из приведенных в таблице 5 данных, вирусологический ответ на интерферонотерапию значимо чаще ($p = 0,038$) ассоциировался с отсутствием анти-NS5 (62,5%), в то же время у не ответивших чаще выявлялись анти-NS5 (68,7%).

Нами подтверждается мнение, что наличие и титры антител к NS5 белку HCV могут отражать эффективность терапии α -ИФН, причем их повышенные значения характерны для лиц, не отвечающих на терапию α -ИФН [2, 3].

У 18 больных II группы определение антител к HCV проводилось в динамике: до назначения интерферонотерапии и на ее фоне (через 3–9 месяцев). У всех больных были выявлены антитела к Core-, NS3- и NS4-белкам HCV, которые сохранялись и в динамике. Антитела к NS5-белку выявлялись у 11 больных до начала терапии и сохранялись у тех же больных на фоне лечения.

Анти-HCV не выявлялись при обнаружении РНК вируса гепатита в крови лишь двух случаях (4,8%), что нужно оценивать как серонегативный период ОГС. В 9 случаях (8,4%) отмечено отсутствие РНК HCV при положительном результате ИФА. Такая картина характерна для ОГС после прекращения вирусемии (8 больных), после перенесенного ОГС (1 больной). Из 85 доноров крови у 83 получены отрицательные результаты при исследовании обоими методами. У одного донора изолированно определялись антитела к Core протеину и еще у одного — изолированно антитела к NS4. Данные результаты необходимо подтвердить с помощью других методов лабораторной диагностики.

Оценена чувствительность выявления разработанного нами диагностического теста по выявлению анти-HCV в сравнении с детекцией РНК HCV методом ПЦР. Истинно положительных результатов (ИП) — 98, ложно отрицательных (ЛО) — 9. Специфичность разработанного нами теста в

сравнении с ПЦР оценивалась по формуле [13]. Истинно отрицательных (ИО) результатов — 9, ложно положительных (ЛП) — 0. Специфичность теста = $(\text{ИО}/(\text{ИО}+\text{ЛП})) \times 100\% = 100\%$. По формуле [13] рассчитанная таким образом чувствительность теста = $(\text{ИП}/(\text{ИП}+\text{ЛО})) \times 100\%$ составила 98%.

Таким образом, при отсутствии возможности выполнения ПЦР-анализа, определение спектра антител к вирусу гепатита С может применяться для выявления инфицированности HCV.

Заключение

Таким образом, у 98,95% больных ХВГ и ОВГ выявлены антитела к Core-белку, у 96,3% — антитела к NS3, у 96,0% — антитела к NS4, у 58,1% — антитела к NS5. У большинства обследованных больных ХГС (90,6%) одновременно выявлялись антитела к Core, NS3 и NS4-белкам. При обнаружении анти-NS5 чаще выявлялся повышенный уровень АЛТ ($p = 0,047$).

В группе ХГС значимые различия в частоте выявления анти-NS5 в зависимости от пола и возраста отсутствовали ($p > 0,05$). Анти-NS5 регистрировались значимо реже ($p = 0,028$ соответственно) во II группе по сравнению с I, что свидетельствует о подавлении вирусной репликации и активности ХГС при лечении препаратами α -ИФН. Антитела к NS5 могут считаться дополнительными маркерами вирусной репликации и активности процесса при этиотропной терапии ХГС.

Вирусологический ответ на курс интерферонотерапии значимо чаще ассоциировался с отсутствием анти-NS5 (62,5%, $p = 0,038$). Антитела к NS5 могут использоваться и в качестве прогностических факторов эффективности интерферонотерапии. В динамике интерферонотерапии анти-NS5 не изменяются.

Разработанная нами тест-система позволяет выявлять антитела изолированно к отдельным полипептидам HCV, в таких случаях необходимо проводить подтвержде-

ние их выявления альтернативными методами, такими как ПЦР.

Специфичность разработанного теста по отношению к такому методу диагностики, как ПЦР составляет 100%, чувствительность — 98%, рекомендуется использовать данный метод диагностики в комплексе с ПЦР.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Балаян, М. С.* Энциклопедический словарь — вирусные гепатиты / М. С. Балаян, М. И. Михайлов. — М. : Амипресс. — 1999. — 304 с.
2. Гепатит С: консенсус 2002 / Национальный институт здоровья (США) // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. Инф. бюл. — 2002. — № 2. — С. 3–11.
3. Гепатит С: механизмы многолетней персистенции вируса и фазы течения инфекционного процесса / С. Н. Соринсон [и др.] // Клиническая медицина. — 1997. — № 10. — С. 27–30.
4. Диагностическая значимость определения антител к различным антигенам вируса гепатита С у пациентов с острой и хронической HCV-инфекцией / Н. Д. Ющук [и др.] // Тер. архив. — 2002. — № 4. — С. 18–22.
5. Динамика антител к структурным и неструктурным белкам HCV у наркоманов с HCV-инфекцией / В. И. Лучшев [и др.] // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2001. — № 6. — С. 30–32.
6. Заключение международной конференции по гепатиту С / Европейская ассоциация по изучению

печени, Париж, 1999 // Клиническая фармакология и терапия. — 2000. — № 9 (1). — С. 9–12.

7. *Ключарева, А. А.* Современные подходы к лечению хронических вирусных гепатитов В и С / А. А. Ключарева // Мед. новости. — 2000. — № 11. — С. 7–12.

8. *Майер, К. П.* Гепатиты и последствия гепатита (в помощь практическому врачу) / К. П. Майер. — М. : ГЭОТАР Медицина, 1999. — 432 с.

9. Система диагностики диффузных паренхиматозных поражений печени у различных групп населения с повышенным риском инфицирования вирусными гепатитами В, С, D, G: Методические рекомендации / С. В. Жаворонок [и др.]. — Минск, 1998. — 52 с.

10. Спектр антител к различным антигенам HCV при разных вариантах течения хронической HCV-инфекции / И. В. Круглов [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2002. — № 2. — С. 11–16.

11. Detection of anti-hepatitis C virus antibodies in patients undergoing dialysis by utilizing a hepatitis C virus 3.0 assay: correlation with hepatitis C virus RNA / M. de Medina [et al.] // J. Lab. Clin. Med. — 1998. — Vol. 132, № 1. — P. 73–75.

12. *Terrault, N.* Interferon and hepatitis C / N. Terrault, T. Wright // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 332. — P. 1509–1513.

13. *Winkel, P.* The effects of time of venipuncture on variation of serum constituents / P. Winkel, BE Statland, H. Bokelund // Am. J. Clin. Pathol. — 1975. — Vol. 64. — P. 433–447.

Поступила 15.05.2007

УДК 616.931-005.1-036.83

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПОСТИНСУЛЬТНОЙ ДЕМЕНЦИИ У БОЛЬНЫХ ГРУППЫ РИСКА

В. Я. Латышева, А. С. Аль-Хулайди Мохамед

Гомельский государственный медицинский университет

В работе представлены основные критерии, позволяющие среди больных с инфарктом мозга выделить группу риска по трансформации когнитивных нарушений в постинсультную деменцию и включающую умеренно выраженные когнитивные нарушения; локализацию очага в бассейне правой средней мозговой артерии и изменения некоторых показателей липидного обмена (триада критериев). Больным группы риска рекомендовано пролонгированное лечение на амбулаторно-поликлиническом и домашнем этапах.

Ключевые слова: инфаркт мозга, когнитивные функции (память, внимание, мышление), липидный обмен, магнитно-резонансная и компьютерная томография, группа риска.

PREDICTION POSTINSULT DEMENTIA IN PATIENTS RISK GROUPS

V. Ya. Latysheva, A. S. Al Khulaidi Mohamed

Gomel State Medical University

The present paper presents criteria which allow to identify risk groups including moderately expressed cognitive disorders with the localization of cerebral infarction in the right medial cere-