

## ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА

Огляд

**В**ирусний гепатит С (ВГС) – антропонозне інфекційне захворювання, викликане РНК-содержащим вирусом и имеющее преимущественно хроническое течение. Возбудитель обладает выраженной гепатотропностью, однако доказана и внепеченочная локализация вируса.

# Современное состояние лабораторной диагностики вирусного гепатита С

Вирус гепатита С (HCV) был открыт в 1989 г. Это мелкий вирус из семейства Flaviviridae с однонитчатой линейной РНК диаметром 30-38 нм. HCV характеризуется высокой изменчивостью генома, что связано с большой скоростью репликативного цикла (до  $10^{12}$  вирионов в день) и низкой точностью полимеразы. В настоящее время открыто 10 генотипов вируса, из них наиболее клинически изучены первые 6. В каждой генотипической группе существует несколько подтипов (a, b, c...). Внутри подтипов в процессе противовирусной терапии могут образовываться мутантные формы (квазивиды). По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2004 г., количество инфицированных ВГС в мире превышало 170 млн человек, из них более 5 млн больных проживали в Европе. Острая клинически выраженная (желтушная) форма ВГС встречается примерно в 20% случаев. Из числа заболевших самовыздоровление наступает в среднем в 15% случаев, у остальной части пациентов (85%) заболевание принимает многолетнее латентное и малосимптомное течение, большей частью остающееся нераспознанным.

Основные жалобы пациентов с ВГС (недомогание, боль в мышцах, тошнота, потеря аппетита) являются неспецифическими и в большинстве случаев слабо выражены либо отсутствуют. Гепатит С чаще всего выявляется случайно, в связи с чем проблема гиподиагностики этого заболевания остается актуальной. По оценкам экспертов, только 30-50% инфицированных лиц своевременно узнают о своем заболевании и получают лечение, что помогает избежать риска передачи вируса и развития серьезных осложнений, таких как цирроз печени или гепатоцеллюлярная карцинома. Обследованию на ВГС подлежат все пациенты с повышенным уровнем печеночных трансаминаз, хроническими заболеваниями печени неясной этиологии, лица из групп риска (потребители инъекционных наркотиков, реципиенты крови или ее компонентов, лица с рискованным сексуальным поведением и пр.).

Для диагностики ВГС в настоящее время используют как серологические, так и молекулярно-генетические методы исследования. Серологические тесты третьего поколения, позволяющие обнаружить антитела к HCV (анти-HCV) с чувствительностью более 99%, успешно применяют для диагностики хронического гепатита. В случае выявления анти-HCV для дальнейшей дифференциации хронического гепатита и перенесенной инфекции необходимо определение вирусной РНК. При остром вирусном гепатите использование серологического скрининга считается нецелесообразным из-за позднего появления антител после инфицирования, в то время как вирусная РНК может определяться в крови пациента уже спустя несколько дней после заражения. Из-за значительных колебаний концентрации РНК в остром периоде существует вероятность ложноотрицательного результата, что может потребовать повторного тестирования больного с подозрением на острый ВГС. Количественное определение уровня РНК HCV имеет важное значение для подбора противовирусной терапии (ПВТ), оценки ее продолжительности и вирусологического ответа. После выявления ВГС у пациентов, которым требуется терапия, необходимо провести генотипирование вируса, поскольку современные рекомендации по лечению ВГС определяют длительность терапии и дозу рибавирина в зависимости от генотипа. Морфологические методы исследования биоптатов печени, такие как иммуногистохимия, гибридизация *in situ*, не играют существенной роли в диагностике ВГС из-за их низкой чувствительности, специфичности и эффективности по сравнению с молекулярно-биологическими и серологическими методами.

В современной клинической практике антитела к нескольким эпитопам HCV определяются с помощью тест-систем для иммуноферментного (ИФА) или иммунохемилюминисцентного (ИХЛА) анализа второго или третьего поколения. Тест-системы первого поколения, используемые для выявления антител к HCV в сыворотке крови пациента, были разработаны на основе вирусного эпитопа NS4 участка (С-100) и имели чувствительность около 70-80% и низкую специфичность. Антитела к вирусному антигену С-100 появлялись в крови спустя 16 нед после заражения. Тест-системы второго поколения были дополнены возможностью обнаруживать антитела, направленные против эпитопов ядерного (корового) вирусного антигена (С-22) и NS3 участка (С-33), что привело к повышению чувствительности до 95% и снижению

количества ложноположительных результатов. Благодаря использованию этих тест-систем специфические антитела стало возможно определять через 10 нед после инфицирования. Чтобы сузить серологическое окно, производители ввели в тест-систему антиген из NS5 участка вируса и высокоиммуногенную часть эпитопа NS3. Эти усовершенствования обусловили возможность выявлять антитела через 4-6 нед после заражения с чувствительностью более 99%. Большинство представленных на рынке тест-систем обнаруживают суммарные антитела, представленные иммуноглобулинами классов М и G. Исследование на анти-HCV класса М с диагностической целью считается нецелесообразным, так как позволяет провести раннюю диагностику ВГС лишь у небольшой части пациентов. Это связано с тем, что не все больные острым ВГС реагируют на инфекцию выработкой анти-HCV IgM, а многие пациенты с хроническим ВГС периодически их продуцируют. Специфичность серологической диагностики HCV трудно определить в связи с отсутствием золотого стандарта. Тем не менее существуют доказательства того, что ложноположительные результаты чаще наблюдаются среди лиц с положительным ревматоидным фактором и в группе аутоиммунных заболеваний. Для подтверждения результатов ИФА/ИХЛА разработаны несколько видов систем иммуноблоттинга, однако эти тесты потеряли свое клиническое значение в связи с разработкой высокочувствительных и специфичных молекулярно-биологических методов. Иммуноблоты могут использоваться для уточнения статуса положительных пациентов, однако необходимо помнить, что чувствительность этих тестов ниже по сравнению с ИФА/ИХЛА, так что существует риск ложноотрицательных результатов у HCV-инфицированных лиц. Ложноотрицательные серологические тесты могут наблюдаться у пациентов, находящихся на гемодиализе, и у лиц с выраженной иммуносупрессией (например, при СПИДе, некоторых гемобластозах).

Возможность обнаружения в крови ядерного антигена HCV (HSCoAg) с целью диагностики и мониторинга ВГС является более дешевым методом и потому очень привлекательной альтернативой молекулярно-генетическим технологиям. Однако при разработке надежного и чувствительного метода выявления HSCoAg ученые сталкиваются с рядом трудностей, которые связаны с синтезом специфических моноклональных антител для выявления различных субтипов вируса и необходимостью высвобождения вирусных частиц из циркулирующих иммунных комплексов. Первые тест-системы для определения HSCoAg появились на рынке Европы и США около 10 лет назад. Они обладали достаточно высокой специфичностью (более 95,5%), не зависели от генотипа вируса и имели приемлемую внутри- и межсерийную вариабельность (коэффициент вариации 5-9%). С помощью этих тест-систем вирусный антиген можно было выявить уже через 1-2 дня после обнаружения РНК. Порог чувствительности составлял 1,5 пг/мл, что соответствовало вирусной нагрузке 10 000-50 000 МЕ/мл. Однако клинические испытания этой тест-системы продемонстрировали ограниченные возможности выявления HSCoAg с целью подтверждения диагноза ВГС у серопозитивных пациентов, вследствие чего она была отозвана с рынка. Позднее была разработана усовершенствованная версия, которая включала в себя 5 различных антител к ядерному антигену вируса, что позволило повысить специфичность до 99,8% и способность выявлять более низкие уровни антигенной нагрузки, соответствующие 600-1000 МЕ/мл РНК HCV. В связи с неполной корреляцией с концентрацией РНК и отсутствием необходимой доказательной базы, для оценки эффективности данного теста запланированы проспективные исследования.

Прямое обнаружение вируса в современных лабораториях проводят с помощью молекулярно-биологических технологий, в частности методов амплификации нуклеиновых кислот. Для установления факта инфицированности пациента (биоматериала) используют качественные реакции, для определения концентрации возбудителя – количественные. Среди качественных тестов наибольшее распространение получили обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) и транскриптопосредованная амплификация (transcription-mediated amplification, TMA). ОТ-ПЦР основана на использовании вирусной РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарного ей участка ДНК (кДНК) с помощью

обратной транскриптазы и последующей амплификации кДНК. ОТ-ПЦР способна выявлять концентрацию РНК около 50 МЕ/мл с равной чувствительностью для всех генотипов. Метод TMA за счет повторного вовлечения в циклы амплификации помимо кДНК транскриптов РНК обеспечивает чрезвычайно высокую чувствительность реакции, нижний порог обнаружения которой составляет 5-10 МЕ/мл, и специфичность свыше 99,5% независимо от генотипа вируса. Однако это методика более дорогостоящая и требует большого количества образца.

Количественная оценка вирусной нагрузки может быть выполнена с использованием технологий целевой амплификации нуклеиновых кислот (конкурентная ПЦР либо ПЦР в режиме реального времени) или с помощью метода разветвленной ДНК-гибридизации (branched DNA, bDNA). Технические характеристики, пределы выявления и линейный динамический диапазон обнаружения этих методов различаются. Конкурентная ПЦР представляет собой амплификацию кДНК исследуемой пробы и внутреннего стандарта в одной пробирке. Последний имеет известную начальную концентрацию РНК, что позволяет при сравнении конечного количества обоих продуктов реакции рассчитать концентрацию РНК HCV исследуемого образца. Этот метод имеет нижний лимит детекции 500 МЕ/мл и является линейным в диапазоне до 500 000 МЕ/мл со специфичностью около 100% независимо от генотипа вируса. При более высоких концентрациях вирусной РНК необходимо предварительное разведение плазмы. Метод bDNA основан на технологии усиления сигнала. Нижний предел обнаружения используемых в настоящее время тест-систем недостаточно чувствителен и составляет 615 МЕ/мл с линейностью до 8 000 000 МЕ/мл вне зависимости от генотипа. Преимуществом этого метода является малое количество материала для исследования (50 мкл). Технология ПЦР в режиме реального времени (real-time ПЦР) обеспечивает оптимальные условия обнаружения РНК HCV и оценки ее количества благодаря очень низкому пределу чувствительности и широкому диапазону линейности. Отличительной чертой real-time ПЦР является возможность одновременного проведения амплификации и детекции продукта реакции, что обеспечивает возможность осуществления непосредственного контроля за процессом ее протекания. Количественный результат получают путем сравнения кинетики амплификации внутреннего стандарта с известной концентрацией РНК и исследуемой пробы. На сегодняшний день разработаны высокоэффективные и практически полностью автоматизированные аналитические системы real-time ПЦР, которые постепенно вытесняют из диагностической практики такие методы, как TMA, bDNA и конкурентная ПЦР.

До 1997 г. результаты количественного определения HCV, выполненные на тест-системах разных производителей, существенно различались. Так как точное измерение вирусной нагрузки является важным компонентом в процессе лечения ВГС, ВОЗ установила единый международный стандарт (консервативную последовательность РНК 1 генотипа HCV) и единицы измерения концентрации РНК HCV (МЕ/мл). Все имеющиеся на рынке сертифицированные тест-системы для количественной оценки РНК HCV откалиброваны по утвержденному ВОЗ стандарту. В связи с большим количеством зарегистрированных случаев занижения или завышения результатов при инфицировании другими генотипами HCV, в последние годы ученые проводят исследования по усовершенствованию имеющихся технологий.

Для генотипирования HCV используются методы прямого секвенирования генома и обратной гибридизации, аналитическая система для real-time ПЦР находится в процессе оптимизации.

Таким образом, несмотря на высокий темп развития современных лабораторных технологий, возможности специфической диагностики ВГС достаточно ограничены. При подозрении на ВГС следует провести исследование на антитела к HCV (тест-система третьего поколения) и вирусную РНК (качественный тест с уровнем детекции не менее 50 МЕ/мл или real-time ПЦР). Необходимо помнить о вероятности ложноположительных и ложноотрицательных результатов, связанных с техническими возможностями методов, особенностями инфекционного процесса, иммунным статусом пациента.

Подготовила **Александра Яковец**