

7. Kavanagh K. *New insights in medical mycology*. Springer, – 2009. – 304 С.

8. Сергеев А.Ю., Богуш П.Г., Земляная Н. Ю., Щербо С.Н., Лещенко В.М., Жарикова Н.Е., Мокина Е.В. *Первый опыт прямой ПЦР диагностики дерматофитии ногтей. Успехи медицинской микологии*. М. – 2004, – Т. 3, – С. 339–342

9. Сергеев В.Ю. *Молекулярная диагностика онихомикозов: опыт внедрения отечественной ПЦР-системы обнаружения возбудителей дерматофитии ногтей*. // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. – 2007. – № 3 – С. 17–24

10. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. *Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, диагностика и лечение*. М.: Триада-Х. – 2000, – 472 с.

11. Maertens J., Marr K. *Diagnosis of Fungal Infections*. Informa Healthcare, – 2007, – 408 с.

12. Лепихина Д.Н. *Компьютерная томография в диагностике и дифференциации пневмомикозов // Мат. третьего всероссийского конгресса по медицинской микологии*. Москва. Национальная Академия Микологии. – 2005. – Т VI. – С. 77–79.

13. Сергеев А. Ю. *Индекс для клинической оценки онихомикоза и расчета продолжительности терапии системными антимикотиками*. М. – 1999. – 44 с.

14. Сергеев А. Ю. *Грибковые заболевания ногтей*. 2-е издание. М.: Национальная академия микологии – Медицина для всех. – 2007. – 164 С.

15. Сергеев Ю.В., Шпигель Б.И., Сергеев А.Ю. *Фармакотерапия микозов*. М. 2003: «Медицина для всех»: – 200 с.

16. Wingard J., Anassie E. *Fungal Infections in the Immunocompromised Patient*. Informa Healthcare. – 2005. – 704 с.

Клинико-эпидемиологические аспекты латентной HBV-инфекции

Н.И. Громова, И.В. Гордейчук*, К.К. Кюрегян*, Л.Ю. Ильченко*, М.И. Михайлов*

ФГУ «Поликлиника №1» УД Президента РФ,
Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им.М.П.Чумакова РАМН *

С целью изучения частоты латентной HBV-инфекции среди пациентов с хроническими заболеваниями печени было проведено исследование ДНК вируса гепатита В методом полимеразной цепной реакции в крови пациентов с хроническим гепатитом С, 60% которых имели в крови маркеры ранее перенесенной HBV инфекции. В исследуемой группе (n=216) ни у одного пациента ДНК вируса гепатита В не была обнаружена. В то же время в контрольной группе больных (n=50) с хроническим гепатитом В ДНК вируса гепатита В выявлена у 48 (96%) из 50 пациентов. Для уточнения возможности диагностики латентной HBV-инфекции на основании определения ДНК вируса гепатита В в крови необходимы параллельные морфологические и молекулярно-биологические исследования.

Ключевые слова: вирусные гепатиты, латентная HBV-инфекция, ПЦР –диагностика, эпидемиологические аспекты вирусных гепатитов.

To reveal the incidence of latent HBV-infection among patients with chronic liver diseases hepatitis B virus DNA in the blood of patients with chronic hepatitis C using the technique of PCR reaction have been studied. 60% of these patients had markers of earlier HBV infection in their blood. In the studied group (n=216) none of the patients had DNA of hepatitis B virus. While in the control group (n=50) in patients with chronic hepatitis B DNA of hepatitis B virus was revealed in 48 patients (96%). To specify possibilities of diagnosing latent HBV infection using the technique of determining DNA of hepatitis B virus in the blood parallel morphological and molecular-biological investigations must be performed.

Key words: viral hepatitis, latent HBV-infection, PCR-reaction, diagnostics, epidemiological aspects of viral hepatitis.

Интерес к проблеме так называемого латентного (скрытого, оккультного) гепатита В (ГВ) обусловлен значением этой формы инфекции для оценки степени тяжести пациентов, в крови которых имеются маркеры, указывающие на наличие в прошлом контакта с вирусом гепатита В (ВГВ). Кроме того, изучение латентного ГВ помогает уточнить механизм иммунного ответа на проникновение вирусного агента в организм человека.

В клинике инфекционных заболеваний хорошо известны вирусные инфекции, при которых после клинического выздоровления, несмотря на появление в крови специфических антител к возбудителю болезни, вирус сохраняется в тканях, лимфатической системе и крови в очень небольших количествах, часто ниже уровня чувствительности диагностических методов, в т.ч. метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). К таким инфекциям относятся инфекционный мононуклеоз, ветряная оспа, герпетическая и цитомегаловирусная инфекции.

В случае существенного снижения иммунитета под действием различных факторов (приема иммуносупрессивных препаратов, ВИЧ-инфицирования и др.) возбудители этих заболеваний способны к реактивации и развитию клинической картины болезни, подчас более выраженной, чем при первичном заражении. Так, реактивация цитомегаловирусной и герпетической инфекций у реципиентов после трансплантации органов является серьезной проблемой трансплантологии. После перенесенной в детстве ветряной оспы, возбудитель заболевания — вирус herpes zoster (HZV) вызывает у лиц старше 60 лет опоясывающий лишай, развитие которого является маркером сниженного иммунитета. Типичным примером реактивации возбудителей «оппортунистических» инфекций является стадия СПИД у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Закономерно предположить, что ВГВ также может сохраняться в неопределяемых современными методами количествах в организме человека после перенесенного ГВ в

желтушной или безжелтушной (субклинической) форме. При вирусных инфекциях клиническое выздоровление означает, вероятно, не столько избавление организма от возбудителя болезни, сколько развитие состояния устойчивого контроля иммунной системы над ним. Изучение латентной HBV-инфекции может помочь выявлению общих закономерностей формирования иммунного ответа при других вирусных заболеваниях человека.

По определению членов EASL «скрытая HBV-инфекция» характеризуется «обнаружением ДНК ВГВ в ткани печени при отсутствии HBsAg в сыворотке крови». M. Torbenson и D.L. Thomas в 2002 г опубликовали данные о выявлении ДНК ВГВ в ткани печени пациентов, у которых в 20% случаев в крови не определялся ни один из серологических маркеров HBV-инфекции, в 50% случаев в крови имелись антитела к HBcAg (в присутствии анти-HBs или без них) и в 35% — антитела к HBsAg (в присутствии анти-HBc или без них). В связи с этим авторы разделили скрытый ГВ на серопозитивный и серонегативный варианты (в последнем случае в сыворотке крови пациентов не выявлялись ни анти-HBc, ни анти-HBs). Уровень ДНК ВГВ оказался наиболее высок у пациентов, позитивных по anti-HBc и негативных по anti-HBs. Авторы считают, что такие пациенты с наибольшей вероятностью способны передавать HBV-инфекцию другим [17].

Основным методом диагностики скрытого ГВ является определение ДНК ВГВ в ткани печени. Однако проведение биопсии печени не всегда возможно, а методы выявления ДНК ВГВ в ткани печени не стандартизованы. В связи с этим для диагностики скрытого ГВ применяют методы исследования крови с высокой чувствительностью и специфичностью. По мнению Hollinger F. B. и Sood G. оптимальным является определение ДНК ВГВ в сыворотке крови при помощи двухступенчатой ПЦР в реальном времени [7, 8]. «Золотым стандартом» подтверждения результатов ПЦР является метод секвенирования.

Материалы и методы исследования

С целью обнаружения латентной HBV-инфекции нами было проведено исследование маркеров ВГВ (HBsAg, анти-HBs, анти-HBc IgG методом ИФА и ДНК ВГВ методом ПЦР) в группе больных (n=216) с хроническим гепатитом С (ХГС) без тяжелых сопутствующих заболеваний, не получавших противовирусную и иммуносупрессивную терапию. При повторных исследованиях в крови пациентов HBsAg не обнаруживался.

Контрольную группу составили 50 пациентов с хроническим гепатитом В (ХГВ) и носители HBsAg.

В исследуемой группе у 216 пациентов (133 мужчин и 83 женщин) проведен анализ 279 сывороток (57 пациентам произведено исследование сывороток крови дважды в разные сроки наблюдения). Средний возраст пациентов составил 37,5 лет. Длительность наблюдения пациентов составляла 5 лет.

Определение ДНК ВГВ проводили методом ПЦР с праймерами к консервативному участку S-гена генома ВГВ с чувствительностью 75 копий/мл по результатам тестирования серии предельных разведений образцов с известной концентрацией ДНК ВГВ. Выделение ДНК из образцов сыворотки крови проводили методом экстракции фенол-хлороформом с использованием набора производства НПО «ЛИТЕХ» по протоколу производи-

теля. Амплификацию проводили с «вложенными» праймерами к участку S-гена ВГВ, перекрывающему «а»-детерминанту, предложенными Basini и Carman.

Для подтверждения специфичности выявления ДНК ВГВ и поиска мутаций в кодирующем HBsAg участке генома ВГВ, приводящих к отрицательному результату при выявлении HBsAg в стандартных тест-системах иммуноферментного анализа (ИФА), определяли нуклеотидную последовательность амплифицированного участка S-гена. Продукт ПЦР величиной 713 нт вырезали из геля и выделяли из агарозы с помощью набора QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN). Секвенирование проводили с использованием набора GenomeLab Methods Development kit (Beckman Coulter) в анализаторе CEQ 8800 (Beckman Coulter). Полученные последовательности сравнивали с референсными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank, соответствующими «дикому типу» ВГВ и мутантным формам, несущим аминокислотные замены в «а»-детерминанте HBsAg.

Результаты и обсуждение

В исследуемой группе пациентов с ХГС (n=216) 88 чел. (40,74%) не имели в крови маркеров HBV-инфекции. У 55 человек (25,46%) в крови были обнаружены анти-HBs и анти-HBscore IgG, что свидетельствует о перенесенном ранее ГВ (в большинстве случаев в скрытой безжелтушной форме) и формировании иммунного ответа на заболевание.

Так называемые, «изолированные» анти-HBscore (при отсутствии анти-HBs) обнаружены в крови 50 пациентов (23,15%). У 23 человек (10,65%) в крови определялись только анти-HBs, из них 5 человек вакцинированы против ВГВ, однако большинство (18 человек) отрицают факт вакцинации. Поскольку у пациентов отсутствовали клинические показания к биопсии печени, исследование ДНК ВГВ в ткани печени не проводилось.

В исследуемой группе ни у одного пациента в крови методом ПЦР ДНК ВГВ обнаружена не была (табл. 1).

Таблица 1

Выявление маркеров HBV-инфекции в группе больных ХГС (n=216)

маркеры HBV-инфекции	Число больных	% выявления маркеров HBV-инфекции	ДНК HBV в сыворотке
маркеры HBV-инфекции не обнаружены	88	40,74%	0
анти-HBs и анти-HBscore	55	25,46%	0
только анти-HBscore	50	23,15%	0
только анти-HBs	23	10,65%	0
Всего	216	100%	0

В контрольной группе у всех 50 пациентов в крови обнаруживался HBsAg, из них у 48 человек в крови была выделена ДНК ВГВ методом ПЦР, у двух пациентов с диагнозом: «носительство HBsAg» ДНК ВГВ в крови не была обнаружена (табл. 2).

Положительный результат теста на ДНК ВГВ подтверждает наличие у данного лица скрытого ГВ, тогда как отрицательный результат может быть следствием нескольких причин: недостаточной чувствительности

Таблица 2

Определение ДНК HBV методом ПЦР в сыворотке больных ХГС и ХГВ

нозологические формы	число больных	HBsAg	ДНК HBV в сыворотке методом ПЦР	% выявления ДНК HBV
ХГС (исследуемая группа)	216	0	0	0 %
ХГВ (контрольная группа)	50	50	48	96 %

используемого метода ПЦР, ложноположительного результата исследования крови на маркеры HBV-инфекции или блокирования по каким-то причинам вирусных частиц в клетках печени.

Учитывая высокую чувствительность использованных нами в данном исследовании методов диагностики HBV-инфекции, мы уверены в полученном результате и считаем, что отсутствие ДНК ВГВ в сыворотке пациентов исследуемой группы не исключает «скрытой HBV-инфекции» и указывает на необходимость морфологического подтверждения данного диагноза. Поскольку имеющиеся сведения по изучаемой нами проблеме противоречивы, мы сочли необходимым подробнее остановиться на данных литературы по этому вопросу.

В настоящее время считается, что формирование латентной формы ГВ обусловлено особенностями репликации вируса — прежде всего, формированием ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК) в форме мини-хромосомы, связанной с белками в ядре инфицированных гепатоцитов. КзкДНК является матрицей для последующего формирования новых вирионов. Она очень стабильна и обладает устойчивостью к энзиматическому расщеплению, а также к известным в настоящий момент противовирусным лекарственным средствам. Наличие кзкДНК в ядрах гепатоцитов является основой для длительного персистирования ВГВ. Количество копий кзкДНК коррелирует с уровнем ДНК ВГВ в сыворотке крови и является наименьшим у пациентов со скрытым ГВ [18].

В среднем в печени человека имеется $2 \cdot 10^{11}$ гепатоцитов, при HBV-инфекции от 5 до 40% из них содержат вирус. Низкий уровень репликации ДНК ВГВ может являться следствием влияния факторов, связанных с иммунным ответом хозяина, а также результатом присутствия дефектных вирусных частиц и мутаций в участках, отвечающих за контроль транскрипции [7,10]. Кроме того, серонегативность по HBsAg может быть связана с формированием иммунных комплексов между HBsAg и anti-HBs или супрессией вирусной репликации, вызванной суперинфицированием вирусами гепатитов С и D [5,9].

По мнению F.V. Hollinger, в западных странах, например в США, где только 5% населения в течение жизни встречались с ВГВ, распространенность скрытого ГВ среди HBsAg-негативных и anti-HBs-позитивных (\pm anti-HBs) доноров крови составляет 2,4%. В схожих группах доноров, проживающих на эндемичных территориях, где с ВГВ встречались 70 — 90% населения, распространенность скрытого ГВ достигает 6% [7].

В 2008г Л.Р. Идрисова исследовала частоту обнаружения латентной HBV-инфекции в группе больных из 59 человек с хроническими заболеваниями печени (ХГС, аутоиммунным и алкогольным гепатитами). Методом

«гнездой» ПЦР с чувствительностью <103 коп/мл ДНК HBV была выявлена в ткани печени 53% больных [1,2].

Развитие трансплантологии также требует изучения проблемы скрытого ГВ. Так, в исследовании, проведенном H. Marusawa с соавт. 2000 [11], скрытый ГВ был выявлен у 13 из 14 здоровых доноров печени, серопозитивных по anti-HBs и anti-HBs; в то же время, ДНК ВГВ не определялась ни у одного пациента с «изолированными» anti-HBs.

В клинической практике инфекциониста хорошо известна группа пациентов, так называемых «носителей HBsAg», с нормальным уровнем трансаминаз, наблюдения за которыми требуют регламентирующие приказы по профилактике вирусных гепатитов. Среди них есть лица, имеющие HBsAg в крови несколько десятилетий без каких-либо клинических проявлений заболевания печени. Тем более, HBsAg-негативные пациенты с наличием у них специфических антител к ВГВ сегодня считаются здоровыми. Поэтому выявление ДНК ВГВ в низких концентрациях в организме иммунокомпетентных пациентов, перенесших ГВ, а также у лиц без клинических или биохимических проявлений заболевания печени требует дальнейшего изучения и соответствующей клинической оценки [6,11].

Важным является вопрос о том, могут ли такие пациенты быть потенциальными источниками HBV-инфекции. Исследуя возможность передачи инфекции от HBsAg-негативных доноров, R.D. Aach с соавт. в 1974г показали, что переливание крови, в которой определяются anti-HBs, не связано с более высоким риском трансмиссии ВГВ, чем переливание крови, в которой этот маркер отсутствует. Было установлено, что при достаточной концентрации в крови anti-HBs (100 — 200 мМЕ/мл) вероятность трансмиссии ВГВ незначительна [3]. В 2007 г. M. Satake с соавт. [14] обнаружили ДНК HBV у 10 из 37 реципиентов (27%), получавших anti-HBs негативную кровь от донора, имевшего скрытый ГВ. Таким образом, данные литературы указывают на наличие риска трансмиссии ВГВ при переливании anti-HBs-негативной крови доноров со скрытым ГВ. В связи с этим в некоторых странах введено обязательное исследование донорской крови на ДНК ВГВ.

Поскольку вирусы гепатитов В и С имеют общие пути передачи, коинфекция этими вирусами встречается достаточно часто, особенно в эндемичных областях и группах риска по заболеваниям, передающимся парентеральным путем, при этом у них наблюдается повышенный риск формирования цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [12]. K. Shetty и соавт., 2008 [15] было показано, что половина пациентов, имеющих тяжелую форму HCV-инфекции и нуждающихся в пересадке печени, также имеют скрытый ГВ. В ряде исследований было отмечено снижение эффективности терапии интерферонами у больных ХГС на фоне скрытого ГВ, а также ускорение прогрессирования ЦП и печеночной декомпенсации [4,13]. T. Stroffolini с соавт. на основании исследования средней продолжительности периода формирования ГЦК у пациентов со стойким вирусологическим ответом после курса интерферонотерапии было высказано предположение о том, что исчезновение вируса гепатита С может приводить к активизации репликации ВГВ и ускорению образования ГЦК [16]. C.J. Chu с соавт., 2008 [4] утверждает, что

репликация ВГВ в некоторых случаях ответственна за повышение АЛТ у пациентов с ХГС на фоне интерферонотерапии. По их мнению, внезапные значительные подъемы уровня АЛТ на фоне терапии ХГС или сохранение высоких уровней АЛТ по окончании противовирусной терапии должны быть показанием к проведению анализа на скрытый ГВ.

Реактивация ВГВ, сопровождающаяся или не сопровождающаяся развитием гепатита, наиболее часто встречается у anti-HBc-положительных anti-HBs-негативных реципиентов аллогенной гематопоэтической трансплантации стволовых клеток (HSCT). У пациентов после трансплантации клеток от anti-HBs-положительных доноров реактивация ГВ не наблюдалась. Описаны различные механизмы реактивации ГВ на фоне иммуносупрессивной терапии — угнетение функции Т-лимфоцитов, снижение численности В-клеток и повышение уровня репликации вируса.

Вопросы противовирусной терапии с целью профилактики реактивации HBV-инфекции при скрытом ГВ обсуждаются в литературе. Существует мнение о том, что имеющиеся сегодня данные недостаточны для разработки показаний к назначению специфических лекарственных препаратов, а проведение противовирусной терапии может быть отложено до появления определяемого уровня ДНК ВГВ в сыворотке крови пациентов с латентным (скрытым) ГВ.

Заключение

Проведенное исследование позволяет сделать вывод о том, что после перенесенного в клинически выраженной или субклинической форме гепатита В минимальные количества ДНК HBV, вероятно, сохраняются не в клетках крови, а в гепатоцитах, поэтому диагностика латентного гепатита требует морфологического и молекулярно-биологического исследования биоптатов печени. Отсутствие случаев реактивации HBV-инфекции у больных с ХГС в течение 5 лет наблюдения может быть обусловлено исключением факторов иммуносупрессии в исследуемой группе пациентов. При вирусных инфекциях смешанной этиологии вопросы влияния репликации различных вирусов на течение заболевания требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. Идрисова Л.Р. Значение латентной HBV-инфекции в прогрессировании хронических заболеваний печени. Диссерт. канд.мед.наук 2008г.
2. Идрисова Л.Р., Лопаткина Т.Н. Клиническое значение латентной HBV-инфекции в прогрессировании хронического гепатита С. *Клиническая гепатология*. — 2009. № 3. — P. 7–10.
3. Aach R.D., Alter H.J., Hollinger F.B. et al. Risk of transfusing blood containing antibody to hepatitis B surface antigen. *Lancet*. — 1974. — № 2. — C. 190–193.

4. Chu C.J., Lee S.D. Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection: epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*. — 2008. — № 23. — C. 512–520.

5. Franchis R., Meucci G., Vecchi M. et al. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med*. — 1993. — № 118. — C. 191–194.

6. Guidotti L.G., Rochford R., Chung J., Shapiro M., Purcell R., Chisari F.V. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*. — 1999. — № 284. — C. 825–829.

7. Hollinger F.B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion*. — 2008. — № 48. — C. 1001–1026.

8. Hollinger F.B. and Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation *Journal of Viral Hepatitis*. — 2010. — Vol. 17. — P. 1–15.

9. Hoofnagle J.H. Reactivation of hepatitis B. *Hepatology*. — 2009. — Vol. 49. — P. S156–S165.

10. Jeantet D., Chemin I., Mandrand B. et al. Cloning and expression of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays. *J Med Virol*. — 2004. — Vol. 73. — P. 508–515.

11. Marusawa H., Uemoto S., Hijikata M. et al. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology*. — 2000. — Vol. 31. — P. 488–495.

12. Matsuoka S., Nirei K., Tamura A. et al. Influence of occult hepatitis B virus coinfection on the incidence of fibrosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Intervirology*. — 2008. — Vol. 51. — P. 352–361.

13. Mrani S., Chemin I., Menouar K. et al. Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J Med Virol*. — 2007. — Vol. 79. — P. 1075–1081.

14. Satake M., Taira R., Yugi H. et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion*. — 2007. — Vol. 47. — P. 1197–1205.

15. Shetty K., Hussain M., Nei L., Reddy K.R., Lok A.S. Prevalence and significance of occult hepatitis B in a liver transplant population with chronic hepatitis C. *Liver Transplantation*. — 2008. — Vol. 14. — P. 534–540.

16. Stroffolini T., Almasio P.L., Persico M. et al. Lack of correlation between serum anti-HBcore detectability and hepatocellular carcinoma in patients with HCV-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. — 2008. — Vol. 103. — P. 966–972.

17. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*. — 2002. — Vol. 2. — P. 479–486.

18. Werle-Lapostolle B., Bowden S., Locarnini S. et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*. — 2004. — Vol. 126. — P. 1750–1758.