

УДК 616.36-002.14: 578.891-078.33

## ДИНАМИКА ТИТРОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ЛИЦ С ОСТРЫМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Д. М. Попонин<sup>1</sup>, Э. С. Горовиц<sup>2\*</sup>, О. А. Тимашева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Кировская инфекционная клиническая больница, г. Киров,

<sup>2</sup> Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера, г. Пермь,

<sup>3</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Российская Федерация

## DYNAMICS OF SPECIFIC ANTIBODY TITERS TO HEPATITIS C VIRUS PROTEINS IN SUBJECTS WITH ACUTE VIRAL HEPATITIS C AT DIFFERENT STAGES OF INFECTION PROCESS

D. M. Poponin<sup>1</sup>, E. S. Gorovits<sup>2\*</sup>, O. A. Timasheva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kirov Infectious Clinical Hospital, Kirov,

<sup>2</sup> Perm State Medical University named after E. A. Wagner, Perm,

<sup>3</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural Department of Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Цель.** Анализ динамики титров анти-ВГС-IgG к ряду белков вирусного гепатита С (ВГС) в различные периоды острого вирусного гепатита С с помощью разработанной авторами модификации метода иммуноферментного анализа (ИФА).

**Материалы и методы.** С помощью авторской модификации метода ИФА проведено определение титров специфических антител класса G (анти-ВГС-IgG) к белкам вируса гепатита С у 30 больных острым гепатитом С в периоды выраженных клинических проявлений и ремиссии заболевания. Одновременно методом полимеразной цепной реакции определяли концентрацию вирусной РНК (РНК-ВГС). Полученные данные сопоставили методом корреляционного анализа.

**Результаты.** Установлено достоверное увеличение титров изучаемого спектра анти-ВГС-IgG в динамике острого вирусного гепатита С от стадии выраженных клинических проявлений к ремиссии. Выявлено достоверное снижение концентрации РНК-ВГС в динамике инфекционного процесса. Зарегистрирована выраженная корреляционная связь между этими процессами.

**Выводы.** Предлагаемый метод может быть использован для уточняющей диагностики стадии острого вирусного гепатита С.

**Ключевые слова.** Острый вирусный гепатит С, количественный метод ИФА, спектр анти-ВГС-IgG, титр анти-ВГС-IgG, ПЦР в реальном времени, концентрация РНК-ВГС.

© Попонин Д. М., Горовиц Э. С., Тимашева О. А., 2015

e-mail: eduard.gorovitz@mail.ru

тел. 8 (342) 236 44 85

[Попонин Д. М. – врач-бактериолог бактериологической лаборатории; Горовиц Э. С. (\*контактное лицо) – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики; Тимашева О. А. – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов].

**Aim.** To analyze the dynamics of anti-HCV-IgG to a number of HCV proteins in different periods of acute viral hepatitis C using modification of immune-enzyme analysis (IEA) developed by the authors.

**Materials and methods.** The specific class G antibody titers (anti-HCV-IgG) to hepatitis C virus proteins were determined by means of the authors' modification of the method of immune-enzyme analysis in 30 patients with acute hepatitis C (AHC) during the periods of marked clinical manifestations and remission of disease. At the same time, viral RNA (RNA-HCV) concentration was assessed with polymerase chain reaction (PCR). The studied processes were compared with each other using the correlation analysis method.

**Results.** A reliable increase in titers of the studied anti-HCV-IgG spectrum in dynamics of acute viral hepatitis C from the stage of marked clinical manifestations to remission was established; RNA-HCV concentration significantly declined in dynamics of the infectious process. An evident correlation link between these processes was registered.

**Conclusions.** The offered method can be used for more precise diagnosis of the stage of acute viral hepatitis C.

**Key words.** Acute viral hepatitis C, quantitative IEA method, anti-HCV-IgG spectrum, anti-HCV-IgG titer, real time PCR, RNA-HCV concentration.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Вирусный гепатит С относится к числу распространенных заболеваний. В большинстве случаев острый вирусный гепатит С (ОВГС) характеризуется малосимптомным или латентным течением [2]. В этой связи методы лабораторной диагностики приобретают решающее значение в постановке диагноза данного заболевания [4, 5]. Для лабораторной диагностики ОВГС традиционно используются иммуноферментный анализ (ИФА), который основан на выявлении серологических маркеров инфекции, и полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая идентифицировать РНК вируса гепатита С (ВГС) [6]. Несмотря на то что ПЦР является высокоэффективным методом диагностики ОВГС, ее широкое использование в практическом здравоохранении лимитируется необходимостью соответствующего дорогостоящего оборудования [8]. Применяемый в настоящее время качественный вариант ИФА позволяет лишь констатировать факт наличия специфических иммуноглобулинов к вирусу гепатита С [1], поэтому разработка и апробация количественного варианта ИФА, дающего возможность определять титр специфических антител, представляются актуальными.

*Цель настоящего исследования* – анализ динамики титров анти-ВГС-IgG к ряду

белков ВГС в различные периоды ОВГС с помощью разработанной авторами модификации метода ИФА.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 30 пациентов с диагнозом ОВГС (из них 19 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 18 до 43 лет (медиана –  $32,2 \pm 1,4$  г.). В сыворотке крови больных определяли титры спектра анти-ВГС-IgG (core, NS3, NS4, NS5) методом ИФА. Параллельно оценивали концентрацию РНК-ВГС методом ПЦР в реальном времени [8]. Пациенты обследованы в динамике двукратно, с интервалом в 6 месяцев, в периоды выраженных клинических проявлений и ремиссии заболевания. Для оценки титров анти-ВГС-Ig G нами была разработана количественная модификация постановки ИФА на основе тест-системы «ДС-ИФА-анти-НСV-спектр-IgG № 2» производства НПО «Диагностические системы» (г. Н. Новгород, РФ). Анализ проводили следующим образом: предварительно готовили двукратные разведения испытуемых сывороток от 1:2 до 1:8192 и вносили их в планшет. В дальнейшем исследование проводили в соответствии с инструкцией по применению используемой тест-системы [3]. За титр сыворотки для каждого вида анти-ВГС-IgG

принимали наибольшее ее разведение, в котором регистрировали значение оптической плотности, превышающее расчетную критическую величину. Для объективизации полученных результатов обратные значения титров антител были прологарифмированы по основанию 2 с последующим вычислением средней геометрической  $\log_2 x$  (СГ) для всех изученных групп анти-ВГС-IgG. Расчеты выполняли согласно утвержденным инструкциям [7].

ПЦР-анализ проводили с использованием набора «Реал-Бест РНК-ВГС количественный» производства ООО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, РФ) [9].

Для оценки статистической значимости выявленных различий титров анти-ВГС-IgG использовали парный критерий Стьюдента ( $p$ ), применяемый для парных сравнений в выборках среднего и малого объема. При сопоставлении данных ИФА и ПЦР применяли коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ), используемый для сравнения абсолютных и относительных величин в выборках малого объема [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При определении титров анти-ВГС-IgG к белкам вируса (core, NS3, NS4, NS5) у больных ОВГС в период выраженных клинических проявлений было установлено, что в 93,3 % случаев титры анти-core составляют 1:256–1:1024. Титры анти-NS3 у 96,6 % пациентов были в пределах 1:128–1:512. В более низком диапазоне от 1:32 до 1:128 определяли титры анти-NS4 у 90,0 % больных, а титры анти-NS5 в 88,6 % случаев.

В период ремиссии у больных регистрировали нарастание титров специфических иммуноглобулинов ко всем белкам вируса гепатита С. Цифровые значения титров спектра анти-НСV-Ig G у больных составили соответственно от 1:512 до 1:2048 анти-core

в 96,8 % проб, анти-NS3 – в 87,3 %. Титры специфических иммуноглобулинов к NS4 и NS5 в пределах от 1:128 до 1:512 выявляли в 91,3 и 90,8 % проб соответственно.

Результаты определения средней геометрической титра специфических антител к белкам вируса гепатита С в динамике заболевания представлены в табл. 1.

Таблица 1

### Титры анти-ВГС-IgG у больных острым вирусным гепатитом С в различные периоды инфекционного процесса

Структурные белки вируса	Средняя геометрическая титров специфических анти-ВГС-IgG	
	период выраженных клинических проявлений	период ремиссии
core	8,83 ± 0,09	10,00 ± 0,11 *
NS3	8,17 ± 0,14	10,16 ± 0,15 *
NS4	6,33 ± 0,12	8,27 ± 0,13 *
NS5	5,67 ± 0,16	7,87 ± 0,18 *

Примечание: \*  $p < 0,001$ .

Из представленных данных следует, что в период выраженных клинических проявлений высокими были показатели средней геометрической анти-core (8,83 ± 0,09) и анти-NS3 (8,17 ± 0,14), в то же время менее значимыми были значения средней геометрической титров анти-NS4 (6,33 ± 0,12) и анти-NS5 (5,67 ± 0,16).

В период ремиссии эта тенденция сохранилась, но уровни титров всего спектра специфических иммуноглобулинов достигли более высоких значений по сравнению с ранними показателями, причем эти различия были статистически значимыми.

О повышении титра специфических антител к различным белкам вируса гепатита С сообщали и другие исследователи. Однако они использовали полуколичественный анализ, рассчитывая затем коэффициент позитивности [3, 12]. Имеются также данные о нарастании суммарных анти-ВГС иммуноглобулинов в процессе заболевания [6].

Таблица 2

**Изменения концентрации РНК-ВГС у больных ОВГС в различные периоды инфекционного процесса**

Диапазон определяемых значений	Количество РНК-ВГС (копий/мл)	
	период выраженных клинических проявлений	период ремиссии
Минимум	$5,6 \cdot 10^2$	0
Максимум	$7,0 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$
Среднее ( $M \pm m$ )	$(6,81 \pm 3,29)10^5$	$(5,35 \pm 1,97)10^5$

Примечание: •  $p < 0,01$ .

Параллельно с определением титров специфических анти-ВГС-Ig G методом ИФА в сыворотках больных ОВГС регистрировали количество РНК-ВГС методом ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР-анализа представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что в период ремиссии концентрация вируса снижается от  $(6,81 \pm 3,29)10^5$  до  $(5,35 \pm 1,97)10^5$  копий/мл. Эти различия статистически значимы. Аналогичные данные, указывающие на снижение уровня РНК-ВГС в динамике инфекционного процесса, отмечали и другие авторы [10, 11].

В последующем проведено сопоставление динамики уровней титров спектра специфических анти-ВГС-IgG и концентрации РНК-ВГС в различные периоды инфекционного процесса ОВГС. Соотношение этих показателей представлено на рис. 1 и 2.

На диаграмме (рис. 1) отражено достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение концентрации РНК-ВГС и нарастание титра анти-core-IgG в процессе развития заболевания. При этом коэффициент корреляции  $r$  для исследуемых параметров был равен  $-0,79$ . Это свидетельствует о том, что в ходе развития инфекционного процесса у пациентов с ОВГС между концентрацией РНК-ВГС и титром специфических анти-core существует сильная отрицательная корреляционная связь.

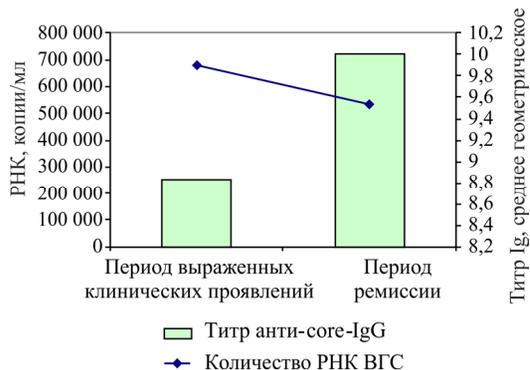


Рис. 1. Динамика титров анти-core-IgG и концентрации РНК-ВГС в зависимости от периода инфекционного процесса при остром вирусном гепатите С ( $n = 30$ )

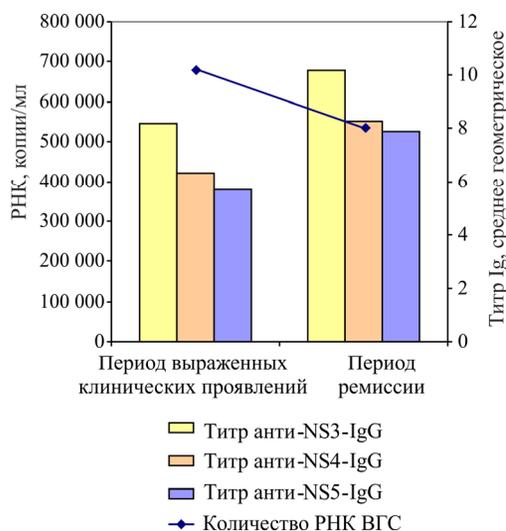


Рис. 2. Динамика титров анти-ВГС иммуноглобулинов к неструктурным белкам вируса и концентрации РНК-ВГС в зависимости от периода инфекционного процесса острого вирусного гепатита С ( $n = 30$ )

Изменения концентрации РНК-ВГС в сопоставлении с динамикой титров специфических анти-ВГС-IgG к NS3-, NS4-, NS5-белкам вируса гепатита С в процессе развития ОВГС представлены на рис. 2.

Данные свидетельствуют о том, что на фоне нарастания титров специфических иммуноглобулинов ко всем изучаемым бел-

кам вируса гепатита С отмечается снижение концентрации возбудителя заболевания. Как и ранее, выявлена сильная отрицательная корреляционная связь между этими параметрами. Так, коэффициент  $r$  между количеством РНК-ВГС и титром анти-NS3 составил  $-0,80$ , между концентрацией РНК-ВГС и титром анти-NS4  $-0,87$ , а между уровнем РНК-ВГС и титром анти-NS5  $r = -0,96$ . Эти данные свидетельствуют о выраженной взаимозависимости между снижением концентрации РНК-ВГС и нарастанием титров анти-ВГС-IgG к неструктурным белкам ВГС в динамике ОВГС.

Таким образом, разработанный количественный метод ИФА для определения титров специфических иммуноглобулинов к различным белкам вируса гепатита С как эффективный и доступный в методическом отношении способ диагностики может быть использован для выявления острого вирусного гепатита С.

### Выводы

1. Разработанная модификация ИФА на основе тест-системы «ДС-ИФА-анти-НСV-спектр» может быть использована для количественного определения анти-ВГС в диагностике ОВГС в различные периоды заболевания.

2. Установлено достоверное нарастание титров спектра анти-ВГС-IgG в динамике острого вирусного гепатита С.

3. Выявлено достоверное снижение концентрации РНК-ВГС в динамике инфекционного процесса при ОВГС (от  $(6,81 \pm 3,29)10^5$  копий/мл в период выраженных клинических проявлений до  $(5,35 \pm 1,97)10^5$  копий/мл в период ремиссии заболевания).

4. Обнаружена выраженная отрицательная корреляционная связь между увеличением титров изучаемого спектра анти-ВГС-IgG и снижением концентрации РНК-ВГС в процессе заболевания.

### Библиографический список

1. Афанасьев А. Ю., Зубов С. В., Жданов Ю. Е., Кривоускова А. В. ИФА-диагностика в разграничении гепатита С острого и хронического течения. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2005; (5) 3; прил. 1: 12.
2. Гепатиты: рациональная диагностика и терапия; под ред. М. Фукса; пер. с нем. под ред. А. О. Буеверова. М.: ГЭОТАР-Медиа 2010; 235.
3. Кишкун А. А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. М.: МИА 2006; 536.
4. Круглов И. В., Огиенко О. Л., Знойко О. О., Финогорова М. П., Янина М. В., Дорошенко Н. В., Шибнев В. А., Семилетов Ю. А. Исследование сероконверсии к различным антигенам вируса гепатита С у больных гепатитом С с различными исходами. Вопросы вирусологии. 2003; 2: 36–40.
5. Круглов И. В., Знойко О. О., Климова Е. А., Финогорова М. П., Алексеенкова Т. И., Янина М. В., Воронаева А. В., Воронаев Е. В., Калинин А. Л., Дорошенко Н. В., Шибнев В. А., Семилетов Ю. А. Выявление типоспецифических анти-НСNS4-антител у больных гепатитом С методом иммуноферментного анализа. Вопросы вирусологии 2003; 3: 32–36.
6. Ламанова Н. И. Особенности иммунного ответа при остром и хроническом гепатите С: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб. 2006; 41.
7. О применении некоторых статистических методов в иммунологических исследованиях: инструктивное письмо № 345 Института иммунологии ФМБА от 15.07.2005. М. 2005; 35.
8. ПЦР в реальном времени; под общ. ред. Д. В. Ребрикова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний 2009; 223
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета

- прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера 2006; 312.
10. Чуланов В. П. Роль полимеразной цепной реакции в диагностике острых вирусных гепатитов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2003; 22.
11. *Isbii S., Koziel M. J.* Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin. Immunol.* 2008; 128: 133–147.
12. *Netski D. M., Mosbrugger T., Depla E., Maertens G., Ray S.C., Hamilton R. G., Roundtree S., Thomas D. L., McKeating J., Cox A.* Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; (41) 5: 667–675.

Материал поступил в редакцию 16.01.2015