

Ярославцева Н.Г.¹, Тихомиров Д.С.¹, Николаева Л.И.², Дедова А.В.², Овчинникова Е.Н.¹, Мисько О.Н.¹, Романова Т.Ю.¹, Махновский П.И.², Гришечкин А.Е.², Туполева Т.А.¹

НИЗКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С ПРИ СЕРОЛОГИЧЕСКИ СЛАБОВЫРАЖЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва;

²Институт вирусологии им. Д.И. Иванова при ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалея» Минздрава России, 123098, г. Москва

Скрытая инфекция, вызванная вирусом гепатита С (ВГС), характеризуется низкой вирусемией. Геном вируса в этом случае может быть обнаружен не в плазме, а в клетках крови и/или ткани печени. При нарушениях гуморального иммунитета могут быть получены сомнительные результаты определения противовирусных антител (анти-ВГС). В статье проведен поиск и анализ серологически слабовыраженных форм ВГС-инфекции. Включены результаты скрининга образцов 30 180 потенциальных доноров крови и 4322 пациентов с заболеваниями системы крови. Проведён сравнительный анализ широкого спектра серологических и молекулярных маркеров ВГС у доноров, пришедших на контрольное обследование, и больных с антителами к одному или двум вирусным белкам. Анализ данных, полученных в ходе исследования, показал, что частота обнаружения сомнительных результатов по анти-ВГС у доноров составила 0,18%. Исследование методами иммунохемилюминесценции и иммуноферментного анализа на анти-ВГС крови доноров, пришедших на контрольное обследование, дало противоположные результаты. В 15,2% случаев была выявлена РНК ВГС в концентрации менее 100 МЕ/мл. У больных с неполным спектром антител к ВГС при контрольном исследовании, выполненном через 5–60 дней, в 40,5% случаев обнаружена РНК ВГС как в высокой (21,4%), так и в низкой (19%) концентрации. В образцах с низкой нагрузкой выявлен низкий титр антител к core-белку. В образцах с высоким титром антител выявлена высокая концентрация РНК ВГС. Дискордантные результаты детекции анти-ВГС свидетельствовали о наличии у потенциальных доноров скрытой ВГС-инфекции, что подтверждалось выявлением РНК ВГС в низкой концентрации в плазме/сыворотке либо клетках крови и указывало на необходимость дополнительного углублённого исследования. У пациентов с заболеваниями системы крови низкая вирусная концентрация РНК ВГС обнаруживалась одновременно с низкими титрами анти-ВГС к одному или двум вирусным белкам.

Ключевые слова: скрытый гепатит С; антитела; доноры крови; пациенты с заболеваниями системы крови.

Для цитирования: Ярославцева Н.Г., Тихомиров Д.С., Николаева Л.И., Дедова А.В., Овчинникова Е.Н., Мисько О.Н., Романова Т.Ю., Махновский П.И., Гришечкин А.Е., Туполева Т.А. Низкие концентрации РНК вируса гепатита С при серологически слабо выраженной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 30-35.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-30-35>

Yaroslavtseva N.G.¹, Tikhomirov D.S.¹, Nikolaeva L.I.², Dedova A.V.², Ovchinnikova E.N.¹, Misko O.N.¹, Romanova T.Yu.¹, Makhnovskiy P.I.², Grishechkin A.E.², Tupoleva T.A.¹

LOW CONCENTRATIONS OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN SEROLOGICALLY MILD INFECTION

¹ National Medical Research Center of Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Occult HCV infection (OCI) provides significant interest recently. HCV RNA in this case can be detected not in plasma, but in blood cells and/or in liver tissue. In case of antibody genesis impairment anti-HCV detection may lead to negative or "uncertain" result. The aim of the study was to estimate infection type in blood donors and patients with hematological diseases by exploration of samples with uncertain anti-HCV detection results. Blood samples of 30 180 potential blood donors' and 4322 patients with hematological diseases were tested. Comparative analysis of wide pattern of HCV markers was performed. 33 blood donors and 42 patients were enrolled in follow-up examination. Uncertain results of Anti-HCV detection in donors' samples were in 0.18% of cases. Follow-up examination of 33 donors provided discordant results using immunochemiluminescence assay and ELISA. 15.2% donors' samples contained HCV RNA in low concentration. Follow-up observation of 42 patients with incomplete antiviral antibody pattern showed HCV RNA presence in 40.5% cases (21.4% high viremia and 19.0% low viremia). Samples with low RNA concentration contained low titers of anti-core antibodies. Samples with high titers of anti-core antibodies contained high HCV RNA level.

Uncertain results of anti-HCV in 15.2% of potential blood donors' samples were confirmed by detection of HCV RNA in low concentration. It proved OCI presence in these individuals and called for testing for wide pattern of HCV markers in addition to routine screening. Patients with hematological diseases showed low level of HCV RNA along with low titers of antibodies against one or two viral antigens.

Keywords: hepatitis C virus; occult HCV-infection; blood donors; patients with hematological diseases.

For citation: Yaroslavtseva N.G., Tikhomirov D.S., Nikolaeva L.I., Dedova A.V., Ovchinnikova E.N., Misko O.N., Romanova T. Yu., Makhnovskiy P.I., Grishechkin A.E., Tupoleva T.A. Low concentrations of hepatitis C virus RNA in serologically mild infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(1): 30-35. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-30-35>

Для корреспонденции: Ярославцева Наталья Гургеновна, канд. биол. наук, ведущий специалист научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и её компонентов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва. E-mail: ngyar@yandex.ru

For correspondence: Natal'ya G. Yaroslavtseva, Ph.D, senior researcher at the virology department, National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation.
E-mail: ngyar@yandex.ru

Information about authors:

Yaroslavtseva N.G., <http://orcid.org/0000-0001-8198-7326>
Nikolaeva L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1323-5568>
Ovchinnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0002-9254-8916>
Romanova T.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-7182-2296>
Grishechkin A.E., <http://orcid.org/0000-0002-4489-6756>

Tikhomirov D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2553-6579>
Dedova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2491-9324>
Misko O.N., <http://orcid.org/0000-0002-4728-2610>
Makhnovskiy P.I., <http://orcid.org/0000-0002-5859-0360>
Tupoleva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 28 December 2017
Accepted 06 March 2018

Введение

Вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано около 104 млн человек, что составляет 2% всего населения Земли [1]. Доля инфицированных лиц колеблется в широком диапазоне значений в зависимости от страны: в Германии анти-ВГС диагностируются у 0,6% взрослого населения, в Испании – у 1,7%, в Италии – у 2%, в Египте средняя частота выявления этих антител составляет 14,7% [1, 2]. При этом в некоторых отдельных регионах Египта она может достигать 22% [3]. В Российской Федерации более 3% населения инфицировано ВГС и прогнозируется дальнейший рост к 2020 г. [4].

Лабораторная диагностика ВГС-инфекции включает определение анти-ВГС в сыворотке или плазме крови и/или РНК ВГС в периферической крови или ткани печени. Обнаружение любого из этих маркеров однозначно указывает на факт наличия инфекции или контакт с вирусом в прошлом. В совокупности с другими клинико-лабораторными данными в зависимости от комбинации лабораторных маркеров ВГС, времени их появления и места их детекции различают несколько типов ВГС-инфекции: острую, хроническую и скрытую. Первые два типа хорошо изучены как у иммунокомпетентных лиц, так и у лиц с нарушениями иммунитета и другой различной сопутствующей патологией.

В последнее десятилетие скрытой ВГС-инфекции уделяется большое внимание. Выделяют 2 типа скрытой ВГС-инфекции – серонегативную и серопозитивную с низким титром и/или неполным спектром антител к отдельным белкам ВГС [5, 6]. Скрытая ВГС-инфекция может характеризоваться наличием в плазме/сыворотке крови небольших концентраций РНК ВГС (менее 100 МЕ/мл), что приводит к отрицательным результатам в недостаточно чувствительных тестах [7], при этом геном вируса может обнаруживаться в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) и/или ткани печени [6]. Скрытая ВГС-инфекция клинически протекает легче, чем хронический вирусный гепатит С, поскольку в патологический процесс вовлечено меньшее количество клеток печени. Тем не менее такая форма инфекции в ряде случаев приводит к фиброзу печени, циррозу и гепатоцеллюлярной карциноме [8]. Согласно многочисленным данным литературы, эта инфекция была обнаружена в различных группах пациентов, в том числе у 10–74% лиц с хроническими заболеваниями печени, криптогенным циррозом и гепатоцеллюлярной карциномой неясной этиологии [6, 7, 9, 10], у больных, получающих регулярную заместительную почечную терапию в 3,7–26,5% случаев [5, 6, 11], у 0,5% реципиентов почечного трансплантата [6], у 10–20% потребителей инъекционных наркотиков [12], у 1,9–20% пациентов

с заболеваниями системы крови [13–16]. Однако данные литературы, посвященной обнаружению скрытой ВГС-инфекции при различных нозологических формах заболеваний системы крови, противоречивы [13–16]. Например, в Египте скрытая ВГС-инфекция была выявлена у 20–27% пациентов, среди которых больные острыми и хроническими лейкозами, ходжкинской и неходжкинской лимфомой, талассемией и другими заболеваниями [14, 15]. В работе исследователей из Ирана, напротив, в аналогичной группе больных доля выявления этой формы инфекции оказалась существенно ниже и составила 1,9% [13]. Таким образом, сравнение этих данных затруднено, а в некоторых случаях некорректно в силу различия дизайна исследования, лабораторной диагностики, изучаемых нозологических форм, критериев включения/исключения пациентов, спектра анализируемого биоматериала.

Низкие концентрации РНК ВГС могут наблюдаться не только при скрытой ВГС-инфекции. В периферической крови и/или гепатоцитах серопозитивных больных хроническим вирусным гепатитом С после антивирусной терапии с устойчивым вирусологическим ответом и у лиц со спонтанным выздоровлением после первичной инфекции также может наблюдаться кратковременная низкая вирусная нагрузка [17, 18]. При скрытой ВГС-инфекции вирусная РНК была выявлена с помощью ультрачувствительных тестов у доноров крови и её компонентов с нормальными уровнями трансаминаз в некоторых странах Европы [19], у 20% доноров Австралии [7], у 2,2% – в Китае [20] и у здоровых лиц (3,3% в Испании и 4% в Египте) [14, 21, 22]. В России аналогичные исследования только начали проводиться.

В некоторых случаях при нарушениях со стороны гуморального звена иммунитета анти-ВГС могут не выявляться вплоть до поздней фазы инфекции, несмотря на длительное персистентное наличие РНК ВГС (т. е. данная ситуация не может быть определена как первичная инфекция и серонегативное окно). Такой тип инфекции получил название «серонегативная» ВГС-инфекция и часто наблюдается при сочетанном инфицировании вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), у пациентов после проведения процедур гемодиализа и/или трансплантации органов. Также описаны случаи выявления этой инфекции у доноров крови и пациентов других категорий [23, 24]. Период сероконверсии при остром гепатите С, обычно составляющий 6–12 нед, иногда может быть удлинён до нескольких лет, что наблюдается у пациентов с иммуносупрессией [25]. Сероконверсия в этом случае происходит гораздо позже, чем при классическом течении инфекции, а профиль антител к отдель-

ным структурным и неструктурным белкам ВГС может иметь неполный набор, т. е. давать неопределенный результат в иммуноферментном анализе (ИФА) и иммуноблоттинге (ИБ) [21]. Некоторые авторы предполагают, что причиной серонегативности являются особые свойства изолятов ВГС, т. е. наличие вирусных вариантов, антигены которых стимулируют продукцию антител, не выявляемых в стандартных серологических тестах [26]. Известно также, что «серонегативная» ВГС-инфекция может развиться в результате «иммунной толерантности» к антигенам ВГС у новорожденных в случае вертикальной передачи вируса [27].

Существование скрытой и серонегативной форм ВГС-инфекции ставит перед службой крови новые задачи. Отрицательные результаты исследования на анти-ВГС и РНК ВГС у доноров крови не исключают риск трансфузионного инфицирования реципиента при переливании компонентов крови [28]. Интерпретация результатов определения анти-ВГС, находящихся в так называемой «серой зоне», представляет особый интерес не только для вирусологии, но и практической медицины.

Целью нашего исследования было выявление и анализ серологически слабовыраженных форм ВГС-инфекции у доноров крови и пациентов, находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Материал и методы

Доноры крови. Исследовано 30 180 образцов крови потенциальных доноров крови и её компонентов, пришедших на донацию с начала 2015 г до апреля 2017 г., на наличие анти-ВГС, HBsAg и антигена/антител к ВИЧ 1-го и 2-го типов (ВИЧ-1/2) методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) на приборе Architect i2000SR с помощью тест-систем «Anti-HCV» («Abbott», Германия), Architect HBsAg qualitative II («Abbott», Ирландия) и HIV Ag/Ab Combo («Abbott», Германия). Образцы, негативные по серологическим маркерам, исследовали на наличие РНК ВГС, ДНК вируса гепатита В (ВГВ) и РНК ВИЧ-1/2 с помощью мультиплексного набора реагентов «Cobas TagScreen MPX Test, version 2.0» («Roche Diagnostics», Германия) на приборе Cobas S201 («Roche», Швейцария) в пулах из 6 проб с чувствительностью для РНК ВГС 40,8 МЕ/мл.

Для интерпретации результатов определения анти-ВГС использовали общепринятое понятие коэффициента позитивности (КП) – отношения полученного значения оптической плотности исследуемого образца в лунке планшета после проведения исследования к критическому значению оптической плотности, рассчитываемому для каждого планшета. Значения КП от 0,9 до 1,0 расценивали как «серую зону». Термин «сомнительный результат» применяли к образцам в случае попадания результата в «серую зону» или получения противоречивых результатов при исследовании в нескольких скрининговых наборах реагентов.

Образцы с положительным или попадающим в «серую зону» результатом определения анти-ВГС дополнительно исследовали на наличие РНК ВГС с помощью наборов реагентов «АмплиСенс-НСV-FL» («ИнтерЛабСервис», РФ), методом ИФА, используя тест-системы «Бест анти-ВГС» («Вектор-Бест», РФ). Подтверждение положительных или сомнительных результатов проводили с помощью тест-систем «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», РФ) и в ИБ «INNO-LIA HCV Score» («Fujirebio Europe», Бельгия). Доноры с неопределен-

ным результатом по анти-ВГС были направлены на контрольное обследование.

Образцы крови 33 потенциальных доноров (17 первичных и 16 повторных), пришедших на контрольное обследование, были проанализированы на широкий спектр серологических и молекулярных маркеров ВГС. Средний возраст этих доноров составил 27,9 года (от 18 до 43 лет), среди них доля мужчин – 75,8%, доля женщин – 24,2%. Временные интервалы контрольных обследований составляли 1–24 мес. Выделение РНК ВГС в образцах этих доноров выполняли из плазмы и ЛПК. ЛПК выделяли из 2–5 мл цельной крови с помощью реагента для предобработки цельной периферической крови «Гемолитик» («ИнтерЛабСервис», Россия). Объем плазмы для выделения РНК составлял 2 мл. Определение РНК осуществляли с помощью наборов реагентов «АмплиСенс-НСV-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия) с чувствительностью 100 МЕ/мл и «РеалБест РНК ВГС» («Вектор-Бест», Россия) с чувствительностью 15 МЕ/мл. Наличие core-антигена ВГС выявляли в тесте «ВГС core-антиген-ИФА-Бест» («Вектор-Бест», Россия).

Пациенты, находящиеся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с февраля 2016 г. по апрель 2017 г. ($n = 4322$), были обследованы на наличие анти-ВГС с помощью наборов «Бест анти-ВГС». Кровь пациентов, у которых анти-ВГС были выявлены впервые, подтверждали в тесте «Бест анти-ВГС-спектр» («Вектор-Бест», Россия) на наличие антител к отдельным структурным и неструктурным белкам ВГС. У 42 пациентов, в крови которых были выявлены антитела только к одному или двум белкам ВГС, через 5 дней–2 мес проводили повторное исследование крови на широкий спектр серологических и молекулярных маркеров ВГС, как описано выше. Средний возраст больных ($n = 42$), включенных в исследование, составил 34,5 года (от 21 до 70 лет), доля мужчин – 69%, женщин – 31%. Основные диагнозы: тяжёлая форма гемофилии А у 19 больных, тяжёлая форма гемофилии В – у 3, лимфомы – у 6, острые лейкозы – у 3, хроническое миелопролиферативное заболевание – у 2, другие заболевания системы крови – у 9. Для выявления HBsAg использовали наборы реагентов «HBsAg-ИФА-Бест (комплект 1 авто)» и «HBsAg-подтверждающий ИФА Бест» («Вектор-Бест», Россия), для диагностики ДНК-ВГВ – «АмплиСенс-НВV-FL» («ИнтерЛабСервис», Россия). Для выявления ВИЧ-инфекции использовали тест-систему «Architect HIV Ag/Ab Combo Reagent» («Abbott», Германия).

Все образцы крови доноров и пациентов, включенных в исследование, не содержали HBsAg, ДНК ВГВ, антигена/антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и РНК ВИЧ.

Результаты

При исследовании образцов крови потенциальных доноров на наличие анти-ВГС в 0,18% (54 из 30180) случаев получены сомнительные результаты. Данные по годам представлены в табл. 1. Всем донорам с сомнительными результатами было назначено контрольное обследование.

Контрольное обследование было проведено у 33 доноров. При этом у 25 из 33 доноров были доступны образцы как ЛПК, так и плазмы/сыворотки крови, а у 8 – только плазмы/сыворотки.

При сравнении данных определения анти-ВГС методами ИХЛА и ИФА в 32 образцах крови доноров (обра-

Таблица 1

Частота встречаемости образцов крови доноров с сомнительным результатом по анти-ВГС по годам

Показатель	2015 г.	2016 г.	2017 г. (01.01–04.04)	Всего
Общее число донаций	12 932	13 632	3616	30 180
Число образцов крови доноров, сомнительных по анти-ВГС, абс (%)	27 (0,21)	23 (0,17)	4 (0,11)	54 (0,18)

зец крови 33-го донора не был протестирован методом ИХЛА) отмечено несовпадение полученных результатов (табл. 2).

В 24 образцах, положительных либо сомнительных в тесте «ARCHITECT anti-HCV», был получен отрицательный результат в тесте «Бест анти-ВГС». При исследовании этих образцов в ИБ не было получено ни одного положительного результата. Остальные 8 образцов, отрицательных в тесте «ARCHITECT anti-HCV», дали 4 положительных и 4 сомнительных результата в тест-системе «Бест анти-ВГС». Данные исследования 8 образцов, положительных и сомнительных в тесте «Бест анти-ВГС», с помощью подтверждающего теста «Бест анти-ВГС-спектр», представлены в табл. 3.

В одном образце крови донора, не исследованного в тесте «ARCHITECT anti-HCV», обнаружены антитела к core-антигену в титре 1:10 и к NS3 в титре 1:5, а результат ИБ был отрицательным. Core-антиген ВГС не был обнаружен ни в одном из 33 исследованных образцов.

РНК ВГС определяли в плазме и ЛПК у 25 доноров и только в плазме у 8 доноров. Результат определения в крови всех 33 доноров был отрицательным при исследовании в тесте с чувствительностью 100 МЕ/мл. При этом РНК ВГС была обнаружена в тесте с чувствительностью 15 МЕ/мл в плазме крови и ЛПК 2 доноров и только в плазме ещё 3 доноров (табл. 4). Из 5 РНК-положительных образцов доноров сыворотки 4 были позитивны в тесте «ARCHITECT anti-HCV» с КП от 1,03 до 3,5 и негативны в «Бест анти-ВГС-спектр», а в 5-м образце, несмотря на отрицательный результат в тесте «ARCHITECT anti-HCV», были выявлены антитела только к одному антигену NS4ab в титре 1:5, что по рекомендации производителя расценивается как сомнительный результат. Определение core-антигена дало отрицательный результат в 4 образцах и сомнительный («серая зона») в одном образце при наличии РНК ВГС в плазме и ЛПК.

При исследовании 4322 образцов крови больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, анти-ВГС были выявлены в 512 (11,8%) образцах. Из них в 216 этот маркер был выявлен впервые. Для подтверждения положительного результата эти образцы были исследованы на наличие антител к различным белкам ВГС в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр». Анти-ВГС к одному и двум вирусным белкам были обнаружены в 74 (34,%) из 216 случаев. Результаты представлены в табл. 5.

Повторно взятые образцы крови от 42 больных через интервалы от 5 дней до 2 мес после первичного выявления антител только к одному (core, NS3, NS4) или двум (core + NS3 и core

+ NS4ab) белкам ВГС исследовали на анти-ВГС, а также на наличие core-антигена и РНК ВГС. У 17 (40,5%) из 42 больных была обнаружена РНК ВГС, при этом у 9 (21,4%) в высокой концентрации от $1,3 \cdot 10^5$ до $1,7 \cdot 10^7$ МЕ/мл, а у 8 (19,0%) в низкой – менее 100 МЕ/мл.

Был проведен анализ спектра серологических и молекулярных маркеров ВГС у 42 больных и 9 доноров, в крови которых выявлены антитела к одному или нескольким вирусным белкам. Результаты представлены в табл. 6. Вирусный геном был выявлен в 18 (35,3%) образцах, из них в 9 (17,6%) образцах концентрация вирусной РНК была низкой (менее 100 МЕ/мл) и в 9 (17,6%) образцах находилась в области высоких значений (более 10^5 МЕ/мл). Низкая концентрация РНК ВГС выявлялась в образцах крови пациентов с антителами к core-белку в титрах 1:5–1:320, а также с антителами только к NS3 в титре 1:5 и только к NS4ab в титре 1:5–1:80. Также низкая вирусная нагрузка зафиксирована в образцах двух анти-ВГС-положительных доноров с антителами ко всем вирусным белкам. Высокая вирусная нагрузка (более 10^5 – 10^6) обнаруживалась в образцах с более высокими титрами (более 1:320) антител только к core-белку либо в комбинации с антителами к NS-белкам.

Обсуждение

Результаты выявления анти-ВГС при скрытой ВГС-инфекции могут быть отрицательными либо сомнительными (в том числе находиться в «серой зоне»), поскольку противовирусные антитела присутствуют в низких титрах [5, 6, 29]. При таком типе инфекции вирусная РНК в плазме/сыворотке крови содержится в небольших концентрациях и может быть не обнаружена при использовании недостаточно чувствительных тест-систем. С более высокой вероятностью она может быть выявлена в ЛПК и/или гепатоцитах [5, 6]. В ходе нашего исследования были получены данные, подтверждающие это. В образцах крови 5 из 33 доноров с сомнительным результатом по анти-ВГС в трех тестах (ИХЛА, ИФА и ИБ) была

Таблица 2

Дискордантные результаты определения анти-ВГС методами ИХЛА и ИФА (n = 32)

Число образцов	«ARCHITECT anti-HCV»			«Бест анти-ВГС»		
	анти-ВГС обнаружены	анти-ВГС-сомнительный результат	анти-ВГС не обнаружены	анти-ВГС обнаружены	анти-ВГС-сомнительный результат	анти-ВГС не обнаружены
18	18 (56,2%)			18 (56,2%)		
6	6 (18,8%)			6 (18,8%)		
8	8 (25,0%)		4 (12,5%)	4 (12,5%)	0	

Таблица 3

Анализ положительных и сомнительных по анти-ВГС образцов в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр» и ИБ

Образцы	Титры* анти-core-IgG	Титр анти-NS3-IgG	Титр анти-NS4ab-IgG	ИБ
Положительные, n = 3	1:5–1:80	Отр.	Отр.	Отр.
Положительный, n = 1	1:10	Отр.	1:10	Неопред. (NS4+)
Сомнительные, n = 3	Отр.	Отр.	1:5 – у двух 1:80	Отр. Неопред. (NS4+)
Сомнительный, n = 1	Отр.	1:5	Отр.	Отр.

Примечание. * – титр начального разведения 1:2,5.

Таблица 4

Выявление РНК ВГС в тесте с чувствительностью 15 МЕ/мл в 33 образцах крови доноров, сомнительных по анти-ВГС

Материал для тестирования РНК ВГС	Количество образцов с РНК ВГС в ЛПК и/или плазме, абс (%)		
	количество образцов с РНК ВГС	плазма «+» клетки «+»	плазма «+» клетки «-»
Плазма и клетки	4	2 (6,1)	2 (6,1)
Только плазма	1	0	1
Всего	5 (15,2)	2 (6,1)	3 (9,1)

Таблица 5

Частота выявления антител к отдельным белкам ВГС и их сочетания в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови

Число больных, с антителами к ВГС	Количество больных с антителами к одному антигену ВГС, абс (%)				Количество больных с антителами к двум антигенам ВГС core + NS3 или core + NS4ab
	core	NS3	NS4ab	NS5a	
216	37 (17,1)	7 (3,2)	12 (5,6)	0	18 (8,3)

выявлена РНК ВГС в концентрации менее 100 МЕ/мл. Доля скрытой ВГС-инфекции среди таких доноров в нашем исследовании составила 15,2%, что коррелирует с данными других исследователей. В небольшом числе работ, посвящённых поиску скрытой ВГС-инфекции у доноров и выполненных на выборках различного размера, доля лиц со скрытой ВГС-инфекцией сильно различается: 2 случая на 5,67 млн [19], 10 (2,2%) из 458 [20], 1 (20,0%) из 5 [30].

Углублённое исследование образцов с дискордантными результатами определения анти-ВГС методами ИХЛА, ИФА и ИБ показало, что такие образцы могут содержать вирусную РНК. Так, в образцах крови 4 доноров, собранных во время контрольного обследования, была обнаружена РНК ВГС, при этом анти-ВГС выявлялись методом ИХЛА (КП от 1,03 до 3,5), но не выявлялись в ИФА и ИБ. Ещё один образец, содержащий вирусную РНК в низкой концентрации, был отрицательным в ИХЛА и ИБ, но по-

ложительным в ИФА в тесте «Бест анти-ВГС». При исследовании этого образца в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр» обнаружены антитела только к NS4 в титре 1:5.

Ранее J.A. Quiroga и соавт. [30] были выявлены различия в обнаружении анти-ВГС в тестах ИХЛА и ИФА при исследовании образцов крови случайных первичных доноров в Испании. При исследовании 2012 образцов крови первичных доноров, негативных при скрининге методом ИХЛА, с помощью ИФА теста, сконструированного на основе пептида из консервативного региона core-антигена, этими же авторами было выявлено 42 (2,1%) позитивных образца. В 3 (7,1%) из них с небольшими титрами антител в сыворотке/плазме крови выявлена РНК ВГС в концентрации менее 100 МЕ/мл, тогда как ни у одного из 100 анти-core-негативных доноров РНК ВГС не обнаружена. Авторы делают вывод, что присутствие у донора антител к core-антигену может указывать на наличие скрытой ВГС-инфекции. В нашей работе у 3 (9,1%) из 33 доноров, образцы которых были отрицательны в ИХЛА, при углублённом исследовании выявлены антитела к core-антигену в титрах от 1:5 до 1:160. Ещё у 2 доноров, кроме антител к core-антигену, были обнаружены антитела к NS3 или NS4ab. Однако ни у одного из этих доноров ни в плазме, ни в ЛПК не удалось обнаружить РНК ВГС.

Анализ спектра серологических и молекулярных маркеров ВГС в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови и доноров показал, что РНК ВГС может быть обнаружена в низкой концентрации (менее 100 МЕ/мл). У 5 (11,9%) из 42 пациентов с заболеваниями системы крови низкая концентрация вирусной РНК была обнаружена одновременно с наличием антител к core-антигену ВГС. При этом у 4 из них титр антител к этому белку находился в области низких значений (1:5–1:320), причем у 2 из них это был единственный серологический маркер ВГС, а у 2 антитела к core-белку обнаружены в комбинации с антителами к NS3 или NS4ab в титрах 1:5 и 1:10 соответственно. В пятом образце антитела к core-белку наблюдались в высоком титре (1:1280), а к белку NS4ab – в титре 1:40. В образцах с более высокими титрами антител к core-белку (более 1:320) в комбинации с антителами к NS-

Таблица 6

Анализ спектра серологических и молекулярных маркёров ВГС у больных и потенциальных доноров

Наличие анти-ВГС к вирусным белкам и их сочетания	Пробы, абс.	Наличие РНК в тестах с чувствительностью, абс (%)			Концентрация РНК ВГС, МЕ/мл
		15 МЕ/мл		100 МЕ/мл	
		РНК ВГС в плазме и ЛПК	РНК ВГС только в плазме	анализировали только плазму	
Core	14	2 (14,3) 2 (14,3)	0 0	2 0	> 10 ⁶ < 100
NS3	4	1 (25)		0	< 100
NS4ab	10	-	3 (30)	0	< 100
Core + NS3	7	-	2 (28,6) 1 (14,3)	2 0	> 10 ⁶ < 100
Core + NS4ab	4	2 (50)	-	0	< 100
Core + NS3 + NS4ab	4	0	0	0	0
Core + NS3 + NS5a	4	2 (40)	-	2	> 10 ⁶
Core + NS4ab + NS5a	1	1 (20)	-	1	> 10 ⁵
Core + NS3 + NS4ab + NS5a	5	2 (40)	2 (40)	2 0	> 10 ⁵ < 100
Всего	53	12 (22,6)	8 (15,1)		

белкам, напротив, вирусный геном выявлен в высокой концентрации (более 10^5 МЕ/мл).

Заклучение

Дискордантные результаты детекции анти-ВГС в 15,2% случаев свидетельствовали о наличии у потенциальных доноров скрытой ВГС-инфекции, что подтверждалось наличием РНК вируса в низкой концентрации в плазме/сыворотке либо в клетках крови. Следовательно, в случаях получения противоречивых результатов при применении разных методов (ИХЛА и ИФА) или попадания результатов в «серую зону» необходимо дополнительное углублённое исследование, включающее определение спектра антител к отдельным антигенам ВГС, а также определение РНК ВГС высокочувствительными тестами не только в плазме/сыворотке, но и в клеточной фракции периферической крови. Это справедливо и при обследовании пациентов с заболеваниями системы крови, поскольку у 19% больных вирусная РНК обнаруживалась в концентрации менее 100 МЕ/мл одновременно с низкими титрами анти-ВГС к одному или двум вирусным белкам.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 5-28, 30 см. REFERENCES)

4. Трифонова Г.Ф., Левакова И.А., Болсун Д.Д., Мукомолов С.Л. Острый и хронический гепатит С в Российской Федерации в 1994–2013 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(3): 267–74.
29. Ярославцева Н.Г., Романова Т.Ю., Игнатова Е.Н., Овчинникова Е.Н., Тихомиров Д.С., Николаева Л.И. и др. Низкие концентрации РНК ВГС в образцах крови с неопределённым результатом по анти-ВГС («серая зона»). *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1; Прил. 1): 82.

REFERENCES

1. Gower E., Estes C., Blach S., Razavi-Shearer K., Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 2014; 61(1 Suppl.): 45–55. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.
2. Comas L.G., Gavin M.O., Sanz Moreno J.C., Blazques B.R., Rodrigues A.C., Mochales J.A., et al. Prevalence of hepatitis C antibodies in the population aged 16–80 years in the Community of Madrid 2008–2009. *J. Med. Virol.* 2015; 87(10): 1697–701. DOI: 10.1002/jmv.24219.
3. Sievert W., Alraif I., Razavi H.A., Abdo A., Ahmed E.A., Alomair A., et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int.* 2011; 31(Suppl. 2): 61–80. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02540.x.
4. Trifonova G.F., Levakova I.A., Bolsun D.D., Mukomolov S.L. Acute and chronic hepatitis C in Russia during 1994–2013 yrs. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(3): 267–74. (in Russian)
5. Carreno V. Seronegative occult hepatitis C virus infection: clinical implications. *J. Clin. Virol.* 2014; 61(3): 315–20. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.09.007.
6. Rezaee-Zavareh M.S., Hadi R., Karimi-Sari H., Khosravi M.H., Ajudani R., Dolatimehr F., et al. Occult HCV infection: the current state of knowledge. *Iran Red Crescent Med. J.* 2015; 17(11): e34181. DOI: 10.5812/ircmj.34181.
7. Bartolome J., Lopez-Alcorocho J.M., Castillo I., Rodrigues-Inigo E., Quiroga J.A., Palacios R. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J. Virol.* 2007; 81(14): 7710–5. DOI: 10.1128/JVI.02750-06.
8. Pardo M., Lopez-Alcorocho J.M., Rodrigues-Inigo E., Castillo I., Carreno V. Comparative study between occult hepatitis C virus infection and chronic hepatitis C. *J. Viral. Hepatitis*. 2007; 14(1): 36–40. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2006.00783.x.
9. Bokharaei-Salim F., Keyvani H., Monavari S.H., Alavian S.M., Madjid Z., Toosi M.N., et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease. *J. Med. Virol.* 2011; 83(6): 989–95. DOI: 10.1002/jmv.22044.
10. Castillo I., Pardo M., Bartolome J., Otiz-Movilla N., Rodriguez-Inigo E., de Lucas S., et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function test is unknown. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(1): 7–14. DOI: doi.org/10.1086/380202.
11. Abdelrahim S.S., Khairy R., Esmail M.A., Ragab M., Abdel-Hamid M., Abdelwahab S.F. Occult hepatitis C virus infection among Egyptian hemodialysis patients. *J. Med. Virol.* 2016; 88(8): 1388–93. DOI: 10.1002/jmv.24467.
12. Sugden P.B., Pham N.N.O., Ratnarajah S., Cameron B., Bull R., White P.A., et al. Rare occurrence of occult hepatitis C virus in apparently uninfected injecting drug user: a two-center, masked, case-control study. *J. Viral. Hepat.* 2013; 20(10): 725–8. DOI: 10.1111/jvh.12098.
13. Farahani M., Bokharaei-Salim F., Ghane M., Basi A., Meysami P., Keyvani H. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with lymphoproliferative. *J. Med. Virol.* 2013; 85(2): 235–240. DOI: 10.1002/jmv.23460.
14. Youssef S.S., Nasr A.S., Zanaty T., Rawi R.S., Mattar M.M. Prevalence of occult hepatitis C virus in Egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat. Res. Treat.* 2012; 2012: 429784. DOI: 10.1155/2012/429784.
15. Helaly G.F., Elsheredy A.G., El Basset Mousa A.A., Ahmed H.K.F., Oluveyi A.E.S. Seronegative and occult hepatitis C infections in patients with hematological disorders. *Arch. Virol.* 2017; 162(1): 63–9. DOI: 10.1007/s00705-016-3049-7.
16. Bastani M.N., Bokharaei-Salim F., Keyvani H., Eshaei M., Monavari S.H., Ebrahimi M., et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with beta-thalassemia major. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1899–906. DOI: 10.1007/s00705-016-2862-3.
17. Sugden P.B., Cameron B., Bull R., White P.A., Lloyd R. Occult infection with hepatitis C virus: friend or foe? *Immunol. Cell Biol.* 2012; 90(8): 763–73. DOI: 10.1038/icb.2012.20.
18. Pham T.N.Q., Coffin C.S., Michalak T.I. Occult hepatitis C infection: what does it mean? *Liver Int.* 2010; 30(4): 502–10. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.02.193.x.
19. Alvarez M., Planelles D., Vila E., Montaro J., Franco E. Prolonged hepatitis C virus seroconversion in a blood donor, detected by HCV Antigen test in parallel with HCV RNA. *Vox. Sanguinis*. 2004; 86(4): 266–7. DOI: 10.1111/j.0042-9007.2004.00513.x.
20. Lin H., Chen X., Zhu S., Mao P., Zhu S., Liu Y., et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection among blood donors in Jiangsu, China. *Intervirology*. 2016; 59(4): 204–10. DOI: 10.1159/000455854.
21. Carreno V., Bartolome J., Castillo I., Quiroga J.A. New perspectives in occult hepatitis C infection. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18(23): 2887–94. DOI: 10.3748/wjg.v18.i23.2887.
22. De Marco L., Gillio-Tos A., Fiano V., Ronco G., Krogh V., Palli D., et al. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8128. DOI: 10.1371/journal.pone.0008128.
23. Brojer E. Serological and molecular markers of HCV infection in Polish blood donors. *Przegl. Epidemiol.* 2005; 59(2): 511–7. (in Polish)
24. Tugwell B.D., Patel P.R., Williams I.T., Hedberg K., Chai F., Nainan O.V., et al. Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann. Intern. Med.* 2005; 143(9): 648–54. DOI: 10.7326/0003-4819-143-9-200511010-00008.
25. Thomson E.C., Nastouli E., Main J., Karayiannis P., Eliahoo J., Muir D., et al. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *AIDS*. 2009; 23(1): 89–93. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32831940a3.
26. Alnaqy A., Al-Harthy S., Kaminsky G., Al-Dhahry S. Detection of serum antibodies to hepatitis C virus in “false-seronegative” blood donors in Oman. *Med. Princ. Pract.* 2006; 15(2): 111–3. DOI: 10.1159/000090914.
27. Larouche A., Gaetan G., El-Bilali N., Quesnel-Vallieres M., Martin S.R., Alvarez F., et al. Seronegative hepatitis C virus infection in a child infected via mother-to-child transmission. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2515–9. DOI: 10.1128/JCM.00622-12.
28. Bruhn R., Lelie N., Busch M., Kleinman S. Relative efficacy of nucleic acid amplification testing and serologic screening in preventing hepatitis C virus transmission risk in seven international regions. *Transfusion*. 2015; 55(6): 1195–205. DOI: 10.1111/trf.13024.
29. Yaroslavtseva N.G., Romanova T.Yu., Ignatova E.N., Ovchinnikova E.N., Tikhomirov D.S., Nikolaeva L.I., et al. Blood samples with discordant anti-HCV detection results or “grey zone” results can contain low concentration HCV RNA. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2016; 61(1; Suppl. 1): 82. (in Russian)
30. Quiroga J.A., Avellon A., Baltimore J., Andreu M., Flores E., Gonzalez M.I., et al. Detection of hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody suggests occult HCV infection among blood donors. *Transfusion*. 2016; 56(7): 1883–90. DOI: 10.1111/trf.13645

Поступила 28.12.17

Принята в печать 06.03.18