

ВИРУСНАЯ РНК КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ТЯЖЕСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТА А

А.Д.Ибровимова, У.Е.Кузнецова

VIRAL RNA AS A DIAGNOSTIC MARKER OF THE SEVERITY OF THE CLINICAL COURSE OF HEPATITIS A

A.D.Ibrokhimova, U.E.Kuznetsova

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера, nastyat1089@mail.ru

На сегодня основным методом выявления болезней является иммуноферментный анализ, который используется для решения практических вопросов. Молекулярные методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией, позволяют выявить РНК вируса гепатита А в клинических образцах (сыворотке крови, слюне), определить длительность репликации вируса и подтвердить диагноз в сложных диагностических случаях. Определение РНК вируса гепатита А в сыворотке крови пациентов с гепатитом А может иметь диагностическую значимость на клиническое течение заболевания.

Ключевые слова: гепатит А, молекулярно-биологические методы, вирус гепатита А, диагностика

Для цитирования: Ибровимова А.Д., Кузнецова У.Е. Вирусная РНК как диагностический маркер тяжести клинического течения гепатита А // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. 2022. №4(129). С.77–79. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.4\(129\).77-79](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.4(129).77-79)

Today, the main method to solve practical issues for the diagnosis and treatment of diseases is enzyme immunoassay. Molecular methods, primarily polymerase chain reaction combined with reverse transcription, make it possible to detect hepatitis A viral RNA (HAV RNA) in clinical samples (blood serum, saliva), determine the duration of virus replication, and confirm the diagnosis in complex diagnostic cases. The study found that in severe hepatitis A (GA), the RNA of the virus was determined in 100% of cases. Correlation analysis showed medium positive relationships between viral load and alanine aminotransferase activity (ALT), which were significant. In patients of the first group with severe GA, there was a statistically significant increase in ALT compared with the mild course. Thus, the determination of HAV RNA in the blood serum of patients with GA may have a diagnostic significance for the clinical course of the disease.

Keywords: hepatitis A, molecular biological methods, hepatitis A virus, diagnostics.

For citation: Ibrokhimova A.D., Kuznetsova U.E. Viral RNA as a diagnostic marker of the severity of the clinical course of hepatitis A. Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences. 2022. Vol.4(129). Pp.77–79. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.4\(129\).77-79](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2022.4(129).77-79)

Введение

За годы, прошедшие с момента открытия вируса гепатита А (ВГА) и обнаружения его серологических маркеров, произошла эволюция возможностей диагностики заболевания. Сегодня основным методом является иммуноферментный анализ (ИФА), который используется для решения практических вопросов [1–3]. Молекулярные методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР), совмещенная с обратной транскрипцией, позволяют выявлять РНК ВГА в клинических образцах (сыворотке крови, фекалиях, слюне), определить длительность репликации вируса и подтвердить диагноз в сложных диагностических случаях, но на практике пока используются редко [4–6]. Кроме того, ПЦР необходимо включать в диагностику при ко-инфицировании, особенно с гепатитом В, для определения терапевтической тактики и назначения противовирусных препаратов [7].

В связи с возможностью использования диагностических методов по определению РНК ВГА, некоторые исследователи пытаются соотнести степень тяжести заболевания с вирусной нагрузкой [8–13]. Таким образом, определение РНК ВГА в сыворотке крови пациентов с ГА может иметь диагностическую значимость на клиническое течение заболевания.

Материалы и методы

Материалом исследования была плазма крови 60 пациентов с ГА, госпитализированных в ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» в период 2017–2020 гг. Клинически установленный диагноз ГА был подтвержден традиционным серологическим методом (ИФА), в образцах сыворотки крови пациентов определяли наличие антител к ВГА иммуноглобулина класса М (HAVAb IgM) с использованием тест системы Вектоген A-IgM (Россия).

Всем пациентам проведено дополнительное серологическое исследование сыворотки крови методом ИФА с определением серологических маркеров вирусов гепатита В и С с целью исключения инфицирования ими.

Молекулярно-биологическое исследование ВГА было выполнено с использованием набора реагентов АмплиСенс® HAVFL (Россия). Вирусную РНК определяли методом RT-PCR с использованием специфических праймеров к VP1/P2A участку генома ВГА.

Исследование было одобрено этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета (протокол заседания № 6/1 от 22.06.2016 г.). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программ Office Excel 2016 и SPSS Statistics 20.0. Рассчитывали среднее значение и стандартные ошибки среднего значения ($M \pm m$). Оценку достоверности сравниваемых величин в независимых выборках определяли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. При достигнутом уровне значимости $p < 0,05$ различия считались статистически достоверными. Для определения степени корреляции биохимических показателей, вирусной нагрузки пациентов с ГА использовали двухсторонний ранговый корреляционный анализ Спирмена.

Результаты и обсуждение

Забор сыворотки крови проведен на вторые-третьи сутки заболевания, в среднем на $3,1 \pm 1,3$ день болезни. Из 60 собранных образцов сыворотки крови пациентов положительные результаты ПЦР наблюдались у 47 (78,3%) — первая группа, отрицательные — у 13 (21,7%) — вторая группа.

Проведено сравнение определения РНК ВГА в зависимости от сроков заболевания, данные представлены в табл.1.

Таблица 1

Определение РНК ВГА в зависимости от сроков заболевания

День	Группа				Всего	
	1-я группа		2-я группа			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
1	2	3,1	1	1,6	3	4,7
2	18	28,1	3	4,7	21	32,8
3	15	23,4	3	4,7	18	28,1
4	4	9,4	4	9,4	8	18,7
5	4	6,3	2	3,1	6	9,4
6	3	4,7	—	—	3	4,7
7	1	1,6	—	—	1	1,6
Итого	47	78,3	13	21,7	60	100

Распределение пациентов по степени тяжести заболевания в зависимости от определения РНК в сыворотке представлено в табл.2. Установлено, что при тяжелом течении ГА РНК вируса определялось в 100% случаев. При легком и среднетяжелом течении заболевания ПЦР (+) был у 85,1% ($n=53$) пациентов.

Таблица 2

Распределение пациентов с ГА по степени тяжести заболевания в зависимости от определения РНК в сыворотке

Степень тяжести	1-я группа $n = 47$		2-я группа $n = 13$		Всего $n = 60$	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Легкая	16	26,7	6	10,0	22	36,7
Средняя	24	37,5	7	11,0	31	48,4
Тяжелая	7	11	—	—	7	11

У пациентов с выявленной и не обнаруженной РНК ВГА методом ПЦР корреляционная зависимость между возрастом и степенью тяжести не наблюдалась: $r = 0,196$; $p = 0,173$ и $r = -0,138$, $p = 0,621$ соответственно.

В ранее проводимых исследованиях определялась длительность циркуляции РНК ВГА в крови пациентов с сопоставлением этого показателя с активностью цитолитического синдрома. Было выявлено, что РНК ВГА присутствовала в крови больных с активностью АлАТ более 500 МЕ/л независимо от сроков заболевания [8].

Проведен анализ синдрома цитолиза у пациентов в зависимости от наличия (группа 1) или отсутствия (группа 2) РНК ВГА. Установлено статистически значимое преобладание цитолитической активности АлАТ в первой группе $2272,4 \pm 1435,5$ МЕ/л и во второй группе $1363,3 \pm 1051,4$ МЕ/л ($p < 0,05$).

Медиана вирусной нагрузки (ВН) составила $1,8 \times 10^4$ МЕ/мл ($2 \times 10^2 / 7,8 \times 10^5$ МЕ/мл). Корреляционный анализ показал среднеположительные связи ВН с активностью АлАт, которые являлись достоверными: $r = 0,315$ (95% ДИ 0,077–0,633), $p = 0,027$, что подтверждается данными литературы [9] (табл.3).

Таблица 3

Уровень цитолитической активности в зависимости от вирусной нагрузки

Показатель	Вирусная нагрузка			r	p
	Низкая (\log^2) $n = 10$	Средняя (\log^3) $n = 7$	Высокая ($\log^4 - \log^5$) $n = 30$		
АлАТ (МЕ/л)	$893,6 \pm 423,2$	$1792,3 \pm 846,2$	$2364,7 \pm 1225,1$	0,315	0,027

Например, Андреа Норманн и др. провели корреляционные исследования между вирусной нагрузкой, биохимическими и специфическими серологическими маркерами ВГА. Результаты показывают, что существует прямая корреляция пиковых уровням трансаминаз в сыворотке, но не с пиковыми уровнями анти-HAV IgM [9].

Для определения влияния изменения активности цитолиза в зависимости от наличия или отсутствия РНК ВГА проведен сравнительный анализ показателей АлАТ в зависимости от степени тяжести ГА. Установлено статистически достоверное ($p \leq 0,05$) повышение АлАТ у пациентов первой группы с тяжелым течением ГА по сравнению с легким (1881,3±1565,6 и 2544,6±1598,1 соответственно).

Выводы

При тяжелом течении ГА РНК вируса определялась в 100% случаев. При легком и среднетяжелом течении заболевания ПЦР (+) — 85,1%. Корреляционный анализ показал среднеположительные связи ВН с активностью АлАТ, которые являлись достоверными: $r = 0,315$ (95% ДИ 0,077–0,633), $p = 0,027$. У пациентов первой группы с тяжелым течением ГА установлено статистически достоверное ($p \leq 0,05$) повышение АлАТ по сравнению с легким (1881,3±1565,6 и 2544,6±1598,1 соответственно).

1. Николенко О.Ю. и др. Современные методы лабораторной диагностики вирусных гепатитов // Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология): сб. науч.-практ. работ Межрегиональной научно-практической конф. / под общ. ред. Г.Г. Харссеевой. Донецк, 2015. С.113–117.
2. Онищенко Г.Г. и др. Водная вспышка гепатита А в Нижнем Новгороде // Эпидемиология и инфекционные заболевания. 2007. №3. С.4–9.
3. Бушманова А.Д., Новак К.Е., Эсауленко Е.В. и др. Молекулярно-биологические методы диагностики гепатита А // Вестник Новгородского государственного университета. 2020. №3(119). С.32–38.
4. Сергеева А.В. Вирус гепатита А: основные характеристики и лабораторная диагностика // Справочник заведующего КДЛ. 2018. №4. С.29–32.
5. Васнева Ж.П., Борисова З.А., Безкаравайный С.Э. ПЦР диагностика вирусных гепатитов // Международные научные чтения (памяти Г.А. Тихова): сб. статей Международной научно-практической конференции. М., 2021. С.34–35.
6. Ряскова Е.А., Лебедев М.Ю., Зимин Ю.В., Новикова Н.А. Применение полимеразной цепной реакции в диагностике вирусных гепатитов // Нижегородские ведомости медицины. 2008. №8. С.56–62.
7. Эсауленко Е.В., Бушманова А.Д., Сухорук А.А. Клиническая характеристика гепатита А у пациентов с маркерами вируса гепатита В // Журнал инфекционологии. 2017. Т.9, №3. С.75–80.
8. Горчакова О.В., Эсауленко Е.В. Длительность вирусемии при гепатите А // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. 2006. Т.7, №4. С.249–250.
9. Normann A, Jung C, Vallbracht A, Flehmig B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients // J Med Virol. 2004 Jan; 72(1). P.10–16.
10. Kwon O.S., Byun K.S., Yeon J.E. et al. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A // J Gastroenterol Hepatol. 2000 Sep; 15(9). P.1043–1047.
11. De Paula V.S., Villar L.M., Morais L.M. et al. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection // J Clin Virol. 2004 Apr; 29(4). P.254–259.
12. Fujiwara K., Yokosuka O. Diagnostic tests: Serum anti-hepatitis A virus antibody and hepatitis A virus RNA // Nihon Rinsho. 2005 Jul; 63, suppl 7. P.401–403.
13. Fujiwara K., Yokosuka O. Association between severity of hepatitis A and variations in hepatitis A viral RNA // Nihon Rinsho. 2004 Aug; 62, suppl 8. P.458–461.

References

1. Nikolenko O.Yu., et al. Sovremennyye metody laboratornoy diagnostiki virusnykh hepatitov [Modern methods of laboratory diagnosis of viral hepatitis]. Aktual'nyye problemy diagnostiki infektsionnykh zabolеваниy (mikrobiologiya, biotekhnologiya, epidemiologiya, parazitologiya): Sbornik nauchno-prakticheskikh rabot Mezhdunarod'noy nauchno-prakticheskoy konf. [Actual problems of diagnosis of infectious diseases (microbiology, biotechnology, epidemiology, parasitology): Collection of scientific and practical works of the Interregional scientific and practical conference]. Ed. Kharseyeva G.G. Donetsk, 2015. Pp.113–117.
2. Onishchenko G.G., et al. Vodnaya vspышka hepatita A v Nizhnem Novgorode [Water outbreak of hepatitis A in Nizhny Novgorod]. Epidemiologiya i infektsionnyye zabolеваниya — Epidemiology and Infectious Diseases, 2007, no.3, pp.4–9.
3. Bushmanova A.D., Novak K.E., Esaulenko E.V., Ostankova Yu.V., Danilova E.M. Molekulyarno-biologicheskiye metody diagnostiki hepatita A [Molecular biological methods for diagnosing hepatitis A]. Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta — Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences, 2020, no.3(119), pp.32–38.
4. Sergeeva A.V. Virus hepatita A: osnovnyye kharakteristiki i laboratornaya diagnostika [Hepatitis A virus: main characteristics and laboratory diagnostics]. Spravochnik zaveduyushchego KDL — Handbook of the Head of the CDL, 2018, no.4, pp.29–32.
5. Vasneva Zh.P., Borisova Z.A., Bezkaravayny S.E. PTSR diagnostika virusnykh hepatitov [PCR diagnostics of viral hepatitis]. V sbornike: mezdunarodnyye nauchnyye chteniya (pamyati G.A. Tikhova). Sbornik statey Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii [In the collection: International Scientific Readings (in memory of G.A. Tikhov)]. Collection of articles of the International Scientific-Practical Conference]. Moscow, 2021, pp.34–35.
6. Ryaskova E.A., Lebedev M.Yu., Zimin Yu.V., Novikova N.A. Primeneniye polimeraznoy tsepnoy reaktsii v diagnostike virusnykh hepatitov [The use of polymerase chain reaction in the diagnosis of viral hepatitis]. Nizhegorodskiy vedomosti meditsiny — Nizhny Novgorod Bulletin of Medicine, 2008, no.8, pp.56–62.
7. Esaulenko E.V., Bushmanova A.D., Sukhoruk A.A. Kliniko-laboratornaya kharakteristika hepatita A u patsiyentov s markerami virusa hepatita V [Clinical and laboratory characteristics of hepatitis A in patients with hepatitis B virus markers]. Zhurnal infektoligii — Journal Infectology, 2017, vol.9, no.3, pp.75–80.
8. Gorchakova O.V., Esaulenko E.V. Dlitel'nost' viresemii pri hepatite A [The duration of viremia in hepatitis A]. Vestnik Sankt-Peterburgskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii im. I.I. Mechnikova — Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, 2006, vol.7, no.4, pp.249–250.
9. Normann A., Jung C., Vallbracht A., Flehmig B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. J. Med. Virol., 2004, vol.72(1), pp.10–16.
10. Kwon O.S., Byun K.S., Yeon J.E., Park S.H., Kim J.S., Kim J.H., Bak Y.T., Kim J.H., Lee C.H. Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A. J. Gastroenterol. Hepatol., 2000, vol.15(9), pp.1043–1047.
11. De Paula V.S., Villar L.M., Morais L.M., Lewis-Ximenez LL, Niel C., Gaspar AM. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. J. Clin. Virol., 2004, vol.29(4), pp.254–259.
12. Fujiwara K., Yokosuka O. Diagnostic tests: Serum anti-hepatitis A virus antibody and hepatitis A virus RNA. Nihon Rinsho, 2005, 63, suppl. 7, pp.401–403.
13. Fujiwara K., Yokosuka O. Association between severity of hepatitis A and variations in hepatitis A viral RNA. Nihon Rinsho, 2004, 62, suppl. 8, pp.458–461.