

Этот доклад отражает согласованные взгляды международной группы экспертов и не обязательно представляет решения или официальную политику Всемирной организации здравоохранения

Успехи в изучении вирусного гепатита

**Доклад Комитета экспертов ВОЗ
по вирусному гепатиту**

Выпущено издательством «Медицина» по поручению Министерства здравоохранения Союза Советских Социалистических Республик, которому ВОЗ вверила выпуск данного издания на русском языке

**Серия технических докладов
602**



Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1978

© Всемирная организация здравоохранения, 1978

На публикации Всемирной организации здравоохранения распространяются положения протокола № 2 Всемирной конвенции об охране авторских прав. Заявления о разрешении на перепечатку или перевод публикаций ВОЗ *in toto* следует направлять в Отдел публикаций и переводов Всемирной организации здравоохранения, Женева, Швейцария. Всемирная организация здравоохранения охотно удовлетворяет такие просьбы.

Обозначения, используемые в настоящем издании, и приводимые в нем материалы ни в коем случае не выражают мнение Секретариата Всемирной организации здравоохранения о юридическом статусе какой-либо страны, территории, города или района, их правительстве или другом органе власти или об их государственных границах.

Упоминание некоторых компаний или продукции отдельных изготовителей не означает, что Всемирная организация здравоохранения отдает им предпочтение по сравнению с другими, не упомянутыми в тексте, или рекомендует их к использованию. Как правило, патентованные наименования выделяются начальными прописными буквами.

у 51002—404
039(01)—78 Б3—68—15—78

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	7
2. Терминологическая характеристика вирусов и антигенов	8
2.1. Вирус гепатита А	8
2.2 Вирус гепатита В	9
2.3. Другие вирусы гепатита	10
3. Клинические и лабораторные данные	10
4. Свойства вируса гепатита А	11
5. Серологические методы изучения гепатита А	13
5.1. Иммуноэлектронная микроскопия	13
5.2. Реакция связывания комплемента и иммунная гемагглютинация	14
5.3. Радиоиммунологический анализ в твердой фазе	14
6. Гепатит А у животных моделей	16
7. Эпидемиология и борьба с гепатитом А	18
7.1. Пути распространения	18
7.2 Меры борьбы	21
8. Свойства вируса гепатита В	22
8.1. Поверхностный антиген (HBsAg)	22
8.2. Сердцевинный антиген (HBcAg)	27
9. Серологические методы изучения гепатита В	30
9.1. HBsAg и анти-HBs	32
9.2. Субтиповирование HBsAg и анти-HBs	34
9.3. HBcAg, анти-HBc и ДНК-полимераза	35
9.4. HBeAg и анти-HBe	36
10. Иммунный ответ при гепатите В	36
10.1. Гуморальный ответ	36
10.2. Клеточный иммунитет	38
11. Гепатит В у животных моделей	42
12. Эпидемиология гепатита В	42
12.1. Состояние носительства	42
12.2. Пути распространения	44
13. Посттрансфузионный гепатит	46
13.1. Результаты внедрения в практику методов выявления HBsAg	46
13.2. Основные факторы риска при посттрансфузионном гепатите	47
13.3. Посттрансфузионный гепатит, не связанный с инфицированием HAV или HBV	47
13.4. Перспективы борьбы с посттрансфузионным гепатитом	48
13.5. Риск заражения гепатитом при использовании препаратов плазмы	48
14. Гепатит как профессиональная опасность	50
15. Пассивная иммунизация против гепатита В	52
15.1. Клинические испытания	52
15.2. Основные принципы пассивной иммунизации против гепатита В	56

16. Активная иммунизация против гепатита В	57
16.1. Предварительные исследования	57
16.2. Основные принципы приготовления экспериментальных вакцин против гепатита В	60
17. Лечение гепатита В интерфероном	62
18. Гепатит В и первичный рак печени	63
19. Рекомендации	64

КОМИТЕТ ЭКСПЕРТОВ ВОЗ ПО ВИРУСНОМУ ГЕПАТИТУ

Женева, 11—16 октября 1976 г.

Члены Комитета:

- Д-р L. F. Barker, директор, отделение крови и продуктов крови, Бюро биологических продуктов, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, Бетесда, штат Мэриленд, США (*содокладчик*).
Д-р N. P. Gupta, директор, Центр вирусологических исследований, Пуна, Индия.
Д-р I. D. Gust, врач-вирусолог, вирусная лаборатория, Фейрфилдская больница, штат Виктория, Австралия.
Проф. Е. С. Кетиладзе, руководитель, отдел клинической вирусологии и гепатита, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, Москва, СССР.
Проф. J. L. Melnick, кафедра вирусологии и эпидемиологии, Бейлорский медицинский колледж, Хьюстон, штат Техас, США (*председатель*).
Д-р K. Nishioka, вице-президент, Токийский институт медицинских наук, Япония.
Д-р K. Spies, профессор (вирусология), Медицинский факультет (Шаритé), Берлинский университет Гумбольдта, Институт медицинской и общей микробиологии, вирусологии и эпидемиологии, Берлин, Германская Демократическая Республика (*вице-председатель*).
Д-р P. M. Tukei, директор, Восточноафриканский институт вирусных исследований Восточноафриканское содружество, Энтеббе, Уганда.
Проф. A. J. Zuckerman, директор, кафедра медицинской микробиологии, Лондонская школа гигиены и тропической медицины, Англия (*содокладчик*).

Секретариат:

- Д-р R. Brés, главный специалист, отдел вирусных болезней, ВОЗ, Женева, Швейцария.
Д-р С. Г. Дроздов, директор, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва, СССР (*временный консультант*).
Д-р J. E. Maynard, директор, Бюро эпидемиологии, Центр борьбы с болезнями, Лаборатории Феникс, г. Феникс, штат Аризона, США (*временный консультант*).
Д-р R. H. Purcell, руководитель, отдел вирусного гепатита, Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд, США (*временный консультант*).
Д-р O. Soběslavsky, врач-специалист, отдел вирусных болезней, ВОЗ, Женева, Швейцария (*секретарь*).
Проф. J. P. Soulier, генеральный директор, Национальный центр переливания крови, Париж, Франция (*временный консультант*).

УСПЕХИ В ИЗУЧЕНИИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА

Доклад Комитета экспертов ВОЗ по вирусному гепатиту

Заседание Комитета экспертов ВОЗ по вирусному гепатиту проходило в Женеве с 11 по 16 октября 1976 г. От имени Генерального директора заседание открыл д-р И. Д. Ладный, помощник Генерального директора.

1. ВВЕДЕНИЕ

Двадцать пять лет прошло с тех пор, когда на Третьей всемирной ассамблее здравоохранения впервые было решено создать Комитет экспертов ВОЗ по гепатиту. В первом докладе Комитета в 1953 г. обращалось внимание на важность этого заболевания для здравоохранения и на ограниченность знаний его этиологии и эпидемиологии^а. В следующее десятилетие наблюдался определенный прогресс в области пассивной иммунизации против гепатита А, но почти не было других достижений, что выяснилось из второго доклада Комитета в 1964 г.^б. Лаборатории всего мира смогли разработать методы изучения этиологии, эпидемиологии и иммунологии гепатита В только в конце 60-х годов, когда выяснилось, что австралийский антиген является индикатором инфекции, вызванной вирусом гепатита В. ВОЗ последовательно созывала совещания трех групп экспертов, обсуждавших это важное открытие и давших рекомендации, касающиеся его применения для борьбы с этим заболеванием^{в, г, д}.

Благодаря ВОЗ международное сотрудничество и обмен последними данными перед их публикацией в научных журналах стали обычной чертой глобальных усилий, направленных на искоренение гепатита. В данном докладе предпринята попытка ознакомления читателя с последними успехами в

^а Серия технических докладов ВОЗ, № 62, 1953.

^б Серия технических докладов ВОЗ, № 285, 1964.

^в Бюллетень Всемирной организации здравоохранения, 1973, 42, 957.

^г Серия технических докладов ВОЗ, № 512, 1975.

^д Серия технических докладов ВОЗ, № 570, 1976.

этой области, особенно достигнутыми со времени последнего заседания ВОЗ, посвященного гепатиту^a. Одним из достижений является разработка упрощенной номенклатуры, основанной на прямом визуальном исследовании вирусов гепатитов А и В и на их биохимических и биофизических свойствах. В докладе рассматривается также значительный прогресс в области специфической диагностики вирусных гепатитов, благодаря которому был распознан новый тип гепатита, отличный от гепатитов А и В. В настоящее время этот новый тип является наиболее частой формой посттрансфузионного гепатита в некоторых районах мира. Другое достижение заключается в том, что использование животных моделей экспериментальной инфекции, вызванной вирусами гепатитов А и В, дало возможность изучить инфекционность обоих агентов и провести оценку безопасности и эффективности экспериментальных вакцин против гепатита В перед их испытанием на людях. В настоящем докладе также охарактеризованы новые достижения в области пассивной иммунизации против гепатита В и первые обнадеживающие попытки лечения этого заболевания. Предполагаемая связь вируса гепатита В с первичным раком печени позволяет надеяться, что путем борьбы с этой вирусной инфекцией можно снизить заболеваемость не только гепатитом В, но и этой формой рака.

2. ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОВ И АНТИГЕНОВ

Интенсивные исследования, проводимые во всем мире, привели к улучшению наших знаний о вирусах гепатита и специфических вирусных антигенах. В данном докладе Комитет экспертов предлагает модификацию номенклатуры, в которой учтены последние данные, полученные многими лабораториями. Кроме того, для более легкого понимания сокращений, принятых при обозначении антигенов и антител гепатита, Комитет предложил отказаться от использования подстрочных букв. Например, для поверхностного антигена гепатита В такое сокращение будет выглядеть как HBsAg, а не HB_s Ag.

2.1 Вирус гепатита А

HAV	Вирус гепатита А. Мелкий вирус, размером 25—28 нм, обладающий кубической симметрией. Как и у других вирусов такого размера, существуют пустые и полные частицы. Оба вида частиц идентифицируются с помощью иммуноэлек-
-----	--

^a Серия технических докладов ВОЗ, № 570, 1976.

тронной микроскопии. Другими серологическими тестами на вирус гепатита А являются реакция связывания комплемента, иммунная гемагглютинация и радиоиммuno-
генный метод.

анти-HAV Антитела к вирусу гепатита А.

2.2 Вирус гепатита В

HBV	Вирус гепатита В. Вирус размером 42 нм с двойной оболочкой, первоначально известный как частица Дейна.
HBsAg	Поверхностный антиген гепатита В. Антиген гепатита В, обнаруженный на поверхности вируса и на сопутствующих не связанных с вирусом сферических (диаметром 22 нм) и трубчатых частицах.
HBcAg	Сердцевинный антиген гепатита В. Этот антиген гепатита В связан с сердцевинным компонентом вируса.
HBeAg	<i>e</i> -антител, тесно связанный с гепатитом В.
анти-HBs	Антитела против поверхностного антигена гепатита В.
анти-HBc	Антитела против сердцевинного антигена гепатита В.
анти-HBe	Антитела против <i>e</i> -антитела.

Субдетерминанты поверхности антигена (HBsAg)

HBsAg несет общую детерминанту *a* и ряд основных субдетерминант, кодируемых вирусным геномом, но не хозяином. Наличие субдетерминант подтверждается образованием «шпор» в реакции иммунодиффузии с соответствующими реагентами. Были определены 8 отдельных категорий и 2 категории смешанных субтипов^a. Эти категории состоят из различных комбинаций субдетерминант *d*, *u*, *w* и *g*, и, кроме этого, из других вариантов, первоначально описанных как связанные с общей детерминантой *a*, но лучше их обозначить как варианты специфичности *w*, так как они всегда ведут себя как аллели *g*.

Эти 10 категорий следующие.

ayw1 (<i>a₁yw</i>)	adw 2 (<i>a₂¹dw</i>)
ayw 2 (<i>a₂¹ yw</i>)	adw 4 (<i>a₃ dw</i>)
ayw 3 (<i>a₂³yw</i>)	adr
ayw 4 (<i>a₃yw</i>)	adyw
ayg	adyg

Основные субдетерминанты ведут себя так, как будто в них входят 2 аллельные группы: *d* и *u*, с одной стороны, и *w*₁; *w*₂, *w*₃, *w*₄ и *g*, — с другой. Однако вероятно, что эти системы не являются полностью самостоятельными, так как было показано, что только 2 из 4 вариантов *w* (обнаруженных в сочетании с *u*) сочетаются с *d*. Эти две категории смешанных субтипов являются редкими и, вероятно, могут являться ре-

^a Le Bouvier, G. L., Williams, A. *American journal of the medical sciences*, 270 : 165 (1975).

зультатом фенотипического или генотипического смешивания детерминант во время одновременной инфекции вирусами, связанными более чем с одним субтипов HBsAg.

Были также описаны другие реактивные группы поверхностного антигена, как, например, q, x, f, t, j, p и g. Необходимых серологических сравнений между этими реактивными группами пока не проводили.

Субдетерминанты e-антигена (HBeAg)

Было идентифицировано два антигена, обозначенных HBeAg/1 и HBeAg/2.

2.3 Другие вирусы гепатита

Распознана новая форма гепатита, которая клинически неотличима от гепатитов типа А и В, но не имеет антигенного родства ни с одним из этих двух типов. В некоторых районах мира он является наиболее распространенной формой гепатита, развивающегося после переливаний крови. Вторичные случаи отмечаются редко. Так как пока еще не имеется лабораторных методов идентификации агентов или антигенов, связанных с этой новой формой гепатита, предлагать специальную терминологию в отношении них было бы преждевременно.

3. КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ДАННЫЕ

Несмотря на то что при анализе значительного числа случаев стали очевидными различия клинических синдромов вирусного гепатита типов А и В, эти отличия ненадежны при постановке диагноза у больных с желтухой.

Предвестниками гепатита А часто являются такие неспецифические симптомы, как лихорадка, озноб, головная боль, утомляемость, общая слабость, ломота и боли. Через несколько дней появляются потеря аппетита, тошнота, рвота и боль в правом верхнем квадранте живота, за чем вскоре следует выделение темной мочи и светлых испражнений с развитием желтушности склер и кожных покровов.

Продромальный период при гепатите В часто является длительным и незаметным. Частыми признаками этого периода являются субфебрильная температура, артриты и кожная сыпь, обычно уrtикарная.

Хорошо известные клинические проявления выраженного заболевания при вирусных гепатитах типов А и В сходны. При функциональных пробах печени также получена сходная картина при обоих типах гепатита, но при гепатите В имеется тенденция к более длительному увеличению содержания сывороточных ферментов и билирубина. Смертность при обоих этих заболеваниях подобна, будучи равной 1 : 500 — 1 : 1000,

но имеются важные исключения, заключающиеся в более высоких показателях смертности при развитии гепатита В после переливания крови, а также гепатита А, протекающего на фоне беременности.

Ввиду трудностей дифференцирования этих заболеваний на основании клинических и биохимических данных большое значение имеет введение специфических серологических тестов для диагностики инфекций, вызванных вирусами гепатита А и гепатита В.

Как уже упоминалось, стало очевидным, что имеется новая форма вирусного гепатита, антигенно не связанного с инфекцией, вызванной вирусами гепатитов А или В. Эту форму нелегко отличить от гепатита В на основании клинических данных, продолжительности инкубационного периода, а также продолжительности и степени подъема билирубина и трансаминаз. Однако имеются указания, что у больных с этой формой гепатита вероятность развития тяжелой острой формы и молниеносных летальных заболеваний меньше, чем у больных гепатитом В.

4. СВОЙСТВА ВИРУСА ГЕПАТИТА А

Вирус гепатита А (HAV) — мелкий (25—28 нм) вирус, обладающий кубической симметрией^a. По своему виду и морфологии HAV сходен с РНК-содержащими пикорнавирусами и ДНК-содержащими парвовирусами. HAV был обнаружен в фекалиях людей, шимпанзе и мarmозетов, в желчи шимпанзе и в сыворотке людей, шимпанзе и мarmозетов в случаях острой инфекции. Хотя в различных пробах фекалий, взятых от инфицированных лиц, были обнаружены вирусоподобные частицы других размеров и морфологических характеристик, по-видимому, серологически и по времененным показателям с HAV-инфекцией связаны только частицы размером около 27 нм. При электронномикроскопическом исследовании были обнаружены как «полные» частицы, в которые контрастирующее вещество не проникло, так и «пустые», в которые оно проникало. Однако эти два варианта частиц в антигенном отношении неразличимы и агрегируют при смешивании с сывороткой, содержащей антитела против этого вируса. Ни вирусной оболочки, ни компонентов субъединиц при этом обнаружено не было.

В незначительном числе исследований было показано, что HAV относительно устойчив к инактивирующему действию эфира, прогреванию при 60° в течение 1 ч и кислой среды с pH 3,0, но инактивируется раствором формальдегида (0,25 мл/л) при 37° за 72 ч и хлором (1 мг/л) за 30 мин. Не-

^a Purcell, R. H. *American journal of the medical sciences*, 270: 61 (1975).

ионные детергенты и хранение при 4° , -20° или -70°C не изменяют морфологию и не снижают инфекционность вируса.

При центрифугировании в градиенте хлористого цезия HAV разделяется на 3 отдельные популяции частиц. Средние значения плавучей плотности этих популяций колеблются от 1,4 до 1,27 г/мл, с основными пиками плотности, равными приблизительно 1,38—1,41, 1,31—1,34 и 1,24—1,29 г/мл. Наиболее легкая из этих 3 основных популяций состоит, по-видимому, из «пустых» частиц, в которых, вероятно, мало нуклеиновой кислоты или она отсутствует. Относительное содержание различных популяций варьирует в различных пробах и экспериментах. Частицы с большей и средней по значению плотностью преобладают в пробах фекалий, тогда как в печени, сыворотке и желчи присутствуют главным образом частицы средней плотности. Частицы меньшей плотности также были обнаружены в печени и желчи. Популяции частиц, имеющих все три значения плотности, серологически неразличимы, и инфекционность нельзя связать с какой-либо одной зоной градиента плотности. Тяжелые частицы в растворе хлористого цезия относительно нестабильны, и после повторного центрифугирования показатели их плавучей плотности имеют тенденцию смещаться до приблизительно 1,34 г/мл. Коэффициент седиментации в сахарозе, вычисленный на основании плотности, равной 1,34 г/мл, и размера 27 нм, составляет для этих частиц 110S.

Биохимические свойства HAV широко не изучены ввиду трудностей получения вирусных частиц. Однако были предприняты попытки определить тип нуклеиновой кислоты этого вируса путем изучения характера окрашивания акридином оранжевым. Так как количество имеющегося материала для окончательного определения было недостаточным, на основании этих исследований было предположено, что нуклеиновая кислота HAV может представлять собой либо РНК, либо одноднитчатую ДНК. Эти результаты наряду с обнаружением вирусоподобных частиц в цитоплазме гепатоцитов, полученных от мармозетов и шимпанзе, экспериментально инфицированных HAV, а также данными о том, что частицы располагаются при градиентном центрифугировании главным образом в зоне плавучей плотности 1,34 г/мл, привели к предположению, что HAV является членом энтеровирусной подгруппы пикорнавирусов. Однако необычно высокая устойчивость HAV к прогреванию и существование нескольких популяций частиц с различной плавучей плотностью, а особенно одной из них с плотностью, составляющей 1,4 г/мл, говорит о том, что HAV сходен с парвовирусами. Прежде чем можно будет определить, к какому из этих двух классов мелких вирусов относится HAV, необходимо провести дополнительные исследования его нуклеиновой кислоты и полипептидного состава.

5. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕПАТИТА А

Было разработано 4 метода исследований вирусного антигена гепатита А (HAV-антисыворотки) и антител к HAV (анти-HAV). В настоящее время они используются только в научно-исследовательских лабораториях, главным образом потому, что трудно найти подходящие источники получения антигена.

5.1 Иммуноэлектронная микроскопия

Посредством этого метода под электронным микроскопом визуально наблюдают результат взаимодействия вирусных частиц и специфических антител. Применяя метод иммуноэлектронной микроскопии, опытный исследователь может обнаружить до 10^4 – 10^6 вирусных частиц в 1 мл, т. е. уровень чувствительности этого метода приблизительно в 1000 раз выше, чем при обычной электронной микроскопии.

Выявление частиц HAV с помощью иммуноэлектронной микроскопии осуществляется путем инкубирования специфической сыворотки, содержащей анти-HAV, с фильтратом фекалий. Иммунные агрегаты вируса и антител и отдельные частицы, покрытые антителами, концентрируют путем ультракентрифугирования и негативно окрашивают фосфорновольфрамовой кислотой. Затем каждую сеточку исследуют на присутствие типичных частиц HAV при увеличении 40 000—60 000. Для количественного определения антител экстракт фекалий, содержащий частицы HAV, смешивают с неизвестной пробой сыворотки.

К связанным с этим методом проблемам относится присутствие в пробах фекалий множества бактериальных, фаговых, вирусных и других корпоскулярных антигенов, которые неопытному специалисту трудно дифференцировать. Кроме того, если для исследования фекалий на наличие HAV с помощью иммуноэлектронной микроскопии используются человеческие антисыворотки, в них могут содержаться специфические антитела против этих антигенов. Необходимо подчеркнуть, что этот метод дает удовлетворительные результаты только в руках опытного специалиста.

Обнаружение источников получения реагентов представляет собой другую проблему: до сих пор большие количества частиц HAV недоступны. Эта проблема связана главным образом с тем обстоятельством, что первоначальное выделение частиц инфицированными больными часто предшествует самому раннему выявлению подъема аланин-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.2) или началу проявления продромальных симптомов. Максимальное выделение вирусных частиц наблюдается

вскоре после этого перед появлением желтухи; как только развилась желтуха, количество выделяющихся частиц резко падает. Следовательно, к моменту первого осмотра врачом в фекальных экстрактах большинства больных обнаруживается мало частиц HAV или они совсем не выявляются.

Несмотря на то что метод иммуноэлектронной микроскопии является трудоемким и требует много времени, он крайне важен для идентификации препаратов из фекалий человека или обезьян, богатых HAV.

5.2 Реакция связывания комплемента и иммунная гемагглютинация

Ограничения, касающиеся практического использования иммуноэлектронной микроскопии, выявились скоро, и стала очевидной необходимость разработки быстрого, более чувствительного количественного метода испытаний, который можно было бы применять для исследования большого количества проб. Используя экстракти печени, полученные от мarmozетов *Saguinus mystax*, зараженных HAV, исследователи разработали специфические диагностические реакции связывания комплемента^a и иммунной гемагглютинации^b для выявления анти-HAV. Иммунная гемагглютинация является специфической иммунологической реакцией, при которой микроорганизмы или другие антигены, образовавшие комплексы с антителами и комплементом, прикрепляются к поверхности мембране подобранных эритроцитов приматов. Эта реакция опосредована первыми четырьмя компонентами комплемента, хотя связь C3 является главным образом ответственной за эту реакцию. Реакция иммунной гемагглютинации проста в постановке и, по сообщениям, в 10—100 раз более чувствительна для выявления анти-HAV, чем реакция связывания комплемента. Однако изредка возникают проблемы, связанные со специфичностью, и некоторые препараты антигена работают неудовлетворительно. В некоторых случаях трудности этой реакции были связаны с недостаточной очисткой антигена, его низкой концентрацией или с гемолизом эритроцитов препаратами, содержащими детергенты, используемые в процессе очистки. Присутствие хлористого цезия в концентрации выше 1,07 кг/л (1,07 г/мл) ингибирует иммунную гемагглютинацию.

5.3 Радиоиммунологический анализ в твердой фазе

Радиоиммунологический анализ можно для удобства разделить на 3 стадии: 1) адсорбция немеченых антител на стен-

^a Provost, P. J. et al. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 148 : 962 (1975).

^b Miller, W. J. et al. *Proceedings of the Society for experimental biology and medicine*, 149 : 254 (1975).

ках лунок панелей из поливинилхлорида для микротитрования; 2) экстракция иммунологически активного антигена этими адсорбированными антителами и 3) выявление связавшегося антигена путем присоединения к нему меченых специфических антител. Результаты испытаний часто выражаются отношением положительных данных к отрицательным. Это отношение определяется путем деления числа импульсов в минуту в испытуемом образце на среднее число импульсов в минуту отрицательных контрольных проб. Любые изменения условий испытания, которые снижают неспецифический фон радиоактивности отрицательных контрольных лунок и одновременно стабилизируют или усиливают специфическое связывание, приведут к существенному увеличению отношения положительных результатов к отрицательным.

Чувствительность радиоиммунологического метода можно повысить путем увеличения количества антител, адсорбированных на поверхности лунок панелей для микротитрования. Недавно проведенные исследования показали, что связывание IgG с поливинилхлоридом зависит от первоначальной концентрации антител, времени и температуры, а также от качественных характеристик адсорбирующегося белка. Разведение немеченых антител растворителем, содержащим белок (как, например, фосфатным буферным раствором, содержащим бычий сывороточный альбумин), снижает адсорбцию антител, особенно если используются препараты IgG или иммуноглобулина.

Тест блокировки может также использоваться для определения анти-HAV^a. Вкратце при этом луники панелей для микротитрования, покрытые анти-HAV, инкубируют с очищенным HAV, а затем промывают и удаляют оставшуюся жидкость. Добавляют десятикратные разведения испытуемых сывороток и продолжают инкубацию в течение ночи при 4°. После еще одного промывания вносят меченные антитела. Снижение радиоактивности на 40% или больше по сравнению с контрольной сывороткой, не содержащей анти-HAV, считалось доказательством их наличия в испытуемой пробе.

Была описана другая методика радиоиммунологического анализа^b для определения анти-HAV, при которой луники пластинок непосредственно покрывают сывороткой, которая испытывается на наличие анти-HAV. После соответствующей инкубации с очищенным HAV добавляют меченные анти-HAV. После дальнейшей инкубации и промывания луники вырезают и считают радиоактивность в γ -счетчике. Испытуемая пробы считается положительной на анти-HAV, если число импульсов

^a Purcell, R. H. et al. *Journal of immunology*, **116**: 349 (1976).

^b Hollinger, F. B. et al. *American journal of clinical pathology*, **65**: 854 (1976).

в испытуемой пробе в 1 мин более чем в два раза превышает среднее число импульсов в 1 мин ряда отрицательных контрольных сывороток, тестируемых в то же время. Оптимальная чувствительность и специфичность этой системы достигались при скрининге сывороток в разведении 1 : 1000.

В противоположность иммунной гемагглютинации, с помощью которой анти-HAV выявляются только в сыворотках, взятых в поздней стадии выздоровления, тремя другими методами — иммуноэлектронной микроскопией, реакцией связывания комплемента и радиоиммунологическим анализом — выявляют анти-HAV в сыворотках, собранных во время острой фазы заболевания и периода выздоровления. Это может быть обусловлено повышенной чувствительностью этих методик к выявлению IgM — специфических анти-HAV.

Наименее чувствительным из этих 4 методов обнаружения анти-HAV является реакция связывания комплемента. Иммуноэлектронная микроскопия и радиоиммунологический метод имеют почти равную чувствительность, тогда как иммунная гемагглютинация по уровню своей чувствительности занимает промежуточное положение между этими двумя методами и реакцией связывания комплемента.

6. ГЕПАТИТ А У ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЕЙ

Неудачи подбора культуры клеток для размножения человеческого HAV *in vitro* вызвали широкие поиски экспериментальных моделей для изучения патогенеза инфекции, получения материалов для биофизической характеристики инфекционного агента и обеспечения реагентами для серологических исследований. К настоящему времени обнаружено, что только приматы являются пригодными в этом отношении животными. Большинство исследований было проведено на шимпанзе и обезьянах-мармозетах вида *Saguinus*^a.

Серологические методы, разработанные для обнаружения HAV и анти-HAV, дают возможность определять чувствительность шимпанзе к инфекции, вызываемой HAV. С помощью этих методов было показано, что почти у 90% шимпанзе, отловленных в природных условиях, при исследовании их после ввоза обнаруживаются анти-HAV и поэтому они не пригодны для изучения инфекционности HAV. Шимпанзе, родившиеся в колониях этих животных, вероятно, гораздо более чувствительны к инфекции, вызываемой HAV. Заражение чувствительных шимпанзе HAV оральным или внутривенным путем с постоянством вызывает у этих животных гепатит, сопровождающийся выделением вируса с фекалиями во время инкубационного периода и в ранней острой фазе заболевания.

^a Deinhardt, F. *Advances in virus research*, 20 : 113 (1976).

Промежуток времени между заражением и началом увеличения содержания сывороточных ферментов в случае типичной экспериментальной инфекции колеблется от 15 до 30 дней. Хотя желтуха у шимпанзе не развивается, гистопатологические изменения, наблюдаемые при биопсии проб печени, взятых у этих животных во время острого периода заболевания, были сходны с изменениями в печени людей. Кроме HAV, выделяющегося с фекалиями, вирусные частицы были обнаружены также в желчи и выявлялись с помощью метода иммуноэлектронной микроскопии в цитоплазме гепатоцитов шимпанзе. Суспензии очищенного HAV из фекалий шимпанзе были с успехом использованы в качестве реагентов для радиоиммунологического метода и иммунной гемагглютинации при выявлении анти-HAV.

Восприимчивость мarmозетов к инфекции, вызванной HAV, была подтверждена в ряде исследований, проведенных в нескольких лабораториях. Однако различные виды мarmозетов неодинаково восприимчивы к заражению HAV; наименьшие различия чувствительности отмечены у *S. mystax*. Были проведены серийные пассажи штамма MS-1 HAV на *S. mystax*. На уровне всех пассажей у животных развивались биохимические и гистологические признаки гепатита, а в сыворотках выздоравливающих животных были обнаружены анти-HAV. Однако в любом данном ряде экспериментальных заражений не у всех животных обязательно развивался гепатит и вырабатывались анти-HAV. Процент успешных попыток вызвать гепатит может колебаться от 30 до 100. Эти данные говорят о том, что для экспериментальных заражений лучше всего брать группы, состоящие по меньшей мере из 5 обезьян. Кроме штамма MS-1, на *S. mystax* были предприняты обширные исследования штамма CR-326 HAV, выделенного в Коста-Рике. Морфологические и иммунологические характеристики штаммов HAV MS-1 и CR-326, выделенных от экспериментально зараженных мarmозетов, оказались сходными. С другой стороны, недавно проведенные исследования показали, что агент GB, первоначально выделенный при исследовании мarmозетов, с HAV не связан. У мarmозетов с развившимся после заражения этим агентом гепатитом анти-HAV не вырабатывались, а при заражении HAV после выздоровления у них вновь развивался гепатит.

Поставка нечеловекообразных приматов, особенно мarmозетов, в настоящее время строго ограничена. Эти приматы имеют важное значение для изучения вирусного гепатита с использованием небольшого числа разводимых в лаборатории обезьян. Было признано, что исследования гепатита с использованием нечеловекообразных приматов следует проводить только после того, как уделено должное внимание вопросам сохранения этих видов. Там, где это возможно, следует содер-

жать шимпанзе и мармозетов в колониях, где эти обезьяны размножаются.

7. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И БОРЬБА С ГЕПАТИТОМ А

Географическое распространение. Гепатит А распространяется во всем мире, но точные показатели заболеваемости трудно определить ввиду различий в эпидемиологическом надзоре, а также характере течения заболевания. Эпидемии гепатита А описаны во многих странах, и это заболевание, по-видимому, эндемично для многих тропических и субтропических зон.

Возрастное распределение. В развитых странах эта инфекция встречается во всех возрастных группах, причем около 50% клинически выраженных случаев наблюдается среди детей младше 15 лет. В тропических и субтропических зонах большинство заболеваний, вероятно, происходит в детстве, и многие из них протекают в субклинической форме.

Сезонные колебания. В зонах умеренного климата гепатит А встречается в виде эпидемических волн с пиками заболеваемости через каждые 5—20 лет. В некоторых, но не во всех этих зонах, например, в Скандинавии и США, заболевание имеет выраженные сезонные колебания, причем пик заболеваемости приходится на поздний осенний и ранний зимний периоды, а низкая заболеваемость — на середину лета. В Индии наблюдается тенденция к ассоциации этой инфекции с периодами сильных дождей.

Долгосрочный прогноз заболеваемости не ясен, но данные по некоторым развитым странам свидетельствуют о том, что заболеваемость этой инфекцией снижается с большей частотой поражения гепатитом А взрослых. Неизвестно, отражает ли это снижение тенденцию на длительный срок, или она просто представляет собой нижнюю точку протекающего эпидемического цикла.

7.1 Пути распространения

Кишечно-оральный путь

Вероятно, что в отсутствие основных резервуаров инфекции среди людей или животных вирус гепатита А сохраняется в природе путем серийных передач, возможно, кишечно-оральным путем. Наиболее частым путем распространения является контактный, который, например, имеет место в домашних условиях. Инфекция легко распространяется при плохих санитарно-гигиенических условиях и перенаселенности.

ти, что, например, может наблюдаться в психиатрических учреждениях, а также во время войн.

Водные эпидемии гепатита А были документально подтверждены во многих случаях, и этот путь распространения, вероятно, часто имеет место в тех странах, где гигиенические нормы и санитарный уровень низки. Крупнейшая вспышка гепатита А произошла в Дели (Индия) в течение декабря 1955 г. и января 1956 г., когда было отмечено 29 300 случаев заболевания, произошедших в результате загрязнения магистральной водопроводной сети нечистотами. В течение 1971—1974 гг. в США были документально подтверждены 13 вспышек заболевания в результате контаминации частных источников или рекреационных вод. Это составляет 0,2% от числа случаев гепатита А и 2% от всех водных инфекций, о которых было сообщено за этот период в США.

Были описаны многочисленные пищевые эпидемии, распространяющиеся вирусоносителями, имевшими дело с пищевыми продуктами в течение инкубационного периода заболевания. При тщательном эпидемиологическом исследовании зачастую оказывается возможным выявить источник вспышки, каковым обычно являются сырье пищевые продукты или пища, которая проходит ручную обработку после приготовления. Несмотря на драматичность характера таких вспышек, имеется очень мало данных о том, что в развитых странах пищевые или водные пути передачи являются основным фактором в поддержании инфекции в развитых странах.

Употребление в пищу моллюсков, выращенных в загрязненных водах, сопровождается риском заражения гепатитом А. При этом важен способ приготовления моллюсков: при жарке вирус, по-видимому, разрушается, тогда как при варке на пару — нет, вероятно, вследствие того, что раковины открываются и содержимое их съедается до момента достижения вирицидных температур. Некоторые вспышки вызывают серьезные вопросы в отношении контрольных программ, ввиду того что эта загрязненная вода удовлетворяет текущим национальным требованиям, предъявляемым к выращиванию моллюсков.

Другие пути распространения

При рассмотрении вопроса о возможности распространения гепатита А респираторным путем, с инфицированной мочой, а также при половых контактах было отмечено, что в настоящее время не имеется убедительных данных о том, что эти пути распространения имеют место. Было показано, что сыворотка, содержащая HAV, заразна, и изредка сообщалось о случаях шприцевого гепатита А, но тот факт, что это забо-

левание редко передается путем гемотрансфузий, свидетельствует о редких случаях персистирующей виремии.

Не имеется данных о передаче беременным гепатита А плоду, а предположение о том, что инфекция во время беременности приводит к развитию синдрома Дауна у детей, не подтвердилось. В Индии, в противоположность данным по другим странам, наблюдается высокая смертность среди женщин, у которых гепатит развился во втором или третьем триместре беременности. Эпидемии гепатита среди людей, имеющих контакт с отловленными в джунглях шимпанзе или другими приматами, и выявление анти-HAV у большой части этих животных говорят о возможности того, что они представляют собой внечеловеческий резервуар инфекции. С другой стороны, возможно, что обезьяны инфицируются во время их содержания после отлова с последующей передачей заболевания ухаживающему за ними персоналу.

В настоящее время для использования в лабораторных исследованиях имеются специфические диагностические тесты на инфекцию, вызванную HAV, которые основаны на выявлении вируса в фекалиях или повышения титров анти-HAV в сыворотке. Инфекция, вызываемая HAV, была подтверждена как при экспериментально вызванном, так и встречающемся в естественных условиях заболевании в большинстве эпидемиологических ситуаций, в которых было точно доказано участие этого вируса, а именно при передаче от человека человеку, вспышках заболевания среди коллективов и при эпидемиях, связанных с употреблением контаминированных пищевых продуктов, воды и моллюсков.

ТАВЛИЦА 1. ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИ-HAV В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ^a

Возраст, годы	Социально-экономический статус							
	высокий		средний		низкий		всего	
	число обсле- дованных	число лиц с анти-HAV, %	число обсле- дованных	число лиц с анти-HAV, %	число обсле- дованных	число лиц с анти-HAV, %	число обсле- дованных	число лиц с анти-HAV, %
0—4	6	0	19	5	13	31	38	13
5—14	36	3	90	20	51	24	177	18
15—29	29	17	58	57	21	48	108	44
30—49	47	49	73	78	20	80	140	69
50 и старше	30	70	23	83	22	77	75	76
Всего	148	34	263	49	127	46	538	36

^a По неопубликованным данным исследования, проведенного Христианским корпусом, штат Техас, США

При недавно проведенном в США серо-эпидемиологическом исследовании было показано, что с возрастом увеличивается число лиц, имеющих антитела к вирусу, и что при этом имеется связь с социально-экономическими факторами (табл. 1). Предварительные исследования доноров показали, что в различных странах имеются выраженные различия в количестве лиц с анти-HAV (табл. 2), что, по-видимому, отражает различные эпидемиологические закономерности.

ТАБЛИЦА 2. ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИ-HAV У ДОНОРОВ В РАЗЛИЧНЫХ СТРАНАХ^a

Страна	Число обследованных	Число лиц с анти-HAV	% лиц с анти-HAV
Швейцария	98	23	23,5
США	629	251	39,9
Сенегал	1026	76	74,5
Бельгия	133	116	87,2
Китай (о. Тайвань)	93	82	88,2
Израиль	112	105	93,8
Югославия	100	97	97,0

^a По неопубликованным данным.

^b Больные, госпитализированные по поводу заболеваний, не связанных с поражениями печени.

7.2 Меры борьбы

Вероятность распространения инфекции от больного гепатитом А можно снизить с помощью соответствующих мер предосторожности, как, например, строгого соблюдения личной гигиены, соблюдения санитарных правил при удалении фекалий, кипячения посуды, а также нательного и постельного белья.

Внутримышечное введение пула нормального человеческого иммуноглобулина (16% раствор в дозе 0,02—0,12 мл/кг) перед контактом с вирусом или в начале инкубационного периода предотвращает развитие или ослабляет клинические проявления заболевания, хотя предупреждает инфекцию не всегда. Могут развиваться стертые или субклинические формы гепатита. Это может сопровождаться развитием пассивно-активного иммунитета, который обеспечивает длительную иммунную защиту таких индивидуумов.

Неоднократно была доказана ценность применения иммуноглобулина для борьбы со вспышками инфекций в таких учреждениях, как детские сады. Однако было высказано мнение, что использование иммуноглобулина в широких масштабах нежелательно по трем причинам: 1) лица с нераспознан-

ными безжелтушными или субклиническими формами заболевания могут распространять вирус среди окружающих; 2) такая практика является расточительной и 3) повторные введения иммуноглобулина, например, здоровым детям, могут быть нежелательными.

Недавно разработанные методы титрования анти-HAV обеспечивают возможность количественного анализа специфических антител в пуле иммуноглобулинов. Необходимо определять титры анти-HAV во всех сериях иммуноглобулинов, как только соответствующие реагенты станут общедоступными, и поощрять исследования по корреляции уровней антител со степенью защиты от инфекции.

8. СВОЙСТВА ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Циркулирующие в крови частицы, ассоциированные с вирусом гепатита В (HBV), подразделяются по меньшей мере на 3 отдельные морфологические категории: 1) маленькие плеоморфные сферические частицы со средним диаметром 22 нм; 2) трубчатые частицы различной длины и формы и 3) сам HBV — большие сфероидальные частицы с двойной оболочкой. Эти большие частицы HBV могут быть полными, частично заполненными или пустыми и могут быть разделены на сердцевину и наружный слой или оболочку.

8.1 Поверхностный антиген (HBsAg)

Присутствие отдельных поверхностных антигенных детерминант на корпускулярных структурах, ассоциированных с HBV, облегчает выделение поверхностного антигена (HBsAg) из нормальных белков сыворотки для иммунохимического анализа. Липопротеиновая природа поверхностного антигена позволяет проводить его частичное отделение от нормальных белков сыворотки по характерной для него плавучей плотности. Антигенная активность обнаружена в пределах зоны плотности, установленной для одного из двух основных субклассов липопротеинов высокой плотности (ЛВП₃: 1,08—1,21 г/мл). Точные значения плавучей плотности HBsAg варьируют в зависимости от используемых сывороток и химических веществ, используемых для формирования градиента плотности. Центрифugирование сыворотки в буферном растворе хлорида цезия приводит к сосредоточению поверхностного антигена в зоне со средним показателем плотности, составляющим 1,20 г/мл. Хотя в этой же фракции располагаются тубулярные формы, при этом значении плотности обнаружено только некоторое количество пустых или частично заполненных частиц HBV. Полные или частично заполненные частицы

HBV после равновесного центрифугирования в растворе хлорида цезия выявляются в зоне несколько более высокой плотности, равной 1,25 г/мл.

Очищенные небольшие частицы, диаметром 22 нм, которые составляют в количественном отношении основную массу HBsAg большинства сывороток, являются препаратами, наиболее часто используемыми для серологических и биохимических исследований. Все три основные морфологические формы можно разделить с помощью скоростного зонального центрифугирования, причем мелкие частицы с относительно низкой скоростью седиментации имеют среднее значение коэффициента седиментации (в воде при 20°) в пределах 33—54 S. Было обнаружено, что коэффициент диффузии мелких частиц в аналитической центрифуге составлял $2,278 \cdot 10^{-7}$ см²/с. Это значение совместимо с вычисленной молекулярной массой их, равной $2,4 \cdot 10^6$, которая хорошо согласуется с определенным при гель-фильтрации значением — $2,5 \cdot 10^6$.

Содержание липидов в очищенных мелких частицах может составлять до 30% их общей массы. Анализ хлороформ-метанольного экстракта с помощью тонкослойной хроматографии в силикагеле выявил преимущественное содержание в них полярных липидов, а также холестерина и небольшое количество неполярных липидов. Фосфатидилхолин, сфингомиелин и лизофосфатидилхолин были основными присутствующими в них фосфолипидами. Фосфатидилсерин совсем отсутствовал, а фосфатидилэтаноламин в ходе одного исследования обнаружить не удалось.

Белковая часть частиц, несущих HBsAg, была подвергнута широкому анализу. Исследования очищенных мелких сферических частиц с помощью ультрафиолетовой абсорбционной спектроскопии показали, что они имеют спектр поглощения, типичный для белка. Существенное содержание триптофана, составляющее приблизительно 14%, может быть причиной несколько повышенного показателя поглощения (при 280 нм в 1% растворе), равного 37,26, хотя имеются сообщения о других его значениях в пределах 25—30. HBsAg также богат гидрофобными аминокислотами, особенно лейцином. Исследования, проведенные с помощью дисперсии оптического вращения и кругового диахроизма, указывают, что 70—80% содержащегося в нем общего белка находится в форме α -спирали. Сходное высокое содержание α -спирали отмечено у лигопротеинов сыворотки, имеющих низкую плотность и у нитчатых бактериофагов, но у других вирусов обычно содержится 10—25% α -спирали. Следует отметить, что пролин, который составляет 11,6—13,6% общего количества аминокислот HBsAg, не принимает участия в образовании α -спирали.

Широкому анализу был подвергнут полипептидный состав HBsAg. Первоначально было описано два основных вида по-

липептидов со средней молекулярной массой 25 000 и 30 000. На определенных стадиях очистки выявлялись различные количества других компонентов с более высокой молекулярной массой, и предполагалось, что они являются контаминирующими сывороточными белками, возможно, играющими стабилизирующую роль в сохранении антигенной активности. Однако дальнейшие исследования HBsAg выявили наличие как больших, так и меньших полипептидных компонентов. Было сообщено о воспроизведимых различиях полипептидного состава субтипов ad и ay HBsAg, причем в материале ay был обнаружен дополнительный компонент. В ходе другого исследования, однако, между белками этих субтипов не было обнаружено существенных различий. Было выявлено, что по меньшей мере три полипептида в акриламидном геле окрашиваются периодистой кислотой по Шиффу, что указывает на присутствие углеводов. Кроме того, были выделены два гликосфинголипида, которые имели структурное сходство с фукозилгликолипидами, или гликолипидами групповой принадлежности крови.

Имеется мало сведений о четвертичной структуре частиц HBsAg и ее важности в сохранении антигенной целостности.

Исследования, включающие обработку очищенного HBsAg органическими растворителями и диссоциирующими реагентами, показали, что антигенная активность была исключительно стабильной в присутствии компонентов, способствующих денатурации, в частности, диэтилового эфира, хлороформа-мочевины в соотношении 1 : 1, додецилсульфата натрия и различных протеолитических ферментов. Однако обработка этанолом и бутанолом приводила к полной потере антигенной активности. Также было показано, что HBsAg остается стабильным после инкубации при кислом pH в течение нескольких часов. Обработка 5-кратными разведениями 0,02 н. HCl, pH 2,3, содержащими 0,02 % пепсина, приводит к освобождению антигена от нормальных сывороточных белков. Было обнаружено, что такие препараты пригодны для иммунизации как морских свинок, так и кроликов. Также было отмечено, что предварительная обработка додецилсульфатом натрия или диэтиловым эфиром увеличивает чувствительность антигена к протеолитическим ферментам. Поверхностные липиды могут поэтому оказывать защитное действие на антигенные детерминанты, состоящие главным образом из белка.

Восстановление дисульфидных связей приводит к полной потере активности HBsAg, хотя значительная часть антигенной активности может быть восстановлена путем алкилирования свободных сульфогидрильных групп йодаацетамидом. Для определения чувствительных и устойчивых к восстановлению компонентов антигена были использованы иммунодиффузия и реакция торможения гемагглютинации. Групповая

детерминанта *a* разрушалась обработкой дитиотреитолом в концентрации ниже 0,01 моль/л. При более высоких концентрациях дитиотреитола антигенная активность, устойчивая к восстановлению и не связанная с *d*, *u*, *w* и *g* субдетерминантами, присутствовала на тех же самых антигенных частицах.

HBsAg является термостабильным; не наблюдалось потери антигенной активности после прогревания очищенного антигена в течение 10 ч при 60°, хотя после прогревания в течение 5 мин при 100° полностью исчезает его аффинитет к антителам. Полная потеря антигенной активности наблюдалась после инкубации HBsAg в течение 60 мин при 85°. Было также показано, что общая детерминанта *a* стабильна при 60° в течение 21 ч.

Стабильность поверхностного антигена при высоких температурах и его устойчивость к действию протеаз говорит о наличии в его составе углеводов. О присутствии углеводов, а также липидов и протеина говорит преципитация радиоактивно меченного антигена конканавалином А и позитивная антронная реакция. Повысилась вероятность того, что углеводы могут играть определенную роль в сохранении серологической активности HBsAg. Было обнаружено, что после обработки раствором перийодата натрия (0,1 моль/л) в течение 4 ч при 37° серологическая активность очищенного HBsAg понижается на 90%. В тех же препаратах с помощью обработки фенолсерной кислотой выявлено присутствие значительных количеств углеводов относительно содержания белков. Было установлено, что содержание углеводов в HBsAg составляет 3,6–6,5%, и имеются данные, что по крайней мере некоторые из углеводов присутствуют в нем в виде гликолипидов. Однако остается установить, помогают ли углеводы сохранять структурную целостность примыкающих антигенных детерминант или они несут новую гаптеннную специфичность.

Недавно было предпринято несколько попыток получить на животных специфические антисыворотки к отдельным полипептидам, выделенным из HBsAg с помощью электрофореза в акриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Гуморальный и клеточный иммунные ответы наведение трех гликопептидов с молекулярной массой 19 000, 24 000 и 27 000, а также нескольких негликозилированных полипептидов большей молекулярной массы, был изучен на иммунизированных морских свинках. Полипептид с молекулярной массой 19 000, выделенный из частиц *a*_w, и полипептиды с молекулярной массой 27 000, выделенные из обеих субтипов *a*_d_w и *a*_w, не вызывали антителообразования. Негликозилированные полипептиды, выделенные из субтипов *a*_d_w и *a*_w, вызывали выработку антител, которые перекрестно реагировали в ходе радиоиммунопреципитации с интактными

частицами HBsAg. Поэтому эти полипептиды рассматривались как содержащие по меньшей мере *a*-группоспецифическую детерминанту. Полипептид с молекулярной массой 24 000 вызывал образование антител, которые реагировали только с гомологичным антигенным субтипов. Дальнейшие исследования этих полипептидов выявили клеточный иммунный ответ на введение компонентов с молекулярной массой 24 000 и 40 000. Было показано, что клетки перитонеального экссудата морских свинок, обработанных полипептидом с молекулярной массой 40 000, при разрешении интактными частицами гомологичного или гетерологичного HBsAg проявляют выраженную иммунную активность. Клетки экссудата животных, иммунизированных гликопептидом с молекулярной массой 24 000, выделенным из антигена субтипа adw, реагировали на интактный гомологичный антиген и его компоненты с молекулярной массой 24 000 и 40 000. Однако у этих животных наблюдался незначительный иммунный ответ на поверхностный антиген субтипа ayw. По данным другого исследования, антисыворотки к 7 полипептидам, полученным с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия поверхностного антигена с adw-детерминантами, реагировали при пассивной гемагглютинации с эритроцитами, покрытыми adw- и ayw-антigenами, и это указывает на то, что каждый из этих 7 полипептидов обладал по меньшей мере одной общей группоспецифической детерминантой. В экспериментах по конкурентному ингибированию с использованием интактных adw- частиц в качестве конкурирующего антигена были получены параллельные кривые титрования антисывороток. Смещение линейной части кривой ингибирования отражает различие в связывающем аффинитете этих антисывороток с интактными частицами HBsAg. Дальнейшая характеристика, основанная на результатах использования реакции пассивной гемагглютинации для анализа субтипа антител, показала, что каждый полипептид стимулировал образование как субтиповспецифических, так и группоспецифических антител.

Хотя препараты HBsAg, использованные в этих исследованиях, не содержали заметных количеств нормальных белков человеческой сыворотки, у морских свинок, иммунизированных нормальной сывороткой человека, позитивный клеточный иммунный ответ наблюдался после разрешения вышеупомянутым гликопептидом с молекулярной массой 24 000. Такой результат свидетельствует, что данный гликопептид содержит по крайней мере одну антигенную детерминанту, родственную определенным составным частям нормальной человеческой сыворотки.

Предполагали, что частицы HBsAg содержат небольшие количества компонентов нормальной сыворотки или что эти

компоненты являются контаминантами очищенных препаратов HBsAg. Недавно появилось сообщение, что поверхностный антиген специфически адсорбировался на колонке с иммuno-сorbентом, содержащей овечьи иммunoглобулины против сыворотки человека, ковалентно связанные с сефарозой 4В. Предварительная обработка очищенного поверхностного антигена протеазами и неионными детергентами в присутствии диэтилового эфира или без него не препятствовала адсорбции этого антигена на колонках, содержащих антисыворотки к предальбумину, альбумину, аполипопротеинам С и D и γ -цепи IgG, и это говорит о том, что антигенные детерминанты, родственные белкам хозяина, могут быть связаны с HBsAg. Восстановление и алкилирование этих препаратовнейтрализует активность поверхностного антигена, но не предотвращает его адсорбции, и это указывает на то, что связанные с HBsAg детерминанты, родственные белкам плазмы, отличны от групп-поспецифических и субтиповспецифических детерминант HBsAg. Было также отмечено присутствие дополнительных антигенных детерминант, тесно связанных с частицами HBsAg, с выявлением их низкого аффинитета с антисыворотками в реакциях иммunoпреципитации при использовании ряда компонентов нормальной человеческой сыворотки. Эти детерминанты не высвобождаются при воздействии кислотой, твином-80 или эфиром, но они утрачиваются при обработке поверхности антигена трипсином или бромелайном в условиях, которые в то же время сохраняют структуру мелких антигенных частиц. Следует отметить, что степень чистоты таких препаратов была в разных лабораториях различной.

8.2 Сердцевинный антиген (HBcAg)

Частицы HBV состоят из сердцевины диаметром около 27 нм с оболочкой толщиной 2 нм и наружного слоя или оболочки толщиной около 7 нм. Обработка этих частиц детергентом приводит к их разделению на наружную оболочку HBsAg и внутренний компонент диаметром около 27 нм. Антитела в сыворотке выздоравливающих от гепатита В реагируют с сердцевинным антигеном с образованием отчетливых иммunoных агрегатов, в которых не содержится других морфологических форм антигена HBV. Сходные содержащие сердцевину частицы были обнаружены в гомогенатах печени, полученных посмертно от больных хроническим гепатитом или от экспериментально зараженных шимпанзе; они были выявлены также при электронной микроскопии тонких срезов биоптатов печени, полученных от больных с хроническим поражением печени, связанным с наличием HBsAg.

HBcAg был точно идентифицирован в частицах HBV, отделенных с помощью равновесного центрифугирования от

мелких сферических и трубчатых форм HBsAg. Плавучую плотность сердцевины можно определить после удаления наружной поверхностной оболочки вируса путем обработки неионными детергентами, хотя точное ее значение может варьировать в зависимости от полноты удаления HBsAg. После обработки частиц HBV 1% раствором NP40 HBcAg обнаруживали в зоне плотности 1,31 г/мл. По-видимому, он агрегируется небольшими белковыми молекулами, которые, как считают, являются либо анти-HBc, либо белком «матрикса», находящимся между HBcAg и HBsAg, не будучи удаленным неионным детергентом. По данным другого исследования, HBcAg выявлялся в сходной зоне плотности, но все еще содержал следы HBsAg, в противоположность второй, более тяжелой его популяции с плотностью 1,35—1,36 г/мл, которая не содержала обнаруживаемого количества HBsAg. В связи с этим следует отметить, что, как было показано, частицы с активностью HBcAg, выделенные из печени инфицированных людей, имели плавучую плотность 1,30 г/мл. При аналогичном исследовании у частиц, полученных из печени экспериментально зараженного шимпанзе, активность HBcAg была обнаружена во фракциях, имеющих плотность 1,30—1,33 г/мл.

Результаты нескольких исследований показали, что сердцевина вируса обладает икосаэдральной симметрией. При обработке твином-80 частиц HBV высвобождались структуры, состоящие из внешней оболочки, имеющей подобные капсомерам единицы диаметром приблизительно 4 нм. Это наблюдение согласуется с данными об икосаэдральной симметрии HBcAg, полученными с помощью электронной микроскопии с применением ротационной техники. Электронномикроскопические исследования очищенных частиц, выделенных из печени экспериментально зараженного шимпанзе, также говорят о структурной организации субъединиц, соответствующей принципам икосаэдральной симметрии.

HBcAg-ассоциированная ДНК-зависимая ДНК-полимеразная активность тесно связана с ДНК-матрицей HBV. Во всех исследованных препаратах, которые были отобраны на основании высокой пропорции содержания частиц HBV, была обнаружена умеренная степень включения $\text{H}^3\text{-TTF}$ в кислотно-нерасторимый продукт на протяжении 6-часового периода инкубации при 37°. Внесения экзогенной матрицы при этом не требовалось. Реакцию стимулировали ионы магния при оптимуме pH 7,7. Использование детергента NP40 значительно повышает степень включения $\text{H}^3\text{-TTF}$. Продукт остается прочно связанным с HBcAg, что было показано с помощью специфической преципитации следовой метки антителами к этому антигену. Поэтому обработка детергентом, по-видимому, необходима для активации полимеразной реакции посред-

ством освобождения частиц HBV от наружного слоя, состоящего из HBsAg. Обработка HBcAg во время этой реакции приводит к получению меченого материала, который можно использовать в радиоиммунной методике для обнаружения анти-HBc. Исследования с помощью центрифугирования показали, что радиоактивная метка оседает вместе с быстро седimentирующей фракцией высвобожденных компонентов сердцевины с коэффициентом седиментации 110S.

Были проведены дополнительные исследования природы этого продукта после экстракции фенолом HBcAg, обработанного додецилсульфатом натрия и меркаптоэтанолом. Приблизительно 20% осажденного кислотой меченого материала было обнаружено в водной фазе и затем показано, что он имеет плавучую плотность, типичную для ДНК, располагаясь в зоне 1,71 г/мл. Двунитчатая природа этого материала была доказана по его устойчивости к воздействию нуклеазы (S_1), действующей на одноцепочечную ДНК, и тому факту, что его коэффициент седиментации 15S оставался неизменным в широких пределах солевых концентраций.

Невозможность ингибировать синтез ДНК de novo ни ДН-азой, ни РН-азой привела к необходимости разрушения очищенных частиц сердцевины для характеристики эндогенной матрицы. Двухнитчатая ДНК была выделена из циркулирующих в крови частиц HBV, а также из частиц, весьма сходных с сердцевинными, которые были получены из ядер инфицированных гепатоцитов. Частицы сердцевины, выделенные из плазмы, были сконцентрированы более чем в 1000 раз перед активированием полимеразной реакции и разрушением додецилсульфатом натрия. При электронномикроскопическом исследовании с помощью напыления обработанной внекорпускулярной ДНК было обнаружено, что она состоит из циркулярных молекул нукleinовой кислоты со средней длиной контура $0,79 \pm 0,09$ мкм. После обработки этого материала 40% раствором формамида не наблюдалось ни одной такой структуры, что подтверждает его двунитчатую природу. Тот факт, что те же данные были получены без постановки полимеразной реакции, показывает, что двунитчатая циркулярная форма не является продуктом полимеразной реакции и не изменяется при ней. Ни в одном из случаев не наблюдали суперспирализованные структуры. Тепловая денатурация указывает на содержание G+C, равное 48—49%, причем это значение несколько меньшее, чем приблизительное значение, составляющее 56%, выявленное в результате другого исследования, в котором сходная двунитчатая ДНК была обнаружена в частицах сердцевины, выделенных из ядер зараженных гепатоцитов человека. Совсем недавно было подтверждено, что структуры 15S ДНК, выделенные из частиц HBV, находящихся в сыворотке, являются циркулярными. Однако фраг-

ментация с помощью рестрикционного энзима эндонуклеазы R. Nae III как перед, так и после репликации ДНК *in vitro*, говорит о существовании однонитчатых участков на протяжении 10—20% общей длины молекулы. Эти однонитчатые зоны могли способствовать широким колебаниям значений длины молекул, наблюдавшимся при предшествующих электронномикроскопических исследованиях, так как длина молекул однонитчатой ДНК в значительной степени зависит от ионных условий. В данном исследовании эндогенная полимеразная реакция, по-видимому, восстанавливала однонитчатые участки до двунитчатой циркулярной ДНК. Более того, способность полимеразы, полученной из вируса миелобластоза птиц, синтезировать ДНК-продукт, показывает, что специфичность, наблюдавшаяся в эндогенной реакции, принадлежит матричной ДНК, а не с HBcAg-ассоциированной ДНК-полимеразе. Эта последняя может в действительности иметь отношение к хозяину. Такая возможность подтверждается теми данными, что такую ферментативную активность нельзя обнаружить в частицах сердцевины, присутствующих в ядрах инфицированных гепатоцитов, и это говорит о том, что данная активность может быть приобретена во время прохождения частиц сердцевины через цитоплазму гепатоцитов.

Недавно была высказана мысль о существовании способа репликации, который не требует экзогенного инициатора. При электронномикроскопическом исследовании обработанных дегидратом частиц HBV, полученных путем центрифугирования нескольких литров антигендодержащей плазмы, были обнаружены открытые двунитчатые кольцевидные структуры. Эти структуры, вероятно, возникают благодаря «разрыву» в одной из двух цепей, что позволяет этой цепи удлиняться начиная с открытого концевого 3'-гидроксиленуклеотида. Предполагается, что при этом способе репликации нуклеиновой кислоты типа «катящегося кольца» образуются короткие линейные нити, прикрепленные к циркулярным формам, и что эти структуры присутствуют в тех препаратах, в которых полимеразная реакция происходит перед экстракцией нуклеиновой кислоты. До настоящего времени в сообщениях не указывалось молекулярной массы ДНК, экстрагированной из сердцевины вируса, превышающей $2,3 \cdot 10^6$. Кажется маловероятным, чтобы вся информация, необходимая для внутриклеточной репликации вируса и экспрессии различных антигенных детерминант, кодировалась этой ДНК.

9. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕПАТИТА В

Для обнаружения антигенов и антител, связанных с вызванной HBV инфекцией, имеется целый ряд серологических методов. На практике эти методы используются главным об-

разом для а) установления диагноза вирусного гепатита типа В; б) изучения эпидемиологии гепатита В; в) оценки результатов пассивной и активной иммунизации для предотвращения гепатита В и г) выявления доноров крови и плазмы, являющихся носителями HBV.

В следующих разделах рассматривается вопрос о том, какие методы больше всего пригодны для различных практических целей и научных исследований, что определяется их чувствительностью, специфичностью и простотой. Некоторые методы, которые широко использовали в течение ряда лет, здесь подробно не обсуждаются; они рассматривались детально в предыдущем докладе^a.

ТАБЛИЦА 3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ HBsAg И АНТИ-HBs

Методы	Относительная чувствительность ^a при обнаружении				HBsAg и анти-HBc
	HBsAg	анти-HBs	HBcAg	анти-HBc	
Иммунодиффузия в агаровом геле	+	+			+
Встречный иммуноэлектрофорез	++	++	+	+	
Реакция связывания комплемента	++	++	-	++	
Реофорез	++	++	+	+	+
Обратная пассивная агглютинация частиц латекса	++				
Пассивная гемагглютинация	++ ^b	+++			
Иммунная гемагглютинация	+++	++	++	+++	
Иммуноэлектронная микроскопия	+++	+++	++	+++	
Иммунофлуоресцентная микроскопия	++	++	++	++	
Обратная пассивная гемагглютинация	+++				
Радиоиммунный анализ в твердой фазе	++++	++++	+++	++++	
Радиоиммунопрепарация	++++	++++		+++	
Иммуноэнзимный анализ	++++				

^a Оценивалась по шкале от наименьшей чувствительности (+) до наибольшей (++++) В этой оценке не дается никаких указаний об относительной специфичности рассматриваемых методов.

^b HBsAg обнаруживали с помощью реакции подавления пассивной гемагглютинации.

В табл. 3 суммированы серологические методы обнаружения различных антигенов и антител при работе с гепатитом В и приводятся данные об их относительной чувствительности.

^a Серия технических докладов ВОЗ, № 512, 1975.

9.1 HBsAg и анти-HBs

В крови больных острым гепатитом В обычно присутствует HBsAg от нескольких дней до нескольких месяцев. Интервал между контактом с вирусом и появлением в сыворотке HBsAg связан с инфекционным титром инокулята; он может быть от 2—3 нед при высоком титре инокулята до 3—4 мес при низком титре. Нарушение функций печени, а также клинические признаки и симптомы заболевания появляются через несколько дней или недель после первоначального появления HBsAg, зачастую в то время, когда содержание HBsAg достигает максимума. В большинстве случаев исчезновение HBsAg и последующее появление анти-HBs означают избавление от HBV-инфекции и развитие невосприимчивости к реинфекци. В 5—10% случаев гепатита В у взрослых HBV-инфекция персистирует и HBsAg продолжает обнаруживаться в течение многих месяцев или лет.

HBsAg был впервые идентифицирован с помощью иммунодиффузии. Эта методика является простой, недорогой и специфичной, однако малочувствительной и требующей больших временных затрат. Она особенно ценна для идентификации главных антигенных субтипов (adw, ayw, adr, и ayg) и для дальнейшего антигенного анализа HBsAg. Низкая чувствительность иммунодиффузии в отношении обнаружения анти-HBs делает его удобным методом скрининга сывороток на высокие титры анти-HBs в интересах производства реагентов и иммуноглобулина.

Встречный иммуноэлектрофорез, реакция связывания комплемента, реофорез и обратная пассивная агглютинация частиц латекса также могут использоваться для обнаружения HBsAg. Эти методы в 2—10 раз более чувствительны, чем иммунодиффузия, и являются более быстрыми, требующими для своего выполнения от нескольких минут до нескольких часов. Следует, однако, подчеркнуть, что все эти методы, исключая, возможно, иммунодиффузию и реофорез, приводят к получению значительного количества ложных положительных результатов при рутинном исследовании большого количества проб.

Иммуноэлектронная и иммунофлюоресцентная микроскопия являются высокоспециализированными методами обнаружения HBsAg, которые применяются в основном в ходе научных исследований. Иммунофлюоресцентная микроскопия является особенно ценным методом для изучения HBsAg в печеночной ткани, где он обнаруживается в цитоплазме инфицированных гепатоцитов.

Наиболее чувствительными методами обнаружения HBsAg и анти-HBs являются радиоиммунологические испытания, включая радиоиммунологический анализ в твердой

фазе и радиоиммунопреципитацию. Эти два типа радиоиммунологических методов различаются главным образом по подходам, используемым для отделения связанных меченых реагентов от свободных. Высокая чувствительность и объективность этих методов сводят к минимуму получение ложных отрицательных результатов. Хотя неспецифические ложные положительные результаты представляли собой проблему в начальных стадиях разработки метода радиоиммунологического анализа, эти трудности в основном уже преодолены. Тем не менее в силу необходимости удостовериться в специфичности реакций, протекающих при использовании этих высокочувствительных методов, обычно считают важным подтвердить специфичность этих реакций нейтрализацией или блокированием немечеными препаратами анти-HBs или HBsAg в зависимости от потребностей. Метод иммуносорбентного ферментативного анализа был модифицирован для обнаружения HBsAg. При недавно проведенной оценке было показано, что этот метод имеет чувствительность, сходную с чувствительностью радиоиммунологических методов. Коньюгаты энзим — антитело можно оценить количественно по их способности разлагать соответствующий субстрат. Невооруженным глазом можно различать изменения окраски или можно объективно регистрировать их с помощью простого спектрофотометра. Энзимоиммунологический анализ является, по-видимому, достоверной методикой в руках опытных работников и имеет преимущества, касающиеся стабильности и длительного срока хранения реагентов, простоты оборудования и высокой чувствительности. Ожидается дальнейшее усовершенствование энзимоиммунологического анализа. Этот метод заслуживает тщательной оценки ввиду его возможного широкого применения в лабораторной практике.

Агглютинация эритроцитов, нагруженных анти-HBs, называемая обратной пассивной гемагглютинацией, является другим чувствительным методом обнаружения HBsAg при условии, что приготовление реагентов и условия реакции оптимальны. При таких условиях чувствительность этой реакции приближается, но не совсем достигает чувствительности радиоиммунологического анализа. Для приготовления реагентов, используемых в реакции обратной пассивной гемагглютинации, успешно применяются эритроциты человека, индюков и баранов; наибольшая чувствительность отмечена в реакции с эритроцитами человека, нагруженными анти-HBs.

Эритроциты человека, обработанные хлористым хромом (III) и нагруженные очищенным HBsAg, являются высокочувствительным реагентом для обнаружения анти-HBs с помощью пассивной гемагглютинации. Однако, так как радиоиммунологические методы, применяемые для этих целей, несколько более чувствительны, они являются методами выбо-

ра, когда важно обнаружить очень низкий уровень анти-HBs. С другой стороны, количественное определение титров антител проводить несколько проще при использовании пассивной гемагглютинации, чем при использовании радиоиммунологических методов.

Почти все менее чувствительные методы обнаружения HBsAg можно также применять и при работе с анти-HBs. Ввиду своей низкой чувствительности эти методы, однако, будут давать много ложных негативных результатов при использовании для исследований населения и для тестирования проб сывороток больных, выздоравливающих от гепатита В. Эти методы наиболее полезны для обнаружения анти-HBs в представляющих ценность сыворотках с высоким титром антител.

9.2 Субтипирование HBsAg и анти-HBs

Было показано, что все 4 основные субтипа HBsAg (adw, ayw, adr и ayg) воспроизводят те же подтипы, и поэтому несомненно, что их специфичность определяется отдельными генотипами HB. Детерминантные пары d/u и w/g были открыты при изучении образования шпор в реакциях между определенными антисыворотками и образцами HBsAg в реакции иммунодиффузии. Эти субтипы, по-видимому, не могут помочь в предсказании клинического течения или исхода инфекции, вызванной HBV, но они чрезвычайно полезны для эпидемиологических исследований и, как было обнаружено, их распространность значительно варьирует в различных частях земного шара. Метод иммунодиффузии продолжает оставаться основным методом изучения субтипов HBsAg, и результаты его применения свидетельствуют о наличии нескольких следующих категорий основных субтипов, названных adw2, adw4, ayw1, ayw2, ayw3 и ayw4, а также и о дополнительных, полностью не изученных детерминантах хозяина, таких, как q, x, f, t, n, j, и g. В настоящее время продолжается работа с целью определить, являются ли некоторые из этих специфностей действительно различными детерминантами HBsAg, которые определяются вирусным геномом, или они до некоторой степени являются отражением антигенной и генетической конституции хозяина.

Большое практическое значение имеет тот факт, что оба метода — радиоиммунологический и пассивной гемагглютинации — были приспособлены в качестве высокочувствительных методик для субтипирования как HBsAg, так и анти-HBs. Таким образом, в настоящее время можно определять по меньшей мере специфичность d/u фактически при всех реакциях на HBsAg и анти-HBs. Одним из новых представлений, возникших вследствие повышения чувствительности

субтипования, является то, что конкурентные или гибридные инфекции adyw встречаются у большего числа индивидуумов, контактировавших с обоими субтипами, чем предполагалось ранее. При субтиповании были также получены доказательства того, что у лиц с персистирующей формой инфекции антитела к одному субтипу могут присутствовать одновременно с другими субтипами HBsAg.

9.3 HBcAg, анти-HBc и ДНК-полимераза

HBcAg был получен в количествах, необходимых для работы, из плазмы, богатой HBV, и из инфицированной печечной ткани. Обнаружение анти-HBc с помощью реакции связывания комплемента, встречного иммуноэлектрофореза и иммунофлюоресцентной микроскопии показало, что эти антитела являются ценным маркером репликации HBV, хотя анти-HBc несомненно персистируют в течение длительного времени после прекращения вирусной репликации у многих лиц. Анти-HBc часто появляются во время острой фазы инфекции, в то время, когда все еще присутствует HBsAg, и их можно обнаружить, часто в высоких титрах, почти у каждого носителя HBsAg. В самом деле, анти-HBc появляются у носителей так часто, что в настоящее время оценивается их возможное использование в качестве индикатора наличия HBV у лиц с невыявляемым HBsAg. С помощью высокочувствительных методов показано, что в ряде сывороток таких индивидуумов содержатся анти-HBc, хотя эти антитела не обнаруживаются с помощью менее чувствительных методов. Основной задачей теперь является точно установить, в какой, если вообще в какой-нибудь, из этих анти-HBc-позитивных, HBsAg-негативных сывороток содержится инфицирующий HBV.

В нескольких лабораториях была обнаружена ДНК-полимеразная активность, связанная с HBcAg. Эта энзиматическая активность часто обнаруживается на ранней стадии инфекции, вызванной HBV, когда имеется большое количество вирусных частиц, и она персистирует у некоторых индивидуумов с хронической формой инфекции. Однако во многих HBsAg-позитивных сыворотках, которые, вероятно, являются инфекционными, ДНК-полимеразной активности не содержится. ДНК-полимераза может служить показателем уровня инфекционности крови, но, видимо, не является столь достоверным маркером инфекционности, как HBsAg. Разработаны два высокочувствительных радиоиммунологических метода выявления анти-HBc, основанные на использовании в качестве меченого антигена частиц HBcAg, содержащих меченный тритием ДНК-продукт ДНК-полимеразной реакции. В первой из этих методик полимеразная реакция и реакция анти-

ген—антитело протекают в одно и то же время, после чего меченные изотопом иммунные комплексы осаждаются антиглобулиновой сывороткой. При втором методе проводится предварительная метка HBcAg тритием с помощью ДНК-полимеразной реакции, после чего осуществляется тест радиоиммунологического осаждения для выявления анти-HBc. Оба метода в несколько сот раз более чувствительны, чем реакция связывания комплемента или встречный иммуноэлектрофрез.

9.4 HBeAg и анти-HBe

Другим маркером инфекции, вызванной HBV, который, вероятно, коррелирует с числом вирусных частиц и степенью инфекционности HBsAg-положительных сывороток, является *e*-антigen (HBeAg). HBeAg—растворимый антиген, видимо, не являющийся компонентом вириона, но проявляющий явную специфичность при гепатите В, поскольку HBeAg обнаруживается только в сыворотках, содержащих HBsAg. В настоящее время единственным методом, используемым для обнаружения HBeAg и анти-HBe, является иммунодиффузия; показано, что лишь сравнительно небольшая часть HBsAg-положительных сывороток содержит HBeAg или анти-HBe. Помимо постулированной прямой связи HBeAg с инфекционностью, наличие этого антигена у носителей HBsAg рассматривают как возможный неблагоприятный прогностический признак при оценке тяжести и клинического течения хронического специфического поражения печени. Приведены, наконец, важные данные, свидетельствующие в пользу гипотезы о том, что выявление анти-HBe в сыворотках носителей свидетельствует об относительно низкой инфекционности этих сывороток. Биологическое значение этих маркеров, однако, интерпретировать пока трудно, как из-за нечувствительности метода иммунодиффузии, так и из-за того, что многие HBsAg-положительные сыворотки, по данным этой реакции, не содержат ни HBeAg, ни анти-HBe.

10. ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ГЕПАТИТЕ В

Иммунный ответ на инфекцию, вызванную HBV, обусловлен по крайней мере тремя антигенными системами—HBsAg, HBcAg и HBeAg, появляющимся в результате репликации вируса в печени.

10.1 Гуморальный ответ

У большинства больных HBsAg появляется в сыворотке во время инкубационного периода острой инфекции уже через

4—6 нед после заражения и за 2—8 нед до появления биохимических показателей поражения печени или начала желтухи. HBsAg персистирует в течение периода острого заболевания и обычно исчезает из кровотока в период выздоровления. Свободного HBcAg в циркулирующей крови не обнаружено. Вслед за HBsAg в крови больного появляется ДНК-полимеразная активность, обнаруживаемая непосредственно перед или в момент подъема уровня трансаминаз сыворотки. Полимеразная активность присутствует в течение нескольких дней или недель в случае острого заболевания и в течение нескольких месяцев или лет у части длительных носителей HBsAg. Анти-HBc начинают выявляться в сыворотке через 2—10 нед после появления HBsAg. Анти-HBc могут быть обнаружены в период острого заболевания и в течение некоторого времени после выздоровления, хотя и в понижающихся титрах. Обычно наиболее высокие титры анти-HBc обнаруживаются у длительных носителей HBsAg. Анти-HBc, по-видимому, коррелирует с количеством вируса и с длительностью его репликации. Анти-HBs появляются в последнюю очередь. Первичный тип ответного образования анти-HBs происходит в клинических случаях гепатита В после исчезновения HBsAg из сыворотки. Приводятся данные, свидетельствующие о том, что имеющий место при скоротечном гепатите иммунный механизм необычайно интенсивного и быстрого удаления HBsAg, ассоциированный с ранним появлением анти-HBs в период максимального поражения печени, может быть связан с патогенезом этой тяжелой формы заболевания^a. Ответное образование анти-HBs у большинства лиц, устойчивых к заражению при повторном контакте с HBV, является вторичным анамнестическим типом ответа. Титр анти-HBc, однако, остается при этом неизменным.

В сыворотках некоторых больных в течение инкубационного и острого периодов заболевания были обнаружены комплексы HBsAg—анти-HBs. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что эти локализуемые вне печени комплексы антиген — антитело имеют важное значение в патогенезе синдромов, характеризуемых тяжелым поражением кровеносных сосудов, а именно узелкового периартерита, некоторых форм хронического гломерулонефрита, когда указанные комплексы присутствуют в почечных клубочках, и детского папулезного акродерматита. HBsAg, анти-HBs, анти-HBc и иммунные комплексы HBsAg — анти-HBs были обнаружены у некоторых больных практически со всеми установленными хроническими осложнениями острого гепатита В. Остается неясным, однако, почему циркулирующие иммунные комплексы не обнаруживаются у большего числа таких больных и

^a Woolf, I. L. et al. *British medical journal*, 2 : 669 (1976).

почему только у небольшой части больных с циркулирующими комплексами развивается васкулит или полиартрит. Возможно, что эти комплексы становятся критическим патогенным фактором лишь в том случае, если они достигают определенной величины и определенного соотношения антигена и антител. Для окончательного выяснения роли иммунных комплексов в патогенезе поражений печени необходимо проведение дальнейших исследований.

10.2 Клеточный иммунитет

Клеточные иммунные реакции, как известно, имеют существенное значение в определении характера клинических проявлений и течения вирусных инфекций человека и животных. Наличие клеточного иммунитета к HBV-антителам было выявлено с помощью трансформации лейкоцитов и более определено при использовании теста подавления миграции лейкоцитов. При использовании в качестве испытуемого антигена частично очищенного HBsAg подавление миграции лейкоцитов было выявлено у большинства больных в острой фазе гепатита В. Указанное подавление становилось менее выраженным в период реконвалесценции и исчезало после выздоровления. Подавление миграции лейкоцитов было также обнаружено у значительной части HBsAg-позитивных больных с хроническим активным гепатитом^a. Однако трансформация лимфоцитов и миграция лейкоцитов неизменно были отрицательными у бессимптомных длительных носителей HBsAg. Эти наблюдения позволили предположить, что клеточный иммунитет играет определенную роль в завершении инфекции, вызванной HBV, и, при определенных условиях, в возникновении гепатоцеллюлярного поражения и создании аутоиммунитета. Нормальное функционирование Т-клеток может являться предпосылкой самоизлечения гепатита; если эта функция нарушена, то это может способствовать развитию хронического поражения печени. Если же эта функция полностью отсутствует, то конечным результатом может быть состояние бессимптомного носительства.

Была высказана гипотеза о том, что как HBsAg-позитивные, так и HBsAg-негативные случаи хронического активного гепатита обусловлены HBV. Согласно этой гипотезе, вирус проникает в некоторые гепатоциты, и к концу инкубационного периода на поверхности зараженных клеток появляются вирусные антителы. Т-клетки, узнающие эти новые детерминанты, разрушают инфицированные гепатоциты. Вирус освобождается из клеток и, в свою очередь, инфицирует другие гепатоциты. Обычно этот процесс предотвращается

^a Lee, W. M. et al. *British medical journal*, 1 : 705 (1975).

продукцией анти-HBs. Но те больные, у которых гепатит переходит в антигеннаположительную активную форму, либо неспособны продуцировать достаточное количество антител, либо синтезируют антитела низкого сродства, и при этих условиях инфекция становится персистентной.

Помимо этого, в результате стимуляции Т-клеток поврежденными гепатоцитами происходит активация В-клеток, реагирующих на поверхностные антигены гепатоцитов, включая специфичный для печени липопротеин. Происходит синтез антител к этому макролипопротеину, который считается нормальным компонентом мембраны интактных гепатоцитов; эти антитела, достигая печени, связываются с поверхностью periportalных гепатоцитов. Поскольку единственным возможным механизмом, ведущим к некрозу, является связывание комплекса, то вполне вероятна также активация К-клеток. Эти клетки несут на своей поверхности рецепторы к Fc-фрагменту молекул антител и, связываясь с покрытыми антителами клетками-мишениями, превращаются в цитотоксический фактор.

Синтез и высвобождение аутоантител, обладающих повреждающим действием, были бы в норме процессом, контролируемым супрессорными Т-клетками. Однако при антигеннаположительном активном хроническом гепатите такой контроль не осуществляется, несмотря на нормальное функционирование супрессорных Т-клеток, ввиду продолжающейся активации Т-клеток — помощников. В антигенотрицательных случаях гепатита В функция супрессорных Т-клеток дефектна, и хотя действие Т-клеток — помощников только преходящее, аутоиммунный ответ является длительным.

За выделением из печени человека двух органоспецифических белков последовало выявление органоспецифических антител в сыворотках некоторых больных активным хроническим гепатитом. Кроме того, была осуществлена индукция активного хронического гепатита у кроликов путем повторной иммунизации экстрактами, содержащими эти специфичные для печени белки. У значительного числа больных активным хроническим гепатитом и больных первичным билиарным циррозом наблюдалась клеточная гиперчувствительность к этим белкам, выявленная с помощью подавления миграции лейкоцитов. Совсем недавно сенсибилизация лимфоцитов к HBsAg была выявлена у всех обследованных больных активным гепатитом В; у многих больных обнаруживалась транзиторная сенсибилизация к липопротеину, специальному для печени.

Эти данные согласуются с предположением о том, что клеточный иммунный ответ на антиген гепатита В, наблюдающийся на ранней стадии острого гепатита, вызывает острое поражение печени посредством цитотоксического действия на

зараженные вирусом клетки. Если ответ на специфичные для печени липопротеины продолжается длительное время, то это может привести к развитию хронического поражения печени. Предположено также, что прогрессирующее поражение печени при остром хроническом гепатите обусловлено аутоиммунной реакцией, направленной против поверхностного липопротеина гепатоцитов; эта реакция инициируется во многих случаях при заражении HBV. Данные о наличии клеточного иммунитета к HBsAg были получены при обследовании многих больных антигенотрицательным хроническим гепатитом, что говорит о высокой частоте предшествовавшего заражения этих больных HBV. У большинства HBsAg-позитивных больных также выявлено наличие клеточного ответа на антиген. Свидетельства сенсибилизации к специальному для печени липопротеину были найдены у большей половины антигеннегативных больных; сходные данные были получены при обследовании антигеннегативных больных. Эти результаты находятся в соответствии с гипотезой, согласно которой инфекция, вызванная вирусом гепатита В, имеет важное значение в инициации заболевания у многих HBsAg-негативных больных активным хроническим гепатитом, хотя нельзя исключить и возможность наличия в этих случаях интеркуррентной инфекции гепатита В. Сенсибилизация к антигену мембранны клеток печени может являться аутоиммунным процессом, общим для всех разновидностей заболевания, и может быть причиной длительного повреждения печени^a. В одном из исследований было показано, что лимфоциты, полученные от 20 из 22 не получавших лечения больных активным хроническим гепатитом, проявляли цитотоксичность при инкубации с изолированными гепатоцитами кролика. Эксперименты по блокировке определенно говорят о том, что эта цитотоксичность обусловлена иммунологической реакцией, направленной на упомянутый поверхностный антиген клетки.

Проведение исследований клеточного иммунитета является более сложной и трудной задачей по сравнению с изучением гуморального иммунного ответа, и при интерпретации полученных результатов проявляется определеннаядержанность. Для внесения ясности в вопрос о роли клеточных ответов в патогенезе вирусного гепатита необходимо проведение дальнейших экспериментов.

^a EDDLESTON, A. L. W. F. Etiological factors in immune mediated liver disease. In: Ferguson, A. G. MacSween, R. N. M. ed. *Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract*. Lancaster, MTP Press, 1976, pp. 291—317.

11. ГЕПАТИТ В У ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЕЙ

Серийное пассирование вирусов гепатита А и В в культуре ткани все еще остается трудным. HBsAg изредка продуцируется в зараженных органных культурах печени человека, но серийного пассирования этого антигена добиться не удалось, и репликация HBV в этих условиях, видимо, является abortивной^a. Сходные результаты были получены при культивации фрагментов печени эмбриона человека на хорионаллантоисной мембране развивающегося куриного эмбриона. В гепатоцитах культивируемых эксплантатов биоптатов печени, полученных от детей с длительной антигенемией гепатита В, были выявлены внутриядерные вирусоподобные частицы. Недавно был опубликован обширный обзор данных литературы по этой теме^a. Необходимо проведение дальнейших обширных исследований основных механизмов, регулирующих прикрепление HBV к клеточным мембранам, пенетрацию клетки, синтез и сборку вирусных компонентов в системах культур клеток.

Из-за трудностей в подборе культур тканей, пригодных для репликации HBV, изучение вируса проводилось главным образом на экспериментальных животных. В настоящее время единственной подходящей моделью для изучения HBV *in vivo* являются шимпанзе^{b, в}. Обезьяны резус, как было показано к настоящему времени, не пригодны в качестве модели для проведения таких исследований; оценить возможное использование гиббонов для этой цели затруднительно ввиду ограниченной доступности этих животных.

Шимпанзе были использованы для получения важных новых данных о инфекционности материала, содержащего HBV, некоторых свойствах вируса, иммунопатологии, инактивации HBV, для проверки безопасности экспериментальных вакцин, эффективности пассивной и активной иммунизации и при осуществлении попыток прерывания состояния носительства HBV. Ниже приводятся некоторые новые важные данные, полученные в результате исследований, проведенных на шимпанзе:

- данные о том, что активная репликация HBV *in vivo* происходит только в гепатоцитах, но не в других тканях;
- данные о том, что передача HBV происходит при попадании вируса в рот, но не в желудок;
- доказательство того, что инфекционность HBV может длительно сохраняться в присутствии HBeAg;

^a Zuckerman, A. J. *Human viral hepatitis*. Amsterdam, North Holland / American Elsevier, 1975, pp. 386—394.

^b WHO Technical Report Series, No. 570, 1975.

^c Barker, L. F. et al. *American journal of the medical sciences*, 270 : 189 (1975).

— данные об антигенности и эффективности экспериментальных вакцин против гепатита В.

12. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГЕПАТИТА В

12.1 Состояние носительства

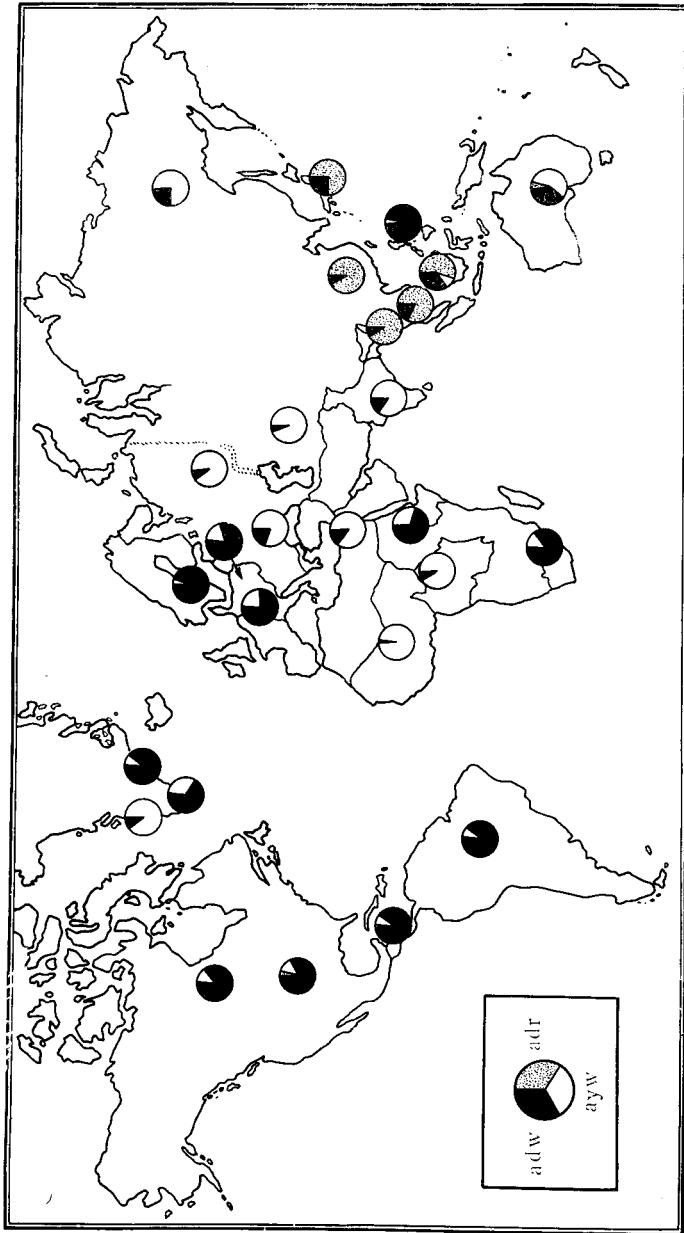
На основании обширных и длительных исследований больных гепатитом В присутствие HBsAg в течение более чем 6 мес было определено как состояние длительного носительства HBV. Такое состояние носительства может быть ассоциировано с поражением печени. Сохранение вируса среди людей обусловлено наличием резервуара вируса, каковым являются длительные носители, число которых достигает 120 млн. человек. Распространенность HBsAg среди внешне здорового взрослого населения варьирует от 0,1% в некоторых районах Европы, Северной Америки и Австралии до 15% в нескольких тропических странах. В пределах каждой страны могут существовать значительные различия в распространенности HBsAg между различными этническими и социально-экономическими группами^a.

В зависимости от развития состояния носительства установлен ряд факторов риска. Состояние носительства чаще наблюдается у мужчин, с большей вероятностью возникает вслед за инфекцией, перенесенной в детском возрасте, нежели во взрослом, и с большей вероятностью формируется у больных с естественными или приобретенными нарушениями иммунной системы. Имеются неподтвержденные данные об ассоциации состояния носительства с системой HL-A.

В странах, в которых инфекция, вызванная HBV, — относительно редкое событие, наибольшая распространенность HBsAg отмечена в возрастной группе 20—40 лет. С другой стороны, распространность анти-HBs увеличивается с возрастом. В странах, в которых инфекция, вызванная HBV, распространена широко, наибольшая распространенность HBsAg обнаружена у детей 4—8 лет с неизменно понижающимися уровнями среди старших возрастных групп. Снижение количества носителей HBsAg с возрастом говорит о том, что состояние носительства HBV не является пожизненным. HBeAg более часто обнаруживается у молодежи, чем у взрослых носителей, тогда как распространность анти-HBe, видимо, увеличивается с возрастом. Эти данные позволяют предположить, что молодые носители являются наиболее заразными.

^a Szmuness, W. *American journal of pathology*, 81 : 629 (1975).

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ОСНОВНЫХ СУБТИПОВ (adw, ayw, adr) HBsAg НА ЗЕМНОМ ШАРЕ *a*.



a Субтип ауг был обнаружен в 2 из 53 (3,8%) образцах сыворотки крови жителей Папуа Новой Гвинеи и в 10 из 2431 (0,4%) образца сыворотки крови жителей Японии; в других районах земного шара он встречается, по-видимому, очень редко. Представленные данные взяты главным образом из следующих публикаций: Суроисэ А. М. et al., ed. *HBs Antigen Subtypes, Proceedings of the International Workshop on HBs Antigen Subtypes, Paris, April 1975*, Basle, Karger, 1976 *Bibliotheca Haematologica*, No 42; и Nishioka, Кич et al. *Bulletin of the World Health Organization*, 52, 293 (1975).

Субтипы HBsAg. Исследования, проведенные во многих лабораториях^a, показали, что основные субтипы имеют различное географическое распределение (см. с. 43). Например, субтип auw встречается в широкой зоне, простирающейся от Северной и Западной Африки через Восточное Средиземноморье до Индийского субконтинента. В Северной Европе, Северной и Южной Америке и Австралии преобладают adw. В Индонезии, Малайзии, Папуа Новой Гвинеи и Таиланде обнаружены оба субтипа — adw и adr, тогда как в других частях Азии и районе Тихого океана доминирует субтип adr.

В некоторых странах субтипы HBsAg, наиболее часто выявляемые среди больных острым гепатитом В, отличаются от субтипов, обнаруживаемых у длительных носителей; возможно, это происходит из-за того, что распределение субтипов у этих носителей в большей степени определяется закономерностями предшествовавшей инфекции, чем инфекции, наблюдавшейся в настоящее время.

12.2 Пути распространения

Кровь

В районах низкого носительства основным путем распространения инфекции остается заражение кровью или некоторыми продуктами крови. Гепатит В может передаваться в результате трансфузии или случайного введения минимальных количеств крови, что может произойти в процессе хирургических или зубоврачебных манипуляций, внутривенного введения наркотиков, при массовых иммунизациях, татуировке, иглотерапии и лабораторном заражении. Случайные подкожные инокуляции используемыми в повседневном обиходе бритвами, зубными щетками, щетками для мытья и другими сходными предметами в ряде случаев были причинами отдельных заболеваний гепатитом В.

Было высказано предположение о том, что возможными переносчиками инфекции являются комары и другие кровососущие насекомые. Однако, несмотря на случаи обнаружения HBsAg у клопов, а также у нескольких видов комаров в полевых условиях, либо вскормленных на инфицированной крови, убедительных данных о репликации вируса у насекомых не получено. Хотя механический путь передачи инфекции и может иметь место, в нескольких исследованиях авторам не

^a Le Bouvier, G. L. a. Williams, A. *American journal of the medical sciences*, 270 : 165 (1975). Nishioka, K. et al. *Bulletin of the World Health Organization*, 52 : 293 (1975); Couroucé, A. M. et al. ed. *HBs Antigen subtypes: Proceedings of the International Workshop on HBs antigen Subtypes, Paris, April, 1975*. Basle. Karger, 1976 (*Bibliotheca haematologica*, No. 42), pp. 42—59.

удалось показать наличие ассоциации между активностью комаров и частотой носительства HBsAg и анти-HBs у человека.

Перинатальная передача

Передача инфекции от матерей-носителей детям может происходить в течение перинатального периода и, вероятно, является важным фактором, определяющим распространенность инфекции, вызванной HBV, в некоторых районах. Риск инфекции варьирует в разных странах и может достигать 40%. Обычно он выше для детей, рожденных материами-носителями в странах с высоким уровнем носительства вируса, чем для таких же детей в странах с низким уровнем носительства. К материнским факторам, имеющим, видимо, важное значение при определении вероятности заражения, относятся наличие данных о передаче инфекции предыдущим детям, высокий титр HBsAg и/или присутствие в крови HBeAg.

Острый гепатит В является редким осложнением беременности и может привести к преждевременным родам. Если болезнь появляется во втором или третьем триместре беременности или в течение 2 мес после родов, имеется значительный риск инфицирования ребенка.

Инфекция ребенка после острой или хронической инфекции матери обычно течет без желтухи и распознается при выявлении HBsAg в период между 60-м и 120-м днем после рождения. Большинство детей, инфицированных в это время, становятся длительными носителями вируса. Долгосрочный прогноз в этом случае неизвестен.

Механизм развития перинатальной инфекции точно неизвестен. Хотя HBV может инфицировать плод *in utero*, это, видимо, случается редко. Заражение, вероятно, происходит во время или вскоре после рождения в результате попадания материнской крови в кровеносную систему ребенка при заглатывании ее или при случайной инокуляции. Предварительные исследования позволяют предполагать, что введение иммуноглобулина гепатита В вскоре после рождения может обеспечить ребенка некоторой защитой против инфекции в перинатальном периоде.

Другие пути распространения

В семьях длительных носителей наблюдается более высокая частота заражения HBV по сравнению с другими. Механизм такого контактного распространения неизвестен, однако важной может оказаться передача изо рта в рот. HBsAg был выявлен в слюне больных острым гепатитом и хронических носителей HBV; предварительные данные показали инфекци-

онность слюны, содержащей HBsAg, для гиббонов и шимпанзе.

Значительным риском заражения сопровождается совместное проживание с остро или хронически инфицированным лицом. У сексуально неразборчивых субъектов уровень серопозитивности выше ожидаемого. Поскольку HBsAg был обнаружен в сперме, влагалищных выделениях и менструальной крови, вероятно, он может проникать через слизистые во время половых сношений. HBsAg был выявлен также в серозных экссудатах кожных язв. Контакт с таким материалом может играть некоторую роль в передаче инфекции, особенно в тропических странах.

Проведенные много лет назад исследования передачи гепатита В у человека, в ходе которых экстракты фекалий вводились через рот или подкожно, не выявили инфекционности фекалий; не наблюдалось также эпидемий гепатита В, обусловленных приемом контаминированной пищи или воды.

13. ПОСТТРАНСФУЗИОННЫЙ ГЕПАТИТ

13.1 Результаты внедрения в практику методов выявления HBsAg

Во многих странах нашли широкое распространение чувствительные методы индикации HBsAg в крови при переливании крови и в плазме при ее фракционировании. Влияние выявления HBsAg на снижение посттрансфузионного гепатита оценить трудно; оно варьирует в разных местностях в зависимости от таких факторов, как распространенность носителей HBV среди доноров и уровень иммунитета к HBV у реципиентов. Так, например, в районах земного шара с довольно высокой частотой носительства HBsAg, таких, как Азия и Африка, наблюдается высокая распространенность анти-HBs, которые могут защищать реципиентов переливающейся кровью от заболевания, вызываемого HBV, или по крайней мере снижать его тяжесть. Более того, точная оценка внедрения в практику методов выявления HBsAg требует дорогостоящих и длительных проспективных исследований пациентов, подвергнувшихся переливанию крови. При отсутствии таких исследований многие случаи посттрансфузионного гепатита нераспознаваемы из-за их нечеткого или субклинического характера. Службы переливания крови и органы здравоохранения не всегда могут быть оповещены даже о тех случаях заболевания, которые трактуются как очевидные. Несмотря на эти трудности, более тщательное изучение посттрансфузионного гепатита в последние годы дало возможность понять ряд важных аспектов эпидемиологии этой инфекции и позволило предложить методы борьбы с ней.

13.2 Основные факторы риска при посттрансфузионном гепатите

Уже давно стало понятным, что риск заболевания посттрансфузионным гепатитом у больных повышается с увеличением числа доз перелитой крови; это означает, что при оценке риска предпочтительнее говорить о количестве доз перелитой крови, нежели о числе пациентов, подвергнувшихся переливанию. Проведенные в США исследования убедительно показали, что риск возникновения посттрансфузионного гепатита также выше при переливании крови, сданной платными донорами, чем при переливании крови доноров-добровольцев. Обширные исследования, проводившиеся в течение 5 лет в ряде исследовательских центров США, говорят о снижении заболеваемости посттрансфузионным гепатитом, однако во многих случаях это снижение было обусловлено комбинированным влиянием прекращения использования крови платных доноров и отбраковкой крови, содержащей HBsAg.

13.3 Посттрансфузионный гепатит, не связанный с инфицированием HAV или HBV

Хотя выявление HBsAg не приводит к полной ликвидации риска возникновения гепатита в связи с переливанием продуктов крови, полученных от отдельных доноров, снижение частоты возникновения этой инфекции, документированное в нескольких проспективных исследованиях, было выражено в такой степени, что преобладающая форма посттрансфузионного гепатита в настоящее время ассоциируется с вирусами гепатита, отличными от HAV и HBV. В то время как до введения в практику методов выявления HBsAg около 30% случаев посттрансфузионного гепатита, включая большинство тяжелых, рассматривалось как заболевания, вызванные HBV, имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что этот вирус вызывает лишь около 10% случаев заболеваний, возникающих после переливания крови, в которой HBsAg с помощью одного из чувствительных методов не обнаруживался. Что касается остальных 90% случаев, то поскольку не имеется специфических серологических методов индикации инфекции, вызванной вирусами гепатита, отличными от HAV и HBV, постановка диагноза оказывается возможной лишь с помощью метода исключения. До сих пор связать эту форму посттрансфузионного гепатита с HAV, вирусом Эпштейна — Барра или цитомегаловирусом не было возможным^a.

Хотя этот синдром нельзя легко отличить от гепатита В на основании клинических проявлений, включая инкубационный период, длительность и степень подъема билирубина и

^a Alter, H. J. et al. *Lancet*, 2 : 838 (1975).

трансамина, имеются указания на то, что у больных, зараженных HBV, с большей вероятностью развиваются тяжелая острая и скротечная фатальная формы заболевания.

13.4 Перспективы борьбы с посттрансфузионным гепатитом

В странах, где оплата привлекает к донорству людей, использование крови которых связано с высоким риском возникновения посттрансфузионного гепатита у реципиентов, одним из наиболее эффективных и доступных подходов к снижению числа случаев посттрансфузионного гепатита является полный переход на систему получения крови от добровольцев. В США было показано, что высокий риск возникновения гепатита, связанный с переливанием крови от платных доноров, относится не только к инфекции, вызываемой HBV, но также и к заболеваниям, вызываемым другими вирусами гепатита. Хотя в некоторых исследованиях было показано, что переливание крови, содержащей анти-HBs, не связано с увеличенным риском возникновения посттрансфузионного гепатита, это может не относиться к крови, содержащей анти-HBc. В настоящее время продолжается оценка роли анти-HBc как дополнительного маркера крови, контаминированной HBV.

В то время как имеются труднопреодолимые препятствия к осуществлению удаления или инактивации HBV в крови, эритроциты, промытые с или без предварительного замораживания и оттаивания, возможно, могут являться менее вероятными переносчиками гепатита из-за удаления инфекционного агента. Этот подход активно изучается и может оказаться полезным и для предотвращения инфекций, вызываемых другими вирусами гепатита. Высокая цена на эти препараты, а также риск бактериальной контаминации в процессе производства представляют собой, однако, основные практические препятствия широкому распространению использования замороженных и отмытых эритроцитов.

13.5 Риск заражения гепатитом при использовании препаратов плазмы

Известно, что приготовление определенных препаратов плазмы из крупных пулов плазмы связано с высоким риском контаминации HBV. Хотя частота возникновения гепатита, связанного с переливанием этих продуктов, не была в достаточной мере оценена в количественном отношении, считалось, что большинство серий фибриногена, антигемофильного фактора и комплекса фактора IX, вероятно, содержит HBV. Прoverка исходного материала почти полностью устранила выпуск HBsAg-позитивных серий этих препаратов, однако, по-

скольку не было достаточного опыта работы с сериями препаратов, приготовленных из плазмы, проверенной с помощью чувствительных методов, не представлялось возможным определить влияние использования этих методов при оценке риска возникновения гепатита у реципиентов. Не имеется также достаточных сведений об относительном риске возникновения гепатита, связанного с переливанием препаратов плазмы, полученных из плазмы доноров-добровольцев, и препаратов, полученных из плазмы платных доноров, хотя в последней группе частота обнаружения HBsAg выше.

Описано много документированных случаев гепатита В, вызванного препаратами плазмы наиболее высокого риска, однако, несмотря на одно сообщение о том, что и другие гепатитные инфекции могут быть вызваны концентратами антигемофильного фактора, все еще остается неясным, могут ли эти продукты вызывать другие формы гепатита. Проведенные недавно исследования показали высокую частоту повышения уровня сывороточных ферментов, характерного для хронического персистентного гепатита, у больных гемофилией, которым в течение многих лет требовалось введение антигемофильного фактора, однако связи этих биохимических нарушений с вирусной контаминацией препаратов гемофильного фактора не ясна и требует дальнейшего изучения.

Хорошо известно, что иммуноглобулин, приготовленный методом холодного спиртового фракционирования по Кону, и продукты альбумина, приготовленные этим же методом и прогретые при 60° в течение 10 ч, свободны от контаминации HBV. Может быть, это не так в отношении иммуноглобулина, приготовленного с помощью других методов, как, например, фракционирования сульфатом аммония. Недавно был описан случай передачи гепатита В продуктом альбумина, однако наиболее вероятным объяснением случившегося, по-видимому, является нарушение производственного процесса, которое привело к неадекватному перемешиванию во время пастеризации.

К возможным путям повышения безопасности препаратов плазмы высокого риска относятся использование небольших пулов плазмы от доноров-добровольцев, отбраковка всех HBsAg-содержащих пулов плазмы после их проверки чувствительным методом в целях снижения до минимума заражения исходного материала вирусом гепатита и, возможно, использование новых методов фракционирования и обработки конечных продуктов. В настоящий момент эти продукты, включающие антигемофильный фактор, комплекс фактора IX и фибриноген, не могут рассматриваться как обязательно свободные от контаминации HBV, хотя некоторые отдельные серии и могут быть безопасными. До тех пор, пока не будут разработаны методы производства, с помощью которых будут

изготавляться абсолютно безопасные серии этих препаратов плазмы, в каждом отдельном случае должны быть взвешены как потенциальная польза их клинического применения, так и возможный риск передачи гепатита В.

14. ГЕПАТИТ КАК ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОПАСНОСТЬ

Вирусный гепатит представляет собой профессиональную опасность для работников здравоохранения. Специальные исследования показали, что фактором особого риска является HBV, а не HAV. Приводятся данные о редких случаях передачи гепатита В от медицинских работников пациентам, однако имеющиеся данные указывают на то, что медицинские работники подвергаются большему риску заражения гепатитом В от своих пациентов, чем наоборот, и что обычно эти работники не передают инфекцию пациентам^a. Некоторые профессии и места работы связаны с особой опасностью инфицирования вирусом гепатита В. К ним относятся профессии врача-стоматолога, медицинской сестры и сотрудника гемодиализного центра; в число сравнительно опасных мест работы входят онкологические отделения и гемодиализные центры, больничные лаборатории, банки крови и реанимационные отделения^b.

Риск заболевания гепатитом обычно связан с обработкой крови и других контаминированных выделений больных лиц; предполагаемым источником HBV для медицинских работников являются больные. При обследовании 6747 больных, последовательно поступивших в одну из крупных муниципальных больниц в районе с низкой циркуляцией HBV (процент носительства HBsAg в популяции составляет 0,4), HBsAg был выявлен в сыворотках 1% (66 случаев) госпитализированных больных, причем частота обнаружения была выше (2%) среди мужчин^b. Только у 12 больных с HBsAg (18%) был поставлен диагноз вирусного гепатита при поступлении или на основании запроса о наличии HBsAg. Таким образом, наличие HBsAg у остальных 54 больных осталось бы незамеченным, если бы не было проведено специального серологического обследования. Эти данные указывают на то, что сотрудники больницы, контактирующие с кровью или другими выделениями больных, имеют реальную возможность неоднократного контактирования с HBV. Еще выше риск повторного контакта с вирусом у сотрудников больниц, расположенных в районах с более высокой распространенностью HBV.

^a Alter, H. J. et al. *New England journal of medicine*, 292 : 454 (1975).

^b Pattison, C. P. et al. *American journal of epidemiology*, 101 : 59 (1975).

Врачи и стоматологи подвергаются повышенному риску инфицирования гепатитом В в процессе работы. Проведенное недавно серологическое обследование врачей и стоматологов показало, что частота заболевания гепатитом В среди обеих групп в 4 раза выше, чем среди лиц, работающих вне сферы медицинского обслуживания. Более того, врачи и стоматологи с хирургической специализацией подвергаются дополнительному риску инфицирования HBV по сравнению со своими коллегами-нехирургами.

Предотвращение профессиональной заболеваемости гепатитом В чрезвычайно важно. Соответствующим гигиеническим мероприятием является сведение к минимуму частоты контактов чувствительных лиц с кровью и другими потенциально опасными выделениями больных. Проведение этого мероприятия приводит к ликвидации передачи HBV без необходимости применения иммунопрофилактики даже в отделениях гемодиализа, в которых инфекция гепатита В носит эндемический характер.

Работники службы здравоохранения, не связанные с гемодиализными и онкологическими отделениями и занятые обработкой крови и других выделений, должны скрупулезно придерживаться строгих мер гигиены при работе со всеми материалами. Не следует, например, касаться руками рта или глаз. Для дальнейшего ознакомления с правилами выполнения лабораторных манипуляций следует обратиться к предыдущему докладу ВОЗ^a.

Не имеется указаний на то, что меры, направленные на выявление больных — носителей HBsAg, с последующей маркировкой лабораторных проб, полученных от этих больных, и специальные меры предосторожности при работе с этими пробами могут привести к более резкому снижению профессионального риска заболевания гепатитом В по сравнению с тщательным выполнением мер предосторожности при работе со всеми клиническими материалами.

Отделения гемодиализа и онкологические отделения

Необычайно высокая частота гепатита В была отмечена как среди больных, так и среди медицинского персонала гемодиализных и онкологических отделений. В то время как у персонала заболевание имеет тенденцию к самоизлечению, хотя иногда и носит тяжелый характер, у больных часто наблюдается длительное носительство HBsAg, вероятно, из-за дефектов иммунитета, обусловленных заболеванием и лечением. Состояние длительного носительства HBsAg, по-видимому, никоим образом не влияет на реакцию больных на лечение, включая трансплантацию почки в отделениях гемо-

^a WHO Technical Report Series, No. 512, 1973, pp. 47—52.

диализа^a. У хронически инфицированных больных после прекращения иммуносупрессивной терапии наблюдалось, однако, обострение заболевания печени, проявляющееся в появлении массивного некроза гепатоцитов с последующим скоротечным фатальным течением заболевания^b.

Как и ожидалось, ввиду эпидемиологических условий у больных и персонала гемодиализных и онкологических отделений обычно обнаруживается один и тот же субтип HBsAg. У больных хроническим заболеванием почек описана высокая частота носительства HBsAg, что, вероятно, свидетельствует о высокой инфекционности их крови.

В гемодиализных и онкологических отделениях передача HBV может быть снижена или устранена при выполнении следующих мероприятий:

- длительного скрининга крови больных и персонала с момента их поступления в отделения на HBsAg и предотвращения контакта между HBsAg-позитивным персоналом и восприимчивыми больными;
- изоляции HBsAg-позитивных больных от восприимчивых пациентов;
- использования для обслуживания HBsAg-позитивных больных персонала с наличием анти-HBs;
- использования для HBsAg-позитивных больных отдельного диализного оборудования.

Другие меры предосторожности приведены в предыдущем докладе ВОЗ^b.

В тех случаях, когда происходит очевидная передача HBV и при этом не могут быть применены гигиенические мероприятия, может быть рассмотрен вопрос о профилактике инфекции иммуноглобулином, содержащим анти-HBs, как это предлагается в следующем разделе, посвященном пассивной иммунизации.

15. ПАССИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

15.1 Клинические испытания

Хотя пассивная иммунизация с помощью различных препаратов иммуноглобулина при профилактике гепатита В и имеет плохую репутацию, это мнение объясняется результатами попыток предотвращения посттрансфузионного гепатита, осуществлявшихся в то время, когда случаи заболевания ге-

^a Soulier, J. P. et al. *Hépatite à virus B et hémodialyse*. Paris, Flammarion, 1975.

^b Galbraith R. M. et al. *Lancet*, 2 : 528 (1975).

^b WHO Technical Report Series, No. 512, 1973, pp. 45—46.

патитом В не могли быть отдифференцированы от других типов и когда еще не могло быть определено содержание специфических анти-HBs в препаратах глобулинов. Наличие методов определения сделало возможным отбор плазмы с высоким титром антител для приготовления иммуноглобулина против гепатита В и проведение новых клинических испытаний с целью определения безопасности и эффективности пассивной иммунизации против гепатита В. Иммуноглобулин против гепатита В, полученный из многих образцов плазмы, был проверен в рамках этих испытаний в ряде тех случаев, когда он мог оказаться полезным.

Испытания имели ряд недостатков, в частности не было рандомизированных контрольных групп лиц, получавших истинные препараты плацебо. Во многих исследованиях в качестве контрольного препарата использовали обычный иммуноглобулин с низким титром анти-HBs, однако этот выбор превращал интерпретацию результатов в до некоторой степени проблематичную задачу из-за возможной эффективности обычного иммуноглобулина для профилактики в некоторых случаях гепатита В^a. Так, например, незадолго до начала испытаний иммуноглобулина против гепатита В сравнительное изучение действия истинного плацебо и обычного иммуноглобулина с низким титром анти-HBs в эндемических условиях показало, что иммуноглобулин обеспечивает некоторую защиту против гепатита В, передаваемого при тесных личных контактах. Два последующих исследования действия иммуноглобулина гепатита В и обычного иммуноглобулина, в которых в качестве контрольных групп использовали нерандомизированные контрольные группы (в одну группу входили умственно отсталые дети из специализированного лечебного учреждения, во вторую — работники больницы), также свидетельствуют о том, что обычный иммуноглобулин, как и иммуноглобулин против гепатита В, обеспечивает некоторую защиту в условиях эндемической заболеваемости гепатитом В. В ранее проведенном исследовании лиц, прямо зараженных HBV, было продемонстрировано не только то, что иммуноглобулин гепатита В обладает большим защитным действием по сравнению с обычным иммуноглобулином, но и показано, что лица, получившие обычный иммуноглобулин, также обладают частичной защитой по сравнению с нерандомизированной контрольной группой. Данные, свидетельствующие о наличии некоторой эффективности обычного иммуноглобулина и о возможно большей эффективности иммуноглобулина против гепатита В, явились фоном дальнейших клинических испытаний, предпринятых с целью получения более убедительных данных об эффективности этих препаратов и выработки реко-

^a Alter, H. J. et al. *New England journal of medicine*, 293 : 1093 (1975).

мендаций по использованию пассивной иммунизации против гепатита В.

Имеется много случаев возможного клинического применения иммуноглобулина против гепатита В или обычного иммуноглобулина с целью защиты от гепатита В, но все они могут быть отнесены к трем основным категориям: (1) профилактика после контакта с инфекцией, (2) профилактика до контакта или при многократном контакте с инфекцией, (3) терапия. Судя по имеющимся данным, применение иммуноглобулина против гепатита В наиболее показано для профилактики заболевания после однократного острого контакта с HBV, например, после случайной инокуляции или попадания в рот клинических материалов, содержащих HBsAg. В одном из ранних исследований, в котором было имитировано случайное заражение, и в недавно проведенных полевых исследованиях было показано, что три серии иммуноглобулина против гепатита В, приготовленные тремя различными изготавителями, оказались более эффективными при создании пассивного иммунитета, чем обычный иммуноглобулин. Это исследование носило слишком ограниченный характер, чтобы быть статистически достоверным, хотя тенденция в отношении эффективности испытанных препаратов прослеживалась достаточно четко. В одном из полевых исследований при сравнении уровня заболеваемости через 4—6 мес после заражения оказалось, что иммуноглобулин против гепатита В был значительно более эффективным, чем обычный иммуноглобулин, однако через 8—12 мес после заражения эффективность этих двух типов иммуноглобулинов оказалась одинаковой из-за появления поздних случаев заболевания среди реципиентов иммуноглобулина против гепатита В^a. Выявление субтипов HBsAg и опрос больных не дали возможности определить обусловленность этих поздних случаев замедленным течением болезни или же следствием повторного заражения, хотя многие из пациентов работали в эндемических условиях, таких, как условия отделения гемодиализа, где повторные заражения вполне вероятны. При другом полевом исследовании было отмечено существенное снижение уровня заболеваемости среди реципиентов иммуноглобулина против гепатита В по сравнению с контрольной группой лиц, получавших обычный иммуноглобулин; на эти результаты не влияло появление поздних случаев заболевания^b.

Во всех проведенных до настоящего времени испытаниях не было получено данных, свидетельствующих об инфекционности иммуноглобулина против гепатита В или об увеличении числа носителей HBsAg среди зараженных лиц, получавших

^a Grady, G. F. et al. *New England journal of medicine*, 293 : 1067 (1975).

^b Seeff, L. B. et al. *Lancet*, 2 : 939 (1975).

этот препарат, хотя до начала этих испытаний некоторое опасение вызывала возможность формирования состояния носительства за счет иммуносупрессивного действия антител. Однако обширные полевые испытания лиц, контактировавших с HBV остро либо за счет эндемической обстановки, свидетельствуют о снижении распространенности анти-HBs среди лиц, получавших иммуноглобулин против гепатита В, по сравнению с лицами, получавшими обычный иммуноглобулин. В основе этого явления лежит либо процесс иммуносупрессии антителами, идущий несмотря на наличие субклинической вирусной инфекции, либо полное защитное действие, при котором неадекватная репликация вируса индуцирует активный иммунный ответ. Хотя последнее объяснение является более вероятным, было высказано опасение, что введение иммуноглобулина против гепатита В может продлевать период чувствительности индивидуума к HBV путем предупреждения развития субклинической инфекции и, следовательно, развития пассивно-активного иммунитета — явления, более часто наблюдаемого у реципиентов иммуноглобулина. Ввиду этой возможности широкое использование иммуноглобулина против гепатита В может быть нецелесообразным в эндемических условиях, где, как правило, имеют место повторные или хронические контакты с источником инфекции. В этих случаях может оказаться возможным создание пассивно-активного иммунитета с помощью препаратов иммуноглобулина, содержащих анти-HBs в сравнительно низких титрах. В конечном счете предпочтительным средством предотвращения гепатита В в эндемических условиях несомненно явится активная иммунизация, если станет доступной безопасная и эффективная вакцина против гепатита В.

Иммуноглобулин с относительно низким содержанием анти-HBs может быть пригоден для проведения пассивной иммунизации в определенных условиях, таких, как работа в отделении гемодиализа, где происходит постоянный контакт с источником инфекции; некоторые сравнительные исследования иммуноглобулина против гепатита В-и обычного иммуноглобулина в таких условиях показали различия в их эффективности, варьирующие от несущественных до значительных. Поскольку защитный эффект пассивной иммунизации с помощью любого препарата иммуноглобулина имеет только временный характер, остается неясным, должен ли иммуноглобулин вообще использоваться при постоянном контакте с источником инфекции, так как в этом случае будут необходимы многократные введения препарата до формирования активного иммунитета или до момента, когда индивидуум покинет данный эндемический очаг. В гемодиализных центрах для борьбы с HBV были с успехом использованы и иные профилактические подходы, основанные на целесообразных гиги-

нических мероприятий и эпидемиологических принципах. В таких центрах, следовательно, пассивная иммунизация не должна проводиться до возникновения ситуации, при которой другие методы не позволяют бороться с распространением инфекции.

При массированных однократных заражениях, например при случайном переливании HBsAg-позитивной крови или высокоопасных препаратов плазмы, эффективность иммуноглобулина против гепатита В или обычного иммуноглобулина не изучалась. Фактически посттрансфузионный гепатит В в результате тестирования крови с помощью чувствительных методов стал до такой степени редким событием, что было бы трудно получить достаточное количество данных о профилактической эффективности пассивной иммунизации.

Изучение эффективности иммуноглобулина против гепатита В для лечения острого скоротечного гепатита и состояния хронического носительства HBsAg не дало обнадеживающих результатов, хотя при этом и не возникало очевидных проблем, связанных с безопасностью. Последним вариантом использования иммуноглобулина против гепатита В после контакта с вирусом, который все еще изучается и в отношении эффективности которого имеются лишь предварительные данные, является защита младенцев, матери которых инфицированы HBV.

Исходя из упомянутых выше результатов различных клинических испытаний, при приготовлении иммуноглобулина против гепатита В, видимо, было бы желательным установить требования к потенциальной активности этого препарата — титр анти-HBs в нем должен быть равен или выше 1 : 100 000 по данным радиоиммunoлогического метода или реакции пассивной гемагглютинации. Для того чтобы контролировать потенциальную активность выпускаемых серий этого препарата, несомненно желательно иметь эталонный препарат для проведения сравнительных испытаний.

15.2 Основные принципы пассивной иммунизации против гепатита В

1. Как указано выше, основным показанием к применению иммуноглобулина против гепатита В является профилактика, осуществляемая после однократного острого контакта индивидуума с HBV, например, при попадании в организм крови, содержащей или подозрительной на наличие HBsAg, в результате случайной инокуляции («укол иглы»), попадания через рот (засасывание через пипетку) или попадания брызг на слизистые оболочки. Иммуноглобулин против гепатита В с высоким титром анти-HBs, стандартизованный по эталон-

ному препарату, должен вводиться взрослому человеку после указанного контакта в дозе 5 мл как можно быстрее.

2. В эндемических условиях, таких, как работа в гемодиализных центрах, где происходит передача HBV и где невозможно осуществление профилактических гигиенических мероприятий, может быть рассмотрен вопрос о профилактике восприимчивого персонала путем введения иммуноглобулина, содержащего анти-HBV; препарат должен вводиться много-кратно вплоть до блокирования передачи HBV. В настоящее время ведется дискуссия о том, какой иммуноглобулин предпочтителен — с высоким или с низким титром анти-HBs — и какая доза и частота введения должны использоваться при таких обстоятельствах.

3. Лица с наличием анти-HBs в относительно высоких титрах обычно устойчивы к инфицированию HBV и не нуждаются в пассивной иммунизации.

4. Пассивная иммунизация с помощью иммуноглобулина против гепатита В, видимо, не показана после переливания крови, учитывая, что HBsAg-позитивная кровь выбраковывается с помощью чувствительных методов, а также ввиду того что в таких условиях большинство случаев посттрансфузионного гепатита не обусловлены HBV.

16. АКТИВНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

16.1 Предварительные исследования

Высокий уровень инфицирования HBV среди определенных групп населения в развитых странах и среди всего населения во многих развивающихся странах указывает на срочную необходимость разработки вакцины против гепатита В. К числу тех категорий лиц, которым такая вакцина окажется очень полезной, относятся работники службы здравоохранения, работники лабораторий, пациенты и персонал гемодиализных центров, пациенты и персонал учреждений для умственно отсталых лиц, больные, которым предстоят некоторые хирургические операции, требующие переливания крови, а также люди, живущие в местностях с повышенным уровнем распространения гепатита В, особенно в тех районах, где часто регистрируется рак печени.

Хотя большинство применяемых в настоящее время антивирусных вакцин получено из вирусных антигенов или вирусов, выращенных в культуре ткани, HBV не был выделен и не пассивировался серийно *in vitro*. Таким образом, для разработки вакцины против гепатита В необходимо изыскать другие источники вирусного антигена. Больные хронической формой гепатита, вызванной инфекцией HBV, являются легко доступ-

ным источником вирусного антигена, поскольку их плазма содержит большие количества HBsAg. Предполагают, что сферические частицы размером 22 нм и тубулярные формы поверхностного антигена состоят из избыточного количества материала вирусной оболочки, который синтезируется зараженными клетками печени, но не собирается в полный вирус; в этих частицах нет HBeAg- и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы. Эти, по-видимому, неинфекционные формы HBV могут быть отделены от инфекционных частиц с помощью биофизических методов, и сферические частицы могут быть получены в высокоочищенном виде в больших количествах. Таким образом, существует возможность приготовления вакцины против гепатита В из вирусных компонентов, полученных путем плазмафереза от стойких носителей HBsAg.

Возможность осуществления такого подхода к разработке вакцины была показана в предварительных исследованиях, в ходе которых сыворотки крови человека или плазма, содержащие HBsAg, прогревали при 98° в течение 1 мин или при 60° в течение 10 ч и вводили добровольцам. Показана безопасность и частичная эффективность прогретой при 98° вакцины, однако в вакцине, приготовленной прогреванием при 60°, HBV полностью не инактивировался. Хотя эти исследования показали возможность иммунизации против гепатита В, в составе использованных препаратов содержались все антигенные компоненты HBV, включая цельные вирионы, а также не входящие в состав вирионов нормальные и, возможно, аномальные компоненты сыворотки крови или плазмы. В течение многих лет для инактивации HBV в частично очищенных препаратах плазмы, таких, как фракции альбумина и белков плазмы, использовалось прогревание, однако наличие остаточного инфекционного HBV в препаратах плазмы, прогретой при 60° в течение 10 ч, делало этот подход непригодным для получения инактивированной вакцины против гепатита В. По этим причинам предпринимаемые в настоящее время попытки разработки вакцины против гепатита В направлены главным образом на очистку и характеристику сферических частиц HBsAg размером 22 нм и составляющих их белков для использования в качестве иммуногенов.

Опубликованы данные предварительных исследований экспериментальных вакцин против гепатита В, приготовленных из частиц HBsAg размером 22 нм^{a, b}. Эти вакцины из субъединиц HBsAg готовили главным образом путем повторного равновесного центрифугирования в градиенте хлорида цезия и скоростного центрифугирования в градиенте сахара-

^a Purcell, R. H. a. Gerin, J. L. *American journal of the medical sciences*, 270 : 395 (1975).

^b Вуупак, Е. В. et al. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 151 : 694 (1976).

зы. Для того чтобы гарантировать отсутствие остаточного живого HBV в этих препаратах, проводили их обработку раствором формальдегида в условиях, успешно использовавшихся для инактивации других вирусных вакцин. Полученные препараты вакцин оказались безопасными, иммуногенными и эффективными для профилактики гепатита В у шимпанзе. В настоящее время на добровольцах в ограниченных масштабах проводят начальные испытания безопасности вакцин, полученных из субъединиц HBsAg.

Помимо разработки экспериментальных вакцин против гепатита В, состоящих из интактных сферических частиц HBsAg размером 22 нм, делаются попытки приготовления вакцин из входящих в их состав полипептидов^{a, b}. Целью этих исследований является выделение и изучение семи полипептидов, которые могут быть выявлены в препаратах HBsAg. Вакцины, приготовленные из таких полипептидов, были бы более безопасными, поскольку в них с еще меньшей вероятностью, чем в вакцинах, приготовленных из субъединиц, содержался бы живой HBV или сывороточные белки-контаминанты, которые могут, по крайней мере теоретически, приводить к возникновению неблагоприятных реакций аутоиммунной природы. Основными препятствиями для приготовления вакцины из полипептидов в настоящее время являются трудности в получении больших количеств пептидов в очищенном виде, относительно слабая иммуногенность этих полипептидов по сравнению с частицами размером 22 нм и контаминация некоторых пептидов компонентами сыворотки человека. Однако если эти технические трудности смогут быть преодолены или если антигенный компонент одного или нескольких полипептидов сможет быть синтезирован *in vitro* и присоединен к подходящему белку-носителю, то препараты полипептидов могут стать полезными вакцинами против гепатита В.

Недавно для частичной очистки экспериментальной вакцины против гепатита В, состоящей из частиц HBsAg размером 22 нм, были использованы колонки с иммunoсорбентом, содержащим соответственно анти-HBs человеческого происхождения и антитела животных к белкам человеческой сыворотки^b. После проверки безопасности материала на шимпанзе его вводили пациентам и персоналу одного из гемодиализных центров. Хотя в этом исследовании не было адекватной контрольной группы, полученные результаты свидетельствуют о значительном различии в частоте возникновения гепатита В в группе иммунизированных лиц и группе пациентов и персонала, не получавших вакцины.

^a Zuckerman, A. J. *Nature*, 255 : 104 (1975).

^b Melnick, J. L. et al. *Journal of infectious diseases*, 133 : 210 (1976).

^b Maupas, P. et al. *Lancet*, 2 : 1367 (1976).

Поскольку интерес к вакцинам против гепатита В возрастает, ожидается появление все в большем количестве экспериментальных вакцин, приготовленных в различных лабораториях с помощью разнообразных методических приемов. Перед тем как эти вакцины станут широко применяться на практике, необходимо выработать определенные минимальные критерии, предъявляемые к таким препаратам. Предлагаются следующие критерии и основные принципы.

16.2 Основные принципы приготовления экспериментальных вакцин против гепатита В

1. Вакцины должны изготавляться только в тех лабораториях, в которых может быть гарантирована высокая степень чистоты препарата. Необходимо проводить адекватные испытания безопасности и эффективности таких препаратов.

2. Необходимо уделить внимание отбору в качестве исходного материала для приготовления экспериментальной вакцины HBsAg позитивной плазмы, не содержащей частиц HBV, ДНК-полимеразы и e-антитела (HBeAg), поскольку эти компоненты ассоциированы с относительно более высокой инфекционностью HBV. Однако эта связь не является абсолютной и отсутствие этих маркеров не гарантирует отсутствия инфекционности. Другая проблема заключается в том, что эти маркеры инфекционности обычно обнаруживаются в образцах плазмы с наиболее высокими титрами HBsAg, т. е. как раз в тех образцах, которые потенциально наиболее пригодны для получения вакцины.

3. Вакцина должна приготавляться таким образом, чтобы обеспечивать максимальное, если не полное, удаление возможных контаминантов, таких, как нуклеиновые кислоты, антигены печени и другие белки хозяина.

4. Для того чтобы свести к минимуму риск попадания в препарат вакцины других антигенов, необходимо уделить внимание вопросу приготовления экспериментальных вакцин из материала, полученного от небольшого числа тщательно отобранных доноров, подвергающихся повторному плазмаферезу. В настоящее время не имеется методов выявления возможных носителей вирусов гепатита, отличных от HAV и HBV.

5. В процессе очистки в вакцину не должны попадать чужеродные антигены. Экспериментальные вакцины, приготовленные с помощью методов, сопряженных с риском контаминации, должны быть тщательно исследованы на присутствие чужеродных антигенов с помощью наиболее чувствительных методов.

6. Вакцина должна быть инактивирована с помощью методов, которые (а) с большой вероятностью вызывают инактивацию HBV и (б) являются воспроизведимыми и пригодными для обработки вирусных вакцин. Как прогревание (например при 60° в течение 10 ч), так и обработка раствором формальдегида в концентрации до 0,5 мл/л, видимо, удовлетворяют этим требованиям, однако в некоторых случаях прогревание не полностью инактивирует HBV, а обработка раствором формальдегида не эффективна, если вирусы находятся в агрегированном состоянии или если белки-контамиnantы присутствуют в высоких концентрациях.

7. Метод, используемый для приготовления вакцины, должен быть охарактеризован(а) с помощью соответствующих тестов на безопасность на серонегативных шимпанзе как метод, вызывающий инактивацию или удаление HBV, (б) с помощью соответствующих тестов *in vivo* и *in vitro* как метод, обеспечивающий получение продукта, не содержащего других вирусов, бактерий и микоплазм.

8. Используемый метод должен давать возможность постоянного получения вакцины, являющейся иммуногенной и способной обеспечивать защиту шимпанзе при повторном заражении живым HBV. В конечном счете этот критерий может быть заменен иным, в основе которого будет лежать соответствующий метод оценки снижения иммуногенности, проводимой на других лабораторных животных; это может произойти в том случае, если будет выявлена достаточная корреляция между результатами этого теста и оценкой защитного действия изучаемых препаратов на шимпанзе.

9. Первоначальное испытание любой новой экспериментальной вакцины против гепатита В на добровольцах должно проводиться последовательно, начиная с очень небольшого числа здоровых взрослых людей, способных оценить экспериментальный характер исследования и дать на это согласие; на этой исходной группе должна быть показана безопасность вакцины перед тем, как вводить ее большему количеству людей. Хотя имеются определенные преимущества в проведении исходных опытов по проверке безопасности на людях, подвергающихся в естественных условиях высокому риску заражения HBV, трудности в дифференциации между инфекцией, возникающей естественным путем, и инфекцией, являющейся возможным результатом вакцинации, делают предпочтительным проведение таких опытов на добровольцах, принадлежащих к группе низкого риска.

10. Лица, получающие экспериментальные вакцины против гепатита В, должны быть тщательно обследованы через короткие интервалы времени на наличие иммунного ответа на вакцину, иммунного ответа на антигены-контамиантные, развитие гепатита, присутствие аутоиммунных маркеров и другие

нежелательные реакции. При первоначальных испытаниях на людях особенно важно проводить долгосрочную оценку безопасности вакцины.

11. Так как первоначальные испытания безопасности вакцин против гепатита В, проводимые вначале на шимпанзе, а затем на людях, сопряжены с определенной степенью риска и затратами, связанными с использованием дефицитных животных, желательно приготовление достаточно больших серий экспериментальной вакцины для нескольких исследований, результаты которых можно затем тщательно сопоставить.

До сих пор остается неясным, должны ли вакцины против гепатита В содержать несколько субтипов HBsAg для обеспечения максимальной защиты, или же вакцина, приготовленная из одного субтипа антигена, будет в равной степени эффективна против всех субтипов вируса. Большинство эпидемиологических данных, а также данных, полученных в экспериментах по перекрестному заражению шимпанзе, показало, что инфекция, вызванная одним субтипов HBV, обеспечивает по крайней мере частичную защиту против другого субтипа вируса; однако данные о случайной реинфекции среди больных свидетельствуют о том, что такая перекрестная защита может быть неполной. До того как будет предложена окончательная формулировка требований к вакцинам против гепатита В, необходимо получить дополнительные данные о степени и длительности перекрестной защиты.

17. ЛЕЧЕНИЕ ГЕПАТИТА В ИНТЕРФЕРОНОМ

Попытки изменить течение инфекции, вызванной HBV, обычно оканчивались неудачно. Надежду на появление более эффективных методов терапии гепатита В дают результаты недавних исследований, продемонстрировавших явное ингибирующее действие интерферона на синтез и/или сохранение компонентов вируса гепатита В у хронически инфицированных людей и шимпанзе^{a, b, в}. Эффективными оказались как экзогенный интерферон, полученный из лейкоцитов человека или в культуре диплоидных фибробластов человека, так и эндогенный интерферон, индуцированный синтетическими производными нуклеиновых кислот. В этих исследованиях во время лечения интерфероном происходило снижение уровня ассоциированной с вирусом ДНК-полимеразной активности, концентраций HBsAg и HBeAg в сыворотке крови и содержания HBsAg и HBcAg в печени. Эти изменения в большинстве

^a Greenberg, H. B. et al. *New England journal of medicine*, 259 : 517 (1976).

^b Desmyter, J. et al. *Lancet*, 2 : 645 (1976).

^в Purcell, R. H. et al. *Lancet*, 2 : 757 (1976).

случаев были обратимы, но по крайней мере у одного больного периода улучшения сохранялся в течение длительного времени после прекращения введения интерферона.

В то время как эти предварительные данные носили ободряющий характер, все доступные в настоящее время препараты человеческого интерферона и большинство потенциально полезных индукторов интерферона обладают одним или более токсическим свойством, включая угнетение костного мозга, гепатотоксичность и лихорадку.

Интерферонотерапия, вероятно, может быть применена для лечения больных острым и хроническим гепатитом В, прекращения длительного носительства HBsAg, терапии первичного рака печени и нарушения перинатальной передачи HBV путем лечения либо беременной, либо новорожденного. В связи с последним следует отметить, что интерферон вызывает тяжелый синдром гломерулонефрита у новорожденных мышей, но не у более взрослых особей^a. До рассмотрения вопроса об испытаниях на людях необходимы обширные исследования безопасности препаратов на беременных и новорожденных обезьянах. Все испытания интерферона и индукторов интерферона должны проводиться с соблюдением предосторожности.

Интерферон не является в настоящее время широко доступным препаратом и чрезвычайно дорог. Однако если будет установлена его безопасность и терапевтическая эффективность, увеличение производства этого препарата, возможно, устранит указанные трудности.

18. ГЕПАТИТ В И ПЕРВИЧНЫЙ РАК ПЕЧЕНИ

Исследования, проведенные во многих странах, главным образом в Азии, Африке и районах Средиземноморья и Тихого океана, показали повышенную распространенность маркеров активной инфекции гепатита В, особенно HBsAg и анти-HBs, у больных первичным раком печени по сравнению с парными контрольными случаями или с населением в целом^b.

Имеется несколько возможных объяснений этого феномена. Одно из них заключается в том, что больные с развившимся первичным раком печени могут быть необычно чувствительны к острой инфекции, вызванной HBV, и к формированию состояния длительного носительства. Однако в районах, где частота возникновения постнекротического цирроза и первичного рака печени высока, инфекция, вызванная

^a Gresser, I. et al. *Nature*, 263 : 420 (1976).

^b Nishioka, K. et al. *Bulletin of the World Health Organisation*, 52 : 293 (1975).

HBV, с последующим формированием состояния длительного носительства отмечается наиболее часто среди младенцев и детей. Таким образом, похоже на то, что персистирующая инфекция, вызываемая HBV, происходит до начала хронического заболевания печени, а не после.

Второе возможное объяснение заключается в том, что хроническая инфекция, вызванная HBV, приводит к развитию постнекротического цирроза и что первичный рак печени развивается из регенерирующих узелков с помощью механизма, в котором HBV не участвует. Развитие первичного рака печени из регенерирующих узелков может являться причиной появления рака печени у больных с алкогольным циррозом. Однако эта последовательность событий не согласуется с тем, что в ряде случаев рак печени, связанный с персистирующей инфекцией, вызванной HBV, наблюдается у больных хроническим активным гепатитом, у которых цирроза печени нет.

Возможно, наконец, что HBV действует либо как канцероген, либо как коканцероген в хронически инфицированных гепатоцитах. Для индуцирования образования первичного рака печени могут потребоваться иные коканцерогенные воздействия, включая воздействие генетических, гормональных, иммунологических факторов и факторов окружающей среды. Если, однако, персистирующая инфекция, вызванная HBV, является важным онкогенным фактором развития первичного рака печени, то предотвращение HBV-инфекции в детском возрасте снизит частоту возникновения этой опухоли. С помощью этого косвенного подхода может оказаться возможной проверка гипотезы о том, что HBV способен индуцировать первичный рак печени у человека. Это может быть достигнуто даже без знания патогенеза хронического поражения печени, связанного с персистирующей инфекцией, вызванной HBV. Хотя имеется большое количество гипотез, объясняющих патогенетическую роль HBV в образовании первичного рака печени, истинный механизм этого явления до сих пор прямому экспериментальному исследованию не подвергался.

19. РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Крайне необходимы следующие эталонные препараты для использования в качестве рабочих стандартов при диагностике гепатитов А и В:

- HBsAg, включая основные субтипы
- анти-HBs, включая основные субтипы
- HBcAg
- анти-HBc
- HBeAg

- анти-HBe
- HAV
- анти-HAV

2. В каждом регионе ВОЗ должна иметься одна или более эталонных лабораторий. Эти лаборатории должны предоставлять рекомендации по использованию различных методов выявления антигенов, антител и вирусов гепатита, а также осуществлять подготовку соответствующих специалистов.

3. Для выявления в донорской крови HBsAg должен быть использован метод, по крайней мере такой же чувствительный, как реакция пассивной гемагглютинации; кровь, содержащая HBsAg, не должна использоваться для переливания. Методы выявления этого антигена должны постоянно пересматриваться по мере накопления новых данных в этой области. Хотя радиоиммунологический метод более объективен и более чувствителен, чем реакция обратной пассивной гемагглютинации, реагенты, используемые в реакции обратной пассивной гемагглютинации, более стабильны и дешевы, и эта реакция не требует специального оборудования. Энзимный иммунологический метод, разрабатываемый в настоящее время, возможно, совместит преимущества радиоиммунологического метода и реакции обратной пассивной гемагглютинации без соответствующих их недостатков.

4. Ввиду срочной необходимости внедрения в мировую лабораторную практику чувствительных и специфичных методов выявления HBsAg, рекомендовано организовать в нескольких районах земного шара под эгидой ВОЗ курсы по изучению методов диагностики гепатита В.

5. Нет необходимости исключать из числа доноров-добровольцев лиц с наличием в анамнезе гепатита или на основании обнаружения у них анти-HBs при условии, что (а) у этих людей не было приступа гепатита по крайней мере в предыдущем году и (б) кровь их HBsAg-негативна при исследовании высокочувствительным методом.

6. Невозможно точно определить группы доноров высокого риска, так как положение здесь, по-видимому, может быть различным в разных странах, в различные периоды времени и даже внутри одной и той же страны. Многочисленные исследования показали, однако, что платные доноры представляют собой группу особенно высокого риска передачи гепатита, и поэтому необходимо приложить все усилия к тому, чтобы полностью перейти на систему добровольной сдачи крови.

7. Необходимо использовать чувствительные методы выявления HBsAg, гарантирующие, что при приготовлении фракций белков плазмы используются лишь образцы плазмы, не содержащие HBsAg.

8. Комитет согласился с выводами предыдущих заседаний экспертов ВОЗ^a о том, что в настоящее время не имеется доказательств того, что носители HBsAg — медики или другие специалисты представляют собой постоянную опасность при контактах с населением при условии соблюдения ими обычных гигиенических мер в процессе работы. Рекомендованные ранее исследования контактов этих носителей^a должны быть продолжены в целях получения информации о специфических условиях, при которых может происходить передача инфекции.

9. Службе здравоохранения следует попытаться обеспечить поступление информации обо всех случаях острого гепатита с указанием возраста и половой принадлежности заболевших, а также поступление дифференцированных данных о заболеваниях гепатитом А, В и другими типами гепатитов.

10. В настоящее время развиваются исследования по приготовлению экспериментальных вакцин против гепатита В; некоторые из них основываются на использовании HBsAg или одного из его полипептидов. Подчеркивается, что, поскольку исходным материалом для приготовления этих вакцин является плазма человека, то для обеспечения их безопасности и эффективности необходимо соблюдение чрезвычайных мер предосторожности. До проведения исследований на людях необходимо проверить эти вакцины на животных. Рекомендации по приготовлению таких вакцин, включающих критерии безопасности, приведены на с. 60—62 этого доклада.

11. Национальные контрольные органы должны использовать эталонный препарат иммуноглобулина против гепатита В, для того чтобы гарантировать, что серии препарата, предназначенные для клинического использования, имеют адекватную активность.

12. Эталонный препарат иммуноглобулина против гепатита В должен быть подвергнут на международном уровне изучению для определения его пригодности в качестве международного стандарта.

13. Клинические испытания безопасности и эффективности новых лечебных или профилактических препаратов зачастую приходится проводить при непредсказуемых и меняющихся условиях, что делает затруднительным объективную оценку результатов. По этой причине рекомендуется применение, где это возможно, двойного слепого метода оценки, включая использование истинного плацебо.

14. Для того чтобы использовать наилучшим образом опыт, кадры и финансовые ресурсы, необходимо тесно коор-

^a WHO Technical Report Series, No. 512, 1973, p. 43; No. 570, 1975, p. 49.

динировать всю деятельность ВОЗ, направленную на распространение знаний о вирусном гепатите и борьбу с ним.

Рекомендации в отношении будущих исследований

15. Следует поощрять дальнейшие исследования, направленные на получение дополнительной информации об эффективности существующих анти-HBs в предупреждении посттрансфузионного гепатита, вызываемого присутствием HBV в донорской крови.

16. Первоочередной задачей следует считать разработку методов культивирования на клеточных и органных культурах для выделения и размножения вирусов гепатита.

17. Следует и дальше изучать *in vitro* клеточные иммунные реакции на антигены гепатита и на специфичные для печени антигены, чтобы выяснить роль этих ответных реакций в патогенезе поражений печени.

18. Вирусные частицы были обнаружены в фекалиях больных в ранней острой фазе гепатита А, и этот материал в настоящее время является основным источником получения антигенов, необходимых для разработки серологических тестов. Поэтому исследователи должны организовать сбор больших количеств образцов фекалий больных в начале острой фазы болезни, а также сывороток, взятых в острой фазе болезни и в период выздоровления в ходе документированных вспышек гепатита А.

19. Так как нечеловекообразные обезьяны, и особенно мarmозеты, имеют важное значение для изучения вирусного гепатита, а их поставка в настоящее время ограничена, руководители органов здравоохранения стран, где обитают эти животные, должны способствовать получению их в количествах, удовлетворяющих потребности медицинских научных исследований. Следует поощрять создание колоний этих обезьян, размножающихся в неволе, что может обеспечить научные исследования достаточным количеством животных.

20. Необходимо приложить дальнейшие усилия для идентификации и изучения свойств HBeAg и анти-HBe ввиду большого значения этой системы для изучения инфекционности HBV и вакцин против него.

21. Необходимо изучать факторы, способствующие перинатальной передаче гепатита В, и ее частоты в различных районах мира. Дальнейшей оценке подлежат меры профилактики перинатальной передачи болезни, такие, например, как введение иммуноглобулина против гепатита В.

22. Следует изучать отдаленные последствия гепатита В, перенесенного в раннем возрасте, с уделением особого внимания роли HBV в появлении первичного рака печени.

23. Необходимо определить механизмы, лежащие в основе

высокой частоты носительства HBV в эндемических районах, а также изучить связь между субтипами вируса и клиническим проявлением гепатита В.

24. Следует продолжить изучение возможной роли членистоногих в передаче гепатита.

25. Характерной чертой всемирных научных исследований в области вирусного гепатита является международное сотрудничество, характеризующееся необычайно широким обменом экспериментальными материалами. Важно, чтобы такое сотрудничество и обмен развивались и дальше. При этом необходимо соблюдать должное уважение к национальным и международным правилам безопасности при пересылке патологических материалов и образцов.

*Перевод с английского С. О. Вязова
Ответственный за редактирование Ю. Б. Елисеенков*

Заказ № 1174

Московская типография № 32 Союзполиграфпрома