https://doi.org/10.29296/25877305-2020-02-13

Авиремическая низкоуровневая репликация RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC (вторичная оккультная HCV-инфекция) как один из результатов первичной безинтерфероновой DAA-терапии в реальной клинической практике у ПВТ-наивных пациентов с хронической виремией RNA HCV (описание серии случаев)

А. Яковлев[1, 2], доктор медицинских наук, профессор,
Д. Сулима[3, 4], доктор медицинских наук, профессор,
В. Ларионов[5], **В. Корягин**[4], кандидат медицинских наук,
М. Шарипова[4], кандидат медицинских наук,
И. Федуняк[2, 6], кандидат медицинских наук,
В. Мусатов[1, 2], кандидат медицинских наук, **Г. Каченя**[2],
Е. Догужиева[2], **О. Соколова**[1, 2], кандидат медицинских наук,
О. Горчакова[3], кандидат медицинских наук,
А. Семенов[6, 7], доктор биологических наук, профессор,
Е. Зуева[7], кандидат биологических наук,
Ю. Останкова[7], кандидат биологических наук,
С. Просверницын[4, 6], кандидат медицинских наук,
С. Кияшко[4, 5], кандидат медицинских наук,
Ю. Чорногуз[7], **Д. Валутите**[7]
[1]Санкт-Петербургский государственный университет
[2]Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург
[3]Первый СПбГМУ им акад. И.П. Павлова
[4]ООО «Лечебно-консультативный стоматологический центр «Эксклюзив», Санкт-Петербург
[5]Научный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург
[6]Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург
[7]Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Санкт-Петербург
E-mail: uncledimamed@mail.ru

Представлены результаты собственного поискового исследования распространенности вторичной оккультной инфекции вирусом гепатита С (HCV) после различных режимов первичной безинтерфероновой (DAA) терапии оригинальными препаратами-ингибиторами в реальной клинической практике. Обследованы 27 случайным образом выбранных больных из 261 пациента, достигшего состояния традиционного плазменного устойчивого вирусологического ответа через 12 нед после окончания курса DAA-терапии, подтвержденного авиремией RNA HCV.

Ключевые слова: гепатология, вторичная оккультная HCV-инфекция, вторичный оккультный гепатит С, безинтерфероновая DAA-терапия, иммунные клетки крови PBMC/WBC, периферические мононуклеары, хроническая виремия RNA HCV, репликация RNA HCV в PBMC/WBC.

Для цитирования: Яковлев А., Сулима Д., Ларионов В. и др. Авиремическая низкоуровневая репликация RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC (вторичная оккультная HCV-инфекция) как один из результатов первичной безинтерфероновой DAA-терапии в реальной клинической практике у ПВТ-наивных пациентов с хронической виремией RNA HCV (описание серии случаев) // Врач. – 2020; 31 (2): 57–64. https://doi.org/10.29296/25877305-2020-02-13

Инфекция, ассоциированная с вирусом гепатита С (HCV), является одной из наиболее сложных медицинских проблем. HCV значительно распространена по всему миру, при этом наблюдаются многочисленные печеночные и внепеченочные осложнения, распространенность и тяжесть которых нарастает по мере увеличения продолжительности естественного течения хронической HCV-инфекции. По состоянию на начало 2019 г. число зарегистрированных в мире больных хронической HCV-инфекцией, по разным оценкам, варьирует от 70 до 170 млн человек, однако точное число HCV-инфицированных больных остается, скорее всего, заниженным [1].

Эффективное и безопасное лечение хронической HCV-инфекции в настоящее время обеспечивает безинтерфероновая (DAA) терапия новыми лекарственными препаратами-ингибиторами, которые выпускают в таблетированной форме. Новые препараты прямого противовирусного действия (ППВД), в числе которых – Paritaprevir/ritonavir/Ombitasvir + Dasabuvir (PTV/r/OBV+DSV), Daclatasvir (DCV), Asunaprevir (ASV), Sofosbuvir (SOF), Ledipasvir/Sofosbuvir (LDV/SOF), Glecaprevir/Pibrentasvir (GLE/PIB), Grazoprevir/Elbasvir (GZR/EBR), Velpatasvir/Sofosbuvir (VEL/SOF), начали применяться в клинической практике в России со 2-й половины 2015 г.

В качестве цели лечения больных HCV-инфекцией традиционно рассматривают достижение состояния устойчивого вирусологического ответа через 12 нед после окончания курса DAA-терапии (УВО12) [2]. Принято считать, что УВО12 косвенно указывает на эрадикацию HCV и при этом сопровождается купированием воспалительного процесса в печени и регрессом печеночного фиброза практически у всех пациентов [3]. В качестве лабораторного маркера УВО12 рассматривают авиремию, то есть отрицательные результаты тестирования RNA HCV в плазме крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) через 12 нед после окончания любого курса противовирусной терапии (ПВТ).

Однако с момента начала лечения гепатита С стандартным интерфероном (ИФН) остается предметом дискуссии и в настоящее время становится все более острым вопрос о том, является ли состояние плазменного УВО12 (пУВО12) достоверным показателем эрадикации HCV у всех больных, достигших пУВО12? Или в части случаев HCV-инфекция из виремической формы переходит в скрытую (оккультную) авиремическую форму со всеми вытекающими отсюда последствиями, которые обусловлены персистенцией (от лат. *persistere* – оставаться, упорствовать) и репликацией вируса в иммунных клетках крови и отсутствием широкодоступных методов контроля репликации HCV в этих клетках.

На сегодняшний день основополагающим лабораторным признаком серопозитивной (anti-HCV$^+$) оккультной HCV-инфекции, которая впервые описана в 2004 г., является обнаружение RNA HCV в «несыворо-

точных резервуарах» HCV при отрицательном результате ПЦР-тестирования RNA HCV в плазме крови [4]. К «несывороточным резервуарам» HCV относят клетки печени и иммунные клетки периферической крови PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells – мононуклеарные лейкоциты периферической крови) и костного мозга.

Подводя итоги результатов применения в клинической практике в 2011–2014 гг. первых полностью пероральных режимов первичной DAA-терапии, B. Attar и D. VanThiel (2015) высказали мыль о том, что распространенное предположение об излечении гепатита С у людей, достигших УВО12 после курса DAA-терапии, может быть не совсем верным. Исследователи рекомендуют тестировать RNA вируса HCV после лечения в несывороточных компартментах – иммунных клетках периферической крови, костного мозга и клетках печени [5].

В 2017 г. M. AbdAlla и соавт. показали 18% уровень распространенности вторичной оккультной HCV-инфекции среди 166 пациентов, которые достигли традиционного пУВО после разных режимов первичной DAA-терапии на основе ингибитора NS5B-РНК-полимеразы Sofosbuvir [6].

Особое внимание проблеме персистенции вируса гепатита С в мононуклеарных клетках периферической крови и клетках печени у больных с вторичной оккультной HCV-инфекцией, которые были «успешно вылечены» от гепатита С и достигли традиционного УВО12, уделили H. Innes и соавт. [7].

В 2018 г. интересные результаты оригинального исследования распространенности вторичной оккультной HCV-инфекции среди 150 больных с традиционным пУВО после режимов DCV+SOF±RBV, LDV/SOF±RBV, SIM+SOF, PTV/r/OBV+DSV, опубликовали M. Yousif и соавт. RNA HCV в иммунных клетках PBMC обнаружили у 17 из 150 пациентов, распространенность вторичной оккультной HCV-инфекции составила 11,3% [8].

В середине 2019 г. M. Mekky и соавт. сообщили о 4% уровне распространенности вторичного оккультного гепатита С после DAA-режима DCV+SOF среди 1280 больных, достигших пУВО12 [9]. RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC была выявлена в 50 случаях.

В конце 2019 г. исследовательская группа A. Wróblewska сообщила, что у 31 (74%) из 42 пациентов с хронической HCV-инфекцией 1b генотипа, которые после окончания первичной DAA-терапии в режимах PTV/r/OBV+DSV±RBV (n=18), LDV/SOF+RBV (n=20) и SOF+RBV (n=4) достигли традиционного пУВО12 и затем в течение еще 12–15 мес оставались стойко авиремичными, в иммунных клетках крови была выявлена RNA HCV [10].

Совсем недавно C. Lybecka и соавт. (2019) заявили о возможности обнаружить в PBMC через много лет после достижения УВО оккультную HCV-инфекцию, что достоверно повышает риск гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) *de novo* даже у пациентов без цирроза печени (ЦП) с многолетней стойкой авиремией RNA HCV и регрессом печеночного фиброза в результате ПВТ [11].

Расценив изложенные факты о вторичной оккульной HCV-инфекции как принципиально важные, авторы решили представить для широкого обсуждения результаты собственного поискового исследования распространенности вторичной оккультной HCV-инфекции после различных режимов первичной DAA-терапии оригинальными препаратами-ингибиторами в реальной клинической практике среди случайным образом выбранных больных (n=27) из числа пациентов, которые достигли состояния традиционного пУВО12 (n=261), подтвержденного авиремией RNA HCV.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Проведено двуцентровое проспективное обсервационное исследование продолжительностью 48 календарных месяцев (с 01.10.2015 по 30.09.2019). Исследовательскими центрами являлись 2 специализированные клиники для лечения больных с инфекционными заболеваниями – муниципальная больница (СПб ГБУЗ «КИБ им. Боткина», лицензия №ЛО-78-01-008099) и негосударственная медицинская клиника (ООО «ЛКСЦ «Эксклюзив», лицензия №ЛО-78-01-008870).

Терминология и определения:

- термин «ПВТ-наивные пациенты» употребляли применительно к лицам, которые никогда ранее с целью лечения хронической HCV-инфекции не получали никаких противовирусных лекарственных препаратов;
- термин «DAA-наивные пациенты» употребляли применительно к лицам, которые никогда ранее с целью лечения хронической HCV-инфекции не получали никаких противовирусных лекарственных препаратов-ингибиторов (к категории DAA-наивных пациентов относили также лиц, у которых был неудачный опыт ПВТ с помощью режимов на основе стандартного интерферона IFN-α (IFN-γ)±RBV или пегилированного интерферона Peg-IFN-α+RBV;
- термином «первичная безинтерфероновая DAA-терапия» обозначали безинтерфероновую терапию у DAA-наивных пациентов, которые никогда ранее с целью лечения хронической HCV-инфекции не получали никаких противовирусных лекарственных препаратов-ингибиторов, но могли иметь в анамнезе неудачный опыт ПВТ с помощью режимов на основе стандартного интерферона IFN-α (IFN-γ)±RBV или пегилированного интерферона Peg-IFN-α+RBV;
- термином «хроническая виремия RNA HCV» обозначали репликативный вариант хронической HCV-инфекции у ПВТ-наивных пациентов;

- термином «авиремия» обозначали отрицательный результат ПЦР-тестирования RNA HCV в плазме крови при помощи тест-системы с нижним порогом аналитической чувствительности 15 МЕ/мл;
- термином «промежуточный вирусологический ответ» (ПВО), или undetectable viremia at the end of DAA treatment (EOT), обозначали клиническую ситуацию, лабораторным маркером которой была авиремия на момент окончания курса DAA-терапии;
- термином «плазменный устойчивый вирусологический ответ через 12 нед после окончания курса DAA-терапии» (пУВО12 – плазма крови), или sustained virological response, 12 weeks after the end of DAA treatment (SVR12), обозначали клиническую ситуацию, лабораторным маркером которой была авиремия через 12 нед после окончания курса DAA-терапии;
- термин «неудачные исходы безинтерфероновой DAA-терапии» применяли для обозначения четырех возможных вариантов вирусологической неудачи, при которых не удалось добиться стойкого прекращения репликации вируса HCV:
  - DAA-неконтролируемая виремия RNA HCV – это клиническая ситуация у пациентов, у которых не удалось достичь авиремии в течение всего курса DAA-терапии, а также на момент окончания курса лечения и через 12 нед после окончания курса лечения;
  - ранний рецидив виремии RNA HCV – это клиническая ситауция у больных, которые достигли ПВО, но у которых в течение первых 12 нед после окончания курса DAA-терапии констатирован рецидив виремии RNA HCV;
  - отсроченный рецидив виремии RNA HCV – это клиническая ситуация у пациентов, которые достигли ПВО и пУВО12, но у которых после пУВО12 констатирован рецидив виремии RNA HCV;
  - вторичная оккультная HCV-инфекция – это клиническая ситуация у пациентов, которые достигли ПВО и пУВО12, но у которых в иммунных клетках крови PBMC и (или) WBC была обнаружена отрицательная цепь RNA HCV, подтверждавшая персистенцию и низкоуровневую репликацию RNA HCV.

Мощность исследования и демографическая характеристика пациентов. В общей сложности наблюдали ПВТ-наивных пациентов (n=272) с хронической виремией RNA HCV и различными клиническими формами хронической HCV-инфекции. Все включенные в исследование пациенты получили DAA-терапию новыми оригинальными лекарственными препаратами-ингибиторами.

Возраст включенных в исследование пациентов варьировал от 20 до 83 лет. Me (медиана) возрастного состава – 42,5 года. Пациентов старшей возрастной группы (не моложе 65 лет) было 12 (4,4%) из 272. Преобладали мужчины – 141 (52%), Me возрастного состава которых составила 43,6 года. Женщин было 131 (48%), в целом они были старше мужчин. Me возрастного состава женщин составила 47,4 года.

Критерии включения/исключения пациентов в исследование. В исследование вошли 272 ПВТ-наивных пациента с хронической виремией RNA HCV и компенсированным хроническим диффузным заболеванием печени (печеночный фиброз F0, F1, F2, F3 и F4/5–6 баллов по Child–Pugh) вне зависимости от уровня вирусной нагрузки и генотипа/субтипа HCV.

В исследование не включали беременных женщин, а также больных:

- моложе 18 лет;
- с субкомпенсированным и декомпенсированным ЦП функциональных классов Child-B и Child-C;
- страдавших тем или иным злокачественным новообразованием, вне зависимости от наличия/отсутствия ремиссии и прогноза выживаемости;
- имевших неудачный опыт ПВТ в режимах на основе стандартного IFN-α (IFN-γ)±RBV и (или) пегилированного IFN (Peg-IFN-α+RBV);
- имевших неудачный опыт ПВТ в любом комбинированном режиме IFN+DAA, в том числе Peg-IFN-α+RBV+ингибитор NS3/4A 1-го поколения (Telaprevir, Boceprevir), Peg-IFN-α+RBV+SOF, Peg-IFN-α+RBV+NS3/4A(Asunaprevir)+NS5A (Daclatasvir), це-Peg-IFN-α-2b+RBV+SIM [12];
- имевших неудачный опыт ПВТ в любом DAA-режиме на основе 1, 2 или 3 ингибиторов, в том числе SOF+RBV, NS3/4A+NS5A, NS3/4A+SOF, NS5A+SOF±RBV, NS3/4A+NS5A+NS5B±RBV, NS3/4A+NS5A+SOF±RBV.

Обследование перед лечением. Включенные в исследование ПВТ-наивные пациенты с хронической виремией RNA HCV перед началом курса DAA-терапии проходили лабораторно-инструментальное обследование в соответствии с протоколом специальной программы [13, 14], которая была разработана с учетом рекомендаций Международной экспертной группы по внепеченочным проявлениям HCV-инфекции [1].

ПЦР-тестирование иммунных клеток крови PBMC/WBC. RNA HCV в лейкоцитарных клеточных субстанциях WBC/tf (White Blood Cells total fraction; тотальный лейкоцитарный клеточный пул) и PBMC тестировали с помощью качественной ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени. Применяли тест-систему «АмплиСенс HCV-FL» с нижним порогом аналитической чувствительности 25 МЕ/мл и анализатор-термоциклер (амплификатор) ICycler iQ5 (Bio-Rad, США) для детекции нуклеиновых кислот методом ПЦР в режиме реального времени.

Высококачественную RNA HCV из WBC выделяли с помощью реагента TRIzol – специального органиче-

ского раствора, который применяют для экстракции RNA, DNA или белков в соответствии с методикой «гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция» Хомчинского [15]. В процессе гомогенизации биологической ткани TRIzol разрушает (лизирует) мембраны клеток и внутриклеточных органелл и одновременно с этим стабилизирует (поддерживает целостность) RNA или DNA.

PBMC выделяли в градиенте плотности методом центрифугирования с помощью Ficoll Paque – специального органического раствора полисахарозы 400 с диатризоатом натрия, оптимизированным для создания раствора с заданным градиентом плотности.

Репликативные варианты хронической HCV-инфекции у пациентов перед включением в исследование. С учетом клинико-эпидемиологических особенностей хронической HCV-инфекции и динамики уровня виремии RNA HCV в зависимости от наличия и характера ПВТ, авторы выделяли у пациентов перед включением в исследование 5 репликативных вариантов хронической HCV-инфекции [14], в числе которых:

1) хроническая виремия RNA HCV;
2) ПВТ (IFN/DAA)-неконтролируемая виремия RNA HCV;
3) ранний рецидив виремии RNA HCV;
4) отсроченный рецидив виремии RNA HCV;
5) авиремическая низкоуровневая репликация RNA HCV в PBMC/WBC.

В основную группу поискового исследования были включены лица только с хронической виремией RNA HCV, которые не имели никакого опыта ПВТ.

Таблица 1

Режимы первичной DAA-терапии у ПВТ-наивных пациентов, включенных в исследование (n=272)

Режим DAA-терапии	Общая когорта
8-недельный режим	
PTV/r/OBV+DSV, 8 нед	20
GLE/PIB, 8 нед	2
Итого	**22**
12-недельный режим	
PTV/r/OBV+DSV, 12 нед	121
PTV/r/OBV+DSV±RBV	20
DCV+SOF	54
LDV/SOF	11
GLE/PIB	2
Итого	**208**
24-недельный режим	
ASV+DCV	32
DCV+SOF+RBV	10
Итого	**42**

Клинические формы HCV-синдрома у включенных в исследование пациентов. С учетом широкого клинико-лабораторного спектра хронической HCV-инфекции авторы выделяли у пациентов, включенных в исследование, 4 клинические формы HCV-синдрома [14], в том числе:

1) HCV-ассоциированный хронический гепатит в любой (включая цирротическую) стадии заболевания (HCV-ХГ/ЦП);
2) комбинированный HCV-синдром (HCV-ХГ/ЦП в сочетании с HCV-с/КГ или HCV-КГ/в);
3) HCV-ассоциированный иммунопатологический синдром (HCV-с/КГ или HCV-КГ/в);
4) бессимптомный HCV-синдром (HCV-ассоциированный хронический субклинический воспалительный синдром, бессимптомная виремия RNA HCV).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснование выбора и краткая характеристика режимов первичной DAA-терапии у включенных в исследование пациентов. Выбор конкретного режима первичной DAA-терапии у каждого из 272 ПВТ-наивных пациентов основной группы осуществляли на основании ежегодно обновлявшихся (2015, 2016 и 2018) рекомендаций EASL по лечению гепатита С [16–18]. Учитывали генотип/субтип вируса HCV, наличие/отсутствие у пациента HCV-ЦП (ЦП в исходе HCV-ассоциированного хронического гепатита) и наличие/отсутствие в анамнезе у пациента опыта ПВТ в режимах стандартного IFN-α (IFN-γ)±RBV, Peg-IFN-α+RBV±SOF, Peg-IFN-α +RBV+ингибитор сериновой протеазы 1-го поколения (Telaprevir, Boceprevir) и SOF+RBV. В обязательном порядке принимали во внимание концентрацию RNA HCV в единице объема плазмы крови (вирусную нагрузку), выделяя при этом низкий (≤800 000 МЕ/мл), высокий (800 000–6 000 000 МЕ/мл) и сверхвысокий (≥6 000 000 МЕ/мл) уровни.

Пациентам назначали 8-, 12- и 24-недельные DAA-режимы, в состав которых входили 2 или 3 пангенотипных или таргетных (*target* – цель, мишень) ингибитора белков-ферментов NS3/4A, NS5A и NS5B в сочетании с рибавирином или без такового (табл. 1).

Короткие 8-недельные режимы PTV/r/OBV+DSV и GLE/PIB получали 22 (8%) больных основной группы, 12-недельные режимы PTV/r/OBV+DSV±RBV, DCV+SOF, LDV/SOF и GLE/PIB – 208 (77%), остальные 42 (15%) больных получали 24-недельные режимы DCV+SOF+RBV и ASV+DCV. Me (медиана) длительности курса первичной DAA-терапии составила 12 нед.

Традиционная оценка эффективности первичной DAA-терапии на основании результатов ПЦР-тестирования RNA HCV в плазме крови (пУВО). На 1-м этапе оценки эффективности анализировали показатели промежуточного и конечного (целевого) результатов первичной DAA-терапии. В качестве лабораторного показателя промежуточного результата лечения рассматривали не-

определяемый уровень RNA HCV в плазме крови сразу после окончания курса первичной DAA-терапии и обозначали достигнутое состояние как ПВО, или EOT. В качестве лабораторного показателя конечного (целевого) результата лечения рассматривали неопределяемый уровень RNA HCV в плазме крови спустя 12 нед после окончания курса первичной DAA-терапии и обозначали достигнутое состояние как пУВО12 (плазма крови, устойчивый вирусологический ответ, 12 нед), или SVR12 (sustained virological response 12 weeks after the end of DAA treatment). Для ПЦР-тестирования RNA HCV в плазме крови применяли аналитическую тест-систему COBAS 4800 (Roche Diagnostics, США) с нижним порогом обнаружения RNA HCV 15 МЕ/мл.

Показатель промежуточной эффективности первичной DAA-терапии в части достижения ПВО у 272 ПВТ-наивных пациентов основной группы оценивали по соотношению числа больных, достигших ПВО (n=270) к числу больных, получивших полный курс первичной DAA-терапии (n=272). У 2 пациентов констатировали DAA-неконтролируемую виремию RNA HCV на основании того, что RNA HCV в плазме крови у этих больных определялась не только в течение всего курса DAA-терапии и сразу после окончания курса лечения, но и спустя еще 12 нед после него. Значение показателя промежуточной эффективности первичной DAA-терапии составило 270 (99,2%) из 272.

Показатель конечной (целевой) эффективности первичной DAA-терапии в части достижения пУВО12 в той же группе пациентов оценивали по соотношению числа больных, достигших УВО12 (n=261) к числу больных, которые получили полный курс первичной DAA-терапии (n=272). У 9 пациентов констатировали ранний рецидив виремии RNA HCV, так как у них не был достигнут пУВО12, несмотря на достигнутый ПВО. Значение показателя конечной (целевой) эффективности первичной DAA-терапии составило 261 (95,9%) из 272.

Интересно отметить, что у обоих пациентов с DAA-неконтролируемой виремией RNA HCV и у 7 (77,7%) из 9 пациентов с ранним рецидивом виремии RNA HCV клинические формы хронической HCV-инфекции были представлены комбинированным HCV-синдромом и HCV-ассоциированным иммунопатологическим синдромом. Одной из главных отличительных особенностей этих клинических форм является лабораторный феномен HCV-ассоциированной смешанной криоглобулинемии, на основании чего авторы высказали предположение о возможном негативном характере влияния внепеченочной репликации RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC на конечный результат DAA-терапии у ПВТ-наивных пациентов.

Углубленная оценка эффективности первичной DAA-терапии на основании результатов поискового ПЦР-тестирования RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC (лимфоцитарный УВО). В соответствии с рекомендациями WHO, AASLD и EASL, стойкую авиремию RNA HCV в течение 12 нед после кончания курса DAA-терапии в настоящем исследовании традиционно рассматривали как цель лечения у ПВТ-наивных пациентов. Однако вопрос о том, всегда ли отрицательный результат ПЦР-тестирования RNA HCV в плазме крови после успешного курса ПВТ является достоверным лабораторным маркером эрадикации HCV, по мнению авторов, оставался открытым и требовал обсуждения. Особенно в свете многочисленных данных об отсроченных рецидивах виремии RNA HCV и (или) отсутствии иммунологического ответа в виде стойкой криоглобулинемии после DAA-терапии у определенной части пациентов, «успешно вылеченных» от гепатита С [5, 6, 8–10, 19], когда в качестве критерия «успешности» рассматривали авиремию RNA HCV.

В этой связи в качестве метода углубленного лабораторного контроля (отсутствия/наличия) репликации RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC у пациентов с авиремией RNA HCV после первичной DAA-терапии авторы впервые в своей клинической пратике применяли метод ПЦР-тестирования RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC в рамках поискового исследования, так как на сегодняшний день в России этот метод не стандартизирован и не зарегистрирован.

Тестировали иммунные клетки крови PBMC/WBC у 27 случайным образом отобранных пациентов с авиремией RNA HCV из числа больных (n=261), достигших стойкой авиремии RNA HCV в течение

Таблица 2

Результаты традиционного (плазма крови) и поискового (иммунные клетки крови PBMC/WBC) ПЦР-тестирования RNA HCV у пациентов, достигших пУВО12 после различных режимов первичной DAA-терапии (n=27)

Режимы первичной DAA-терапии	Традиционный показатель эффективности DAA-терапии в плазме (авиремия)*	Показатель эффективности DAA-терапии в иммунных клетках PBMC/WBC**
2D-режим DCV+SOF, 12 нед (n=12)	12 (100%)	10 (83,3%)
2D-режим LDV/SOF, 12 нед (n=6)	6 (100%)	5 (83,3%)
3D-режим PTV/r/OBV+DSV, 12 нед (n=9)	9 (100%)	8 (88,9%)
Итого (n=27)	27 (100%)	23 (85,2%)
Вторичная оккультная HCV-инфекция, распространенность (n=27)	–	4 (14,8%)

Примечание. * – Авиремия, неопределяемый уровень RNA HCV в плазме крови через 12 нед после окончания курса первичной DAA-терапии, ПЦР-тестирование плазмы крови, 15 МЕ/мл; ** – отрицательный результат обнаружения отрицательной цепи RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC через 12 нед после окончания курса первичной DAA-терапии, ПЦР-тестирование иммунных клеток крови PBMC/WBC.

12 нед после окончания курса DAA-терапии. Из 27 пациентов DCV+SOF получали 12, LDV/SOF – 6, PTV/r/OBV+DSV – 9 больных.

Результаты сравнительного тестирования плазмы крови и иммунных клеток крови на наличие RNA HCV у 27 пациентов с авиремией RNA HCV, которые были «успешно вылечены» от гепатита С с помощью разных режимов первичной DAA-терапии оригинальными препаратами, представлены в табл. 2.

У 4 (14,8%) из 27 случайным образом отобранных пациентов при ПЦР-тестировании иммунных клеток крови PBMC/WBC был обнаружен вирусный геном RNA HCV с отрицательной цепью, что свидетельствовало о репликативной активности вируса HCV в этих клетках (рис. 1). Таким образом показатель распространенности вторичной оккультной HCV-инфекции среди примерно $^{1}/_{10}$ части «успешно вылеченных» от гепатита С пациентов составил 14,8%.

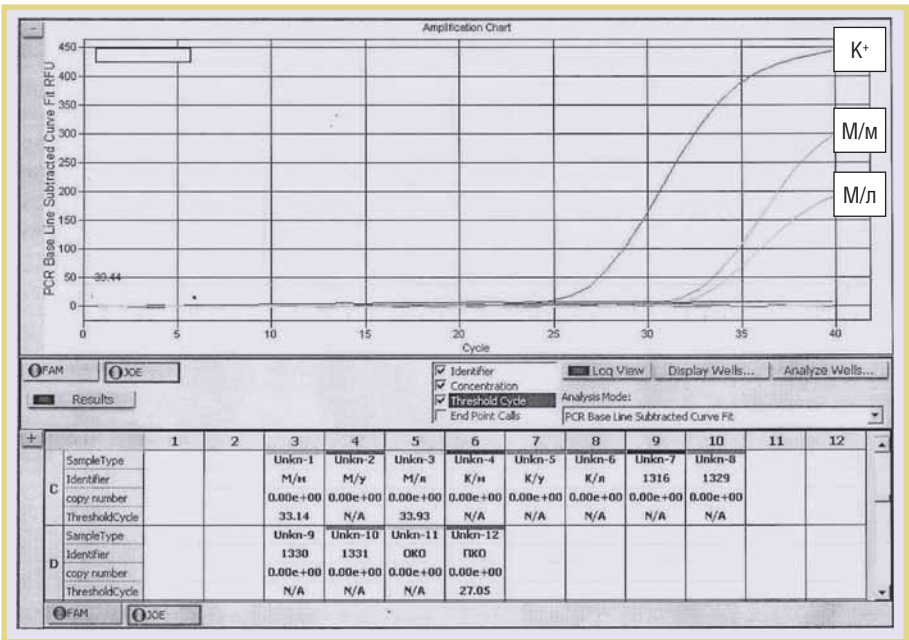

Рис. 1. Визуализация результатов поискового ПЦР-тестирования RNA HCV в PBMC и WBC у пациентки №2 (см. табл. 3), получавшей первичную DAA-терапию в режиме DCV+SOF (12 нед) и достигшей пУВО12 (К+ – положительный контроль; М/м – пациентка М., мононуклеары/PBMC; М/л – пациентка М., лейкоцитарная фракция/WBC)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что авиремия RNA HCV даже при чувствительном ПЦР-тестировании с нижним порогом 15 МЕ/мл не исключает авиремическую (неопределяемую в плазме крови) низкоуровневую репликацию HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC крови и не всегда свидетельствует об эрадикации HCV.

Краткая клинико-лабораторная характеристика 4 пациентов, достигших традиционного пУВО12, но у которых были получены положительные результаты ПЦР-тестирования RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC, представлены в табл. 3.

Авторы показали, что авиремия RNA HCV у пациентов с традиционным пУВО12 не исключает персистенцию и низкоуровневую репликацию RNA HCV в PBMC/WBC и предлагают не рассматривать авиремию RNA HCV в качестве

Таблица 3

Краткая клинико-лабораторная характеристика больных с вторичной оккультной HCV-инфекцией, достигших традиционного пУВО12 (n=4)

Пациент, №	Пол / возраст	Режим первичной DAA-терапии	Характер вирусологического ответа	Генотип HCV	Стадия фиброза на момент начала / окончания DAA-терапии	Вирусная нагрузка RNA HCV на момент начала лечения, МЕ/мл	Коинфекция	Клиническая форма хронической HCV-инфекции	Криокрит на момент начала / окончания DAA-терапии, %
1 (рис. 2)	Мужчина К., 42 лет	PTV/r/OBV+DSV, 12 нед.	ПВО (+) пУВО12 (+)	1b	F3/F3-2	$1{,}5 \cdot 10^6$	HBV (–) HIV (–) HGV (–)	Комбинированный HCV-синдром (HCV-ХГ в сочетании с HCV-КГ/в), см. рис. 2	2/2
2 (рис. 3)	Женщина М., 52 лет	DCV+SOF, 12 нед.	ПВО (+) пУВО12 (+)	3a	F0/F0	$5{,}9 \cdot 10^5$	HBV (+) HIV (–) HGV (–)	HCV-ассоциированный иммунопатологический синдром (HCV-КГ/в), см. рис. 3	6/5
3	Мужчина С., 39 лет	DCV+SOF, 12 нед.	ПВО (+) пУВО12 (+)	1b	F0/F0	$1{,}7 \cdot 10^6$	HBV (–) HIV (–) HGV (+)	HCV-ассоциированный иммунопатологический синдром (HCV-КГ/в)	6/0
4 (рис. 4)	Мужчина С., 54 лет	LDV/SOF, 12 нед.	ПВО (+) пУВО12 (+)	1b	F2/F2	$1{,}5 \cdot 10^6$	HBV (–) HIV (–) HGV (–)	Комбинированный HCV-синдром (HCV-ХГ в сочетании HCV-с/КГ), см. рис. 4	8/2

Примечание. HCV-ХГ – HCV-ассоциированный хронический гепатит; HCV-КГ/в – HCV-ассоциированный криоглобулинемический васкулит; HCV-с/КГ – HCV-ассоциированная смешанная криоглобулинемия.

показателя эрадикации HCV и санации организма от вируса HCV. Наибольшая вероятность модификации (*modificatio* – видоизменение чего-либо с приобретением новых свойств) хронической виремии RNA HCV в авиремическую низкоуровневую репликацию RNA HCV в PBMC/WBC после удачной первичной DAA-терапии характерна для пациентов с комбинированным HCV-синдромом и HCV-ассоциированным иммунопатологическим синдромом, при которых дополнительным внепеченочным компартментом персистенции и репликации RNA HCV являются иммунные клетки периферической крови – лейкоцитарный клеточный пул White Blood Cells total fraction (WBC/tf), включая мононуклеарные лейкоциты (PBMC).

Клиническая характеристика и отличительные особенности вторичной оккультной HCV-инфекции как одного из вариантов неудачных исходов первичной DAA-терапии на сегодняшний день окончательно не установлены, однако по мнению авторов, могут быть представлены:

- риском отсроченного рецидива виремии RNA HCV;
- стабильным постгепатитным фиброзом печени без тенденции к регрессу;
- риском активации фиброзирования и *de novo* гепатоцеллюлярной карциномы, несмотря на нормализацию уровней активности аланинаминотрансферазы / аспартатаминотрансферазы / γ-глутамилтранспептидазы и регресс некровоспалительного процесса в печени;
- отсутствием иммунологического ответа (или частичным иммунологическим ответом) и сохраняющимся риском злокачественной лимфопролиферации.

По результатам изложенного сделаны выводы и даны следующие практические рекомендации:

- значение показателя эффективности первичной DAA-терапии в части достижения традиционного пУВО12 в большой группе ПВТ-наивных пациентов с хронической виремией RNA HCV в условиях реальной клинической практики составило 95,9% (у 261 из 272 больных);
- в качестве неудачных результатов первичной DAA-терапии у ПВТ-наивных пациентов с хронической виремией RNA HCV следует рассматривать:
  – DAA-неконтролируемую виремию RNA HCV;
  – ранний рецидив виремии RNA HCV;
  – отсроченный рецидив виремии RNA HCV;
  – вторичную оккультную HCV-инфекцию (модификацию хронической виремии RNA HCV в авиремическую низкоуровневую репликацию RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC);

Рис. 2. Пациент К., хроническая HCV-инфекция 1b генотипа: репликативный вариант – хроническая виремия RNA HCV; клиническая форма – комбинированный HCV-синдром (HCV-ассоциированный хронический гепатит, F3 стадии фиброза в сочетании с HCV-ассоциированным криоглобулинемическим васкулитом сосудов кожи, осложненным кожными язвами)

Рис. 3. Пациентка М., хроническая HCV-инфекция 3а генотипа: репликативный вариант – хроническая виремия RNA HCV; клиническая форма – HCV-ассоциированный иммунопатологический синдром (HCV-ассоциированный криоглобулинемический васкулит сосудов кожи – пурпура, периферических нервов *n. suralis dextra, n. suralis sinistra* – периферическая полинейропатия и голеностопных суставов – артрозоартрит нижних конечностей без клинико-лабораторных признаков HCV-ассоциированного хронического гепатита)

Рис. 4. Пациент С., хроническая HCV-инфекция 1b генотипа: репликативный вариант – хроническая виремия RNA HCV; клиническая форма – комбинированный HCV-синдром (HCV-ассоциированный хронический гепатит, F2 стадии фиброза в сочетании с HCV-ассоциированной смешанной криоглобулинемией; синдром инсулинорезистентности, черный акантоз)

- значение показателя распространенности вторичной оккультной HCV-инфекции среди 27 случайным образом отобранных из ПВТ-наивных пациентов (n=261), «успешно вылеченых» от гепатита С и достигших традиционного пУВО12 после первичной DAA-терапии, составило 14,8% (4 случая из 27);
- для контроля вторичной оккультной HCV-инфекции после первичной DAA-терапии у пациентов с традиционным пУВО12, у которых не удалось достичь полного иммунологического ответа, рецидивирует с/КГ или сохраняется повышенный уровень активности ревматоидного фактора, целесообразно выполнять ПЦР-тестирование RNA HCV в иммунных клетках крови PBMC/WBC.

* * *

Авторы заявляют об отсутствии источника финансирования и конфликта интересов.

Литература/Reference

1. Ferri C., Ramos-Casals M., Zignego A.L. et al. International diagnostic guidelinesforpatients with HCV- expertstatement // Autoimmun. Rev. – 2016; 15 (12): 1145–60. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.09.006
2. McHutchinson J., Davis G., Esteban-Mur R. et al. Durability of sustainedviralresponse in patients with chronic hepatitis C aftertreatment with interferon alpha-2b aloneor in combination with ribavirin // Hepatology. – 2001; 34: 244.
3. Shiratori Y., Imazeki F., Moriyama M. et al. Histologicimprovement of fibrosis in patients with hepatitis C whohavesustainedresponse to interferon therapy // Ann. Intern. Med. – 2000; 132: 517–24.
4. Castillo I., Pardo M., Bartolomé J. et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients in Whom the Etiology of PersistentlyAbnormal Results of Liver-Function Tests Is Unknown // J. Infect. Dis. – 2004; 189 (1): 7–14.
5. Attar B., VanThiel D. Review Article. A New Twist to a Chronic HCV Infection: Occult Hepatitis C // Gastroenterol. Res. Pract. – 2015; 2015: 579147. http://dx.doi.org/10.1155/2015/579147
6. AbdAlla M., ElAwady M. Hepatitis C virus RNA strands detection in peripheral blood mononuclear cells legitimizes virus eradication in negative serumpcrnaive and post-treatment patients // J. Clin. Transl. Hepatol. – 2017; 5 (1): 1–8. DOI: 10.14218/JCTH.2016.00054
7. Innes H., McDonald S., Hayes P. et al. Mortality in hepatitis C patients who achieve a sustained viral response compared to the general population // J. Hepatol. – 2017; 66 (1): 19–27. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.004
8. Yousif M., ElsadekFakhr A. et al. Prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved sustained virologic response todirect-acting antiviral agents // Infez. Med. – 2018; 26 (3): 237–43.
9. Mekky M., Sayed H., Abdelmalek M. et al. Prevalence and predictors of occult hepatitis C virus infection among Egyptian patients who achieved sustained virologic response to sofosbuvir/daclatasvir therapy: a multi centerstudy // Infect. Drug Resist. – 2019; 12: 273–9. DOI: 10.2147 / IDR.S181638
10. Wróblewska A., Lorenc B., Cheba M. et al. Neutrocyte to lymphocyte ratiopredicts the presence of a replicative hepatitis C virus strand after therapy with direct acting antivirals // Clin. Exp. Med. – 2019; 19: 401–6. https://doi.org/10.1007/s10238-019-00561-y
11. Lybecka C., Brenndörferc E., Sällbergc M. et al. Long-term follow-up aftercure from chronic hepatitis C virus infection shows occult hepatitis and a risk of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic patients // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2019; 31 (4): 506–13. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001316
12. Знойко О.О., Линькова Ю.Н., Морозова М.А. и др. Клинический опыт применения схемы тройной терапии, включающей цепэгинтерферон альфа-2b, симепревир и рибавирин, у пациентов с хроническим гепатитом С генотипа 1 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2016; 2 (15): 100–9 [Znoyko O.O., Lin'kova Yu.N., Morozova M.A. et al. Clinical practice of triple therapy with Cepeginterferon alfa-2b, simeprevir and ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection // Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie. – 2016; 2 (15): 100–9. (in Russ.)].
13. Сулима Д.Л., Лиознов Д.А., Яковлев А.А. и др. Первый в России опыт применения GLE/PIB для лечения HCV-инфекции генотипа 3а с криоглобулинемией и сопутствующей HBV-инфекцией у пациента с ХБП С5д, леченного гемодиализом и ожидавшего трансплантацию почки // Врач. – 2019; 30 (2): 3–13 [Sulima D., Lioznov D., Yakovlev A. et al. Russia's first experience with GLE/PIB for the treatment of HCV infection genotype 3A with cryoglobulinemia and concomitant HBV infection in a hemodialysis patient with CKD C5d awaiting kidney transplantation // Vrach. – 2019; 30 (2): 3–13 (in Russ.)]. https://doi.org/10.29296/25877305-2019-02-01
14. Сулима Д.Л., Соколова О.И., Ларионов В.А. и др. Безинтерфероновая DAA-терапия у пациентов с хронической HCV-инфекцией (новая гипотеза на основании 3-летнего проспективного наблюдательного исследования двух клиник Санкт-Петербурга) // Современная медицина. – 2019; 3 (15): 7–29 [Sulima D.L., Sokolova O.I., Larionov V.A. et al. Interferon-free DAA-therapy in patients with chronic HCV infection (new hypothesis based on a 3-year prospective observational study of two clinics in St. Petersburg) // Sovremennaya meditsina. – 2019; 3 (15): 7–29 (in Russ.)].
15. Chomczynski P., Sacchi N. // Single-stepmethod of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroformextraction // Anal. Biochem. – 1987; 162 (1): 156–9.
16. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015 // J. Hepatol. – 2015; 63: 199–236. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.03.025
17. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016 // J. Hepatol. – 2017; 66: 153–94. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.09.001
18. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018 // J. Hepatol. – 2018; 69: 461–511. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026
19. Приходько Е.М., Селиверстов П.В., Адылов Ш.Ф. и др. Возможности регенеративной терапии в лечении пациентов с хроническим гепатитом // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2018; 2: 91–2 [Prikhod'ko E.M., Seliverstov P.V., Adylov Sh.F. et al. Vozmozhnosti regenerativnoi terapii v lechenii patsientov s khronicheskim gepatitom // Gastroenterologiya Sankt-Peterburga. – 2018; 2: 91–2 (in Russ.)].

LOW-LEVEL AVIREMIC HEPATITIS C VIRUS (HCV) RNA REPLICATION IN THE IMMUNE BLOOD PBMCS/WBCS (SECONDARY OCCULT HCV INFECTION) AS ONE OF THE PRIMARY INTERFERON-FREE DAA THERAPY OUTCOMES IN REAL CLINICAL PRACTICE IN ANTIVIRAL THERAPY-NAIVE PATIENTS WITH CHRONIC HCV RNA VIREMIA (A DESCRIPTION OF A SERIES OF CASES)

*Professor **A. Yakovlev**[1, 2], MD; Professor **D. Sulima**[3, 4], MD; **V. Larionov**[5]; **V. Koryagin**[4], Candidate of Medical Sciences; **M. Sharipova**[4], Candidate of Medical Sciences[4]; **I. Fedunyak**[2, 6], Candidate of Medical Sciences; **V. Musatov**[1, 2], Candidate of Medical Sciences; **G. Kachenya**[2]; **E. Doguzhneva**[2]; **O. Sokolova**[1, 2], Candidate of Medical Sciences; **O. Gorchakova**[3], Candidate of Medical Sciences; Professor **A. Semenov**[6, 7], BD; **E. Zueva**[7], Candidate of Biological Sciences; **Yu. Ostankova**[7], Candidate of Biological Sciences; **S. Prosvernitsyn**[4, 6], Candidate of Medical Sciences; **S. Kiyashko**[4, 5], Candidate of Medical Sciences; **Yu. Chornoguz**[7]; **D. Valutite**[7]*

[1]Saint Petersburg State University
[2]S.P. Botkin Clinical Infectious Diseases Hospital, Saint Petersburg
[3]Acad. I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
[4]OOO «Exclusive» Medical Consulting Dental Center, Saint Petersburg
[5]V.A. Almazov Medical Research Center, Saint Petersburg
[6]I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg
[7]Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg

The paper presents the results of the authors' own pilot study of the prevalence of secondary occult hepatitis C virus (HCV) infection after various primary interferon-free (direct-acting antivirals (DAA)) therapy regimens with original inhibitor drugs in real clinical practice. Examinations have been made in 27 patients randomly selected from 261 ones who achieved a traditional plasma sustained virological response at 12 weeks after the end of a DAA therapy cycle confirmed by HCV RNA aviremia.

Key words: *hepatology, secondary occult HCV infection, secondary occult hepatitis C, interferon-free DAA therapy, immune blood PBMCs/WBCs, peripheral mononuclear cells, chronic HCV RNA viremia, HCV RNA replication in PBMCs/WBCs.*

For citation: *Yakovlev A., Sulima D., Larionov V. et al. Low-level aviremic hepatitis C virus (HCV) RNA replication in the immune blood PBMCs/WBCs (secondary occult HCV infection) as one of the primary interferon-free DAA therapy outcomes in real clinical practice in antiviral therapy-naive patients with chronic HCV RNA viremia (a description of a series of cases) // Vrach. – 2020; 31 (2): 57–64. https://doi.org/10.29296/25877305-2020-02-13*