

Серологические маркеры вирусного гепатита В

Ежегодно 28 июля Всемирная организация здравоохранения проводит **Международный день борьбы с гепатитом**. Целью данного мероприятия является повышение осведомленности населения относительно проблемы вирусных гепатитов и вызываемых ими осложнений. **Вирусный гепатит В (ВГВ) – инфекционное заболевание печени, потенциально представляющее угрозу для жизни. ВГВ является одной из глобальных проблем здравоохранения, что обусловлено значительным распространением заболевания, тяжелым течением, склонностью к хронизации и развитию осложнений. Актуальность проблемы ВГВ в Украине связана также с тем, что эпидемиологическая ситуация в стране катастрофически ухудшается, что в первую очередь вызвано неадекватной диагностикой этой инфекции.**

Исторически диагностика ВГВ берет начало с момента открытия в 1965 г. австралийского антигена, когда американский ученый Б. Бламберг обнаружил антитела, реагирующие с антигеном из образца сыворотки австралийского аборигена, у 2 пациентов с гемофилией и многократными гемотранфузиями в анамнезе. Впоследствии этот антиген был выявлен у больных вирусным гепатитом и назван австралийским антигеном. За свое открытие в 1977 г. Б. Бламберг получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине. В настоящее время установлено, что австралийский антиген является поверхностным антигеном вируса гепатита В (Hepatitis B surface antigen, HBsAg). В течение следующих десятилетий были обнаружены другие вирусные антигены и соответствующие им антитела. Развитие методов молекулярной биологии и открытие К. Мюллисом полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило разработать методику прямого выявления ДНК вируса гепатита В (HBV).

В настоящее время лабораторная диагностика ВГВ базируется на определении ряда серологических маркеров HBV-инфекции и исключении других возможных возбудителей (вирусы гепатитов А, С, D, E, прочие гепатотропные агенты) и этиологических факторов. Серологические тесты также используются для дифференциальной диагностики острой самолимитирующейся инфекции, хронических состояний, поствакцинального иммунитета. На основании их результатов определяются показания к противовирусной терапии (ПВТ). Выявление ДНК HBV с измерением вирусной нагрузки (количественная ПЦР) является золотым стандартом диагностики и одним из исследований, позволяющих оценить необходимость и эффективность ПВТ.

Серологические тесты на вирусные антигены и антитела могут выполняться как с использованием сыворотки крови, так и с применением плазмы. Молекулы антител и антигенов стабильны в течение нескольких дней при комнатной температуре, нескольких месяцев при температуре +4 °C и многие годы при температуре -20 °C и ниже. Поскольку используемые в настоящее время методы предполагают оценку результата анализа по интенсивности цвета реагентной смеси (иммуноферментный анализ, ИФА) или измерению люминесцентного сигнала (иммунохемилюминесцентный анализ, ИХЛА), в образце необходимо избежать гемолиза, так как он может повлиять на правильность результата.

Выявление вирусной ДНК с использованием ПЦР и ее модификаций можно проводить в сыворотке или плазме крови, биоптатах печени.

Необходимо помнить, что в нестабилизированной крови происходит быстрая деградация молекул вирусной ДНК, это может привести к заниженным и даже отрицательным результатам. Во избежание этого сыворотка должна быть отделена от сгустка крови в течение 4 ч с момента забора материала и храниться при температуре -20 °C. Присутствие ЭДТА в пробе, напротив, стабилизирует вирусную ДНК, поэтому такая кровь может храниться при +4 °C несколько суток без существенного влияния на вирусную нагрузку.

В связи с большим количеством разнообразных тест-систем для ПЦР возникла необходимость стандартизовать единицы измерения вирусной нагрузки для получения сопоставимых результатов независимо от производителя оборудования и реактивов.

Международный стандарт, принятый ВОЗ, определяет, что количество ДНК HBV в сыворотке/плазме крови должно быть выражено в МЕ/мл, а для оценки эффективности ПВТ образец необходимо исследовать с использованием тест-системы одного и того же производителя.

Для диагностики сложных случаев и с научной целью может применяться иммуногистохимическое (ИГХ) исследование биоптатов печени.

Поверхностный антиген ВГВ – HBsAg – является наиболее ранним маркером вирусной инфекции. Он появляется в крови спустя 1-12 (чаще 8-12) нед после заражения, до повышения уровня сывороточных трансаминаз и появления клинических симптомов, и циркулирует до 4-6 мес в случае самолимитирующейся инфекции и последующего выздоровления (рис.). Персистенция в крови HBsAg дольше 6 мес расценивается как хронизация инфекции. По оценке международных экспертов, примерно

у 5% взрослых иммунокомпетентных пациентов подтвержденный острый ВГВ переходит в хроническую форму. Исчезновение HBsAg сопровождается появлением протекторных антител к поверхностному антигену (анти-HBs). В большинстве случаев анти-HBs сохраняются в крови в течение всей жизни, обеспечивая долгосрочный иммунитет. Однако у ряда пациентов при появлении анти-HBs одновременно продолжает циркулировать HBsAg. В большинстве случаев это связано с неспособностью антител нейтрализовать вирусные частицы. Такие лица рассматриваются как носители HBV-инфекции.

В последние годы получило распространение количественное определение HBsAg (qHBsAg), что позволяет разграничить острую инфекцию и неактивное вирусоносительство. Кроме того, показана возможность использования qHBsAg для оценки ответа на терапию препаратами интерферона ИФН α , тогда как при лечении аналогами нуклеозидов измерение указанного маркера в динамике однозначных результатов пока не дало.

Ядерный (сердцевинный, коровый) антиген HBV (HBeAg) представляет собой белок вирусного нуклеокапсида, который экспрессируется инфицированными гепатоцитами. В крови HBeAg не выявляется, но может быть обнаружен при исследовании биоптатов печени с использованием ИГХ. Антитела к ядерному антигену (анти-HBe) начинают определяться в крови через 1-2 нед после появления HBsAg и за 1-2 мес до появления анти-HBs. При остром гепатите анти-HBe представлены преимущественно иммуноглобулинами класса М (IgM). IgM анти-HBe являются важным маркером острого ВГВ в период серологического окна, когда HBsAg исчезает из кровотока, а антитела к нему еще не выявляются. Они могут сохраняться в крови до 2 лет после разрешения инфекционного процесса. Однако у некоторых лиц уровень IgM анти-HBe повышается в период обострения хронического гепатита, и это представляет определенную диагностическую проблему относительно разграничения острой и реактивации хронической HBV-инфекции.

Антитела к ядерному антигену класса G (IgG анти-HBe) появляются через несколько недель после IgM, спустя полгода становятся преобладающим классом. У большинства пациентов они сохраняются в крови пожизненно наряду с анти-HBs, но в отличие от последних защитными свойствами не обладают.

Ранний антиген HBV (HBeAg) представляет собой секреторный белок, который образуется путем процессинга прекодового протеина. HBeAg появляется в крови вскоре после HBsAg, обнаруживается на протяжении всего периода репликации вируса и, как правило, ассоциируется с высоким уровнем вирусной нагрузки (количество ДНК HBV). В связи с этим HBeAg рассматривается как маркер активной инфекции. В случае самолимитирующегося инфекционного процесса HBeAg снижается до неопределяемого уровня сразу после нормализации концентраций печеночных трансаминаз и до исчезновения HBsAg, с этого момента в крови начинают обнаруживаться антитела к раннему антигену – анти-HBe. Если течение гепатита приобретает хронический характер, персистенция HBeAg сохраняется и зависит от уровня вирусной нагрузки. У некоторых пациентов с активной инфекцией HBeAg в крови может не обнаруживаться, это связано с присутствием мутантных форм вируса, не синтезирующих прекодовый протеин. Таким образом, в большинстве случаев ранняя сероконверсия HBeAg (появление анти-HBe) является благоприятным прогностическим фактором и указывает на разрешение инфекционного процесса, тогда как

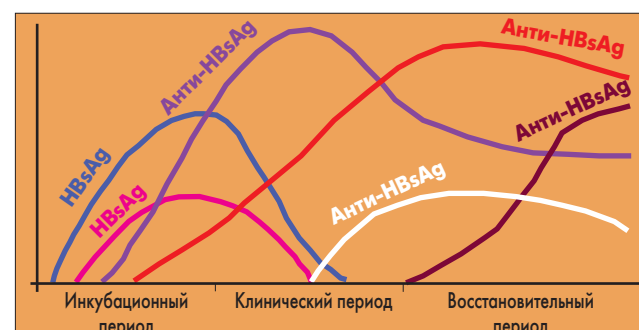


Рис. Выявление серологических маркеров ВГВ в различные периоды острой инфекции

у пациентов с хронической инфекцией она откладывается на годы и десятилетия.

Для оценки репликативной активности HBV в настоящее время используют прямое выявление ДНК вируса с помощью ПЦР. Метод, реализуемый в режиме реального времени (real-time), имеет преимущества перед качественной ПЦР в виде более высокой чувствительности (нижний порог обнаружения – 20 МЕ/мл) и широкого диапазона линейности (до 8 log₁₀ МЕ/мл).

Восстановление после острого гепатита обычно сопровождается исчезновением ДНК HBV из крови. Однако иногда ДНК HBV в небольших количествах может обнаруживаться у пациента многие годы, такая ситуация расценивается как персистенция вируса под контролем иммунной системы. У больных хроническим ВГВ со спонтанной или лекарственно-индуцированной сероконверсией HBeAg результат ПЦР также остается положительным, за исключением случаев одновременной сероконверсии HBsAg. ДНК HBV выявляется и у пациентов с HBeAg-негативным хроническим гепатитом, хотя ее уровень значительно ниже, чем при HBeAg-позитивном варианте. Из-за больших колебаний концентрации вирусной ДНК невозможно установить пороговый уровень вирусемии с целью дифференциации состояния неактивного носительства вируса и HBeAg-негативного хронического гепатита.

Диагностика острого гепатита основывается на обнаружении HBsAg и IgM анти-HBe. В начале клинического периода инфекции также могут обнаруживаться маркеры репликации HBV (HBeAg и ДНК вируса). Выздоровление сопровождается исчезновением ДНК HBV, сероконверсией HBeAg, а впоследствии и HBsAg. Дифференциальный диагноз у HBsAg-позитивных пациентов следует проводить между острым гепатитом В, обострением хронического ВГВ, реактивацией хронического ВГВ, суперинфекцией носителей HBV вирусами гепатита С или D, а также острыми токсическими гепатитами у носителей HBV.

Перенесенная HBV-инфекция характеризуется присутствием в крови анти-HBs и анти-HBe IgG и отсутствием других серологических маркеров. Выявление только анти-HBs свидетельствует о поствакцинальном иммунитете.

Диагноз хронического ВГВ определяется присутствием HBsAg в крови в течение более чем 6 мес. Дополнительные исследования должны включать оценку HBeAg и ДНК вируса с целью определения необходимости противовирусной терапии. У пациентов с хроническим ВГВ необходим регулярный контроль уровня печеночных трансаминаз для оценки прогрессирования заболевания, поскольку лица, не нуждающиеся в ПВТ на момент презентации заболевания, могут потребовать ее в дальнейшем. Пациенты с негативным HBeAg-статусом, нормальным уровнем АЛТ и низкой (<2000 МЕ/мл) вирусной нагрузкой считаются носителями неактивной инфекции. Они, как правило, имеют благоприятный прогноз и в лечении не нуждаются. Тем не менее эту ситуацию необходимо отличать от HBeAg-негативного ВГВ, характеризующегося колебаниями уровня трансаминаз и/или вирусной нагрузки.

Отдельного внимания заслуживает проблема так называемого изолированного анти-HBe, что подразумевает выявление только антител к ядерному антигену при отрицательных результатах на все остальные маркеры ВГВ. Наиболее часто это наблюдается при остром гепатите в период серологического окна HBsAg, в данном случае присутствуют преимущественно антитела класса М. Еще одной причиной является снижение уровня анти-HBs спустя многие годы после перенесенной инфекции ниже чувствительности метода определения. Серьезную проблему представляет ситуация так называемой инфекции низкого уровня (low-level), когда сывороточные маркеры отсутствуют, но в печени обнаруживаются и ДНК, и вирусные антигены. В литературных источниках описаны случаи инфицирования реципиентов при трансплантации печени или переливании крови от носителей изолированного анти-HBe. Также нельзя исключать вероятность ложноположительного результата на анти-HBe, связанного с перекрестной контаминацией или недостаточной специфичностью тест-систем.

Согласно разработанным с учетом последних данных рекомендациям Европейской ассоциации по изучению болезней печени для скрининга, диагностики и мониторинга HBV-инфекции врачам-клиницистам следует использовать так называемое правило трех троек:

- 3 теста, чтобы провести скрининг: HBsAg, анти-HBs, анти-HBe;
- 3 теста, чтобы диагностировать: HBeAg, анти-HBe, ДНК HBV;
- 3 результата исследований, чтобы рассмотреть необходимость терапии: уровень АЛТ, уровень вирусной нагрузки (ДНК HBV), степень фиброза и гистологической активности хронического гепатита.

Подготовила **Александра Яковец**