

Додає  
цінність діагнозу



ЕКСПЕРТ У ЛАБОРАТОРНІЙ  
ДІАГНОСТИЦІ

В.С. Копча, д.м.н., професор, Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського; О.Я. Кадубець, Тернопільська міська комунальна лікарня швидкої допомоги

# Сучасна лабораторна діагностика вірусних гепатитів

**Як відомо, основою лабораторної діагностики вірусних гепатитів є знання про їх збудників і реплікацію, інформація про появу і зникнення маркерів інфікування, а також сучасні імунохімічні та молекулярно-біологічні методи детекції антигенів, антитіл і нуклеїнових кислот.**

## Лабораторна діагностика гепатиту А

Вірус гепатиту А (HAV) — це РНК-вірус, класифікований як пікорнавірус. В усіх ізолятах, зібраних у різних частинах світу, спостерігається лише один серотип HAV. Він не має зовнішньої оболонки, складається із зовнішньої білкової капсули (капсиду), що містить усередині один ланцюжок РНК, який є матрицею для синтезу вірусних білків усередині клітини-хазяїна.

Лабораторна діагностика гепатиту А (ГА) заснована на виявленні маркерів HAV: антигену HAV, антитіл (анти-HAV класів IgM та IgG), а також РНК HAV. Остаточними доказами на користь актуальної або нещодавно перенесеної інфекції є наявність у сироватці крові (навіть в одній пробі) антитіл до HAV класу IgM (анти-HAV IgM) і наявність HAV у фекаліях. На перенесеній ГА, після якого формується тривалий (найчастіше довгочасний) імунітет, вказує наявність антитіл до HAV класу IgG (анти-HAV IgG).

Діагноз гострого ГА підтверджується в гострій фазі процесу або ранній стадії одужання за наявності анти-HAV класу IgM, що з'являються в останні 5-10 діб інкубаційного періоду і продовжують виявлятися впродовж 6-7 міс від початку захворювання, а в 4% пацієнтів можуть персистувати до 1 року. Крім того, ці антитіла можуть спостерігатися в перші місяці в 20-30% осіб, вакцинованих інактивованою вакциною проти ГА. Утворення анти-HAV класу IgM пов'язане з первинною імунною відповіддю на потрапляння антигену, а не з інфекцією, зумовленою вакциною.

За типового перебігу ГА РНК HAV може визначитися за декілька днів до підвищення активності аланінамінотрансферази і протягом 5-59 діб захворювання, у затяжних випадках — до 95 діб.

Антиген вірусу ГА (HAV-Ag) виявляється у фекаліях хворих за 7-10 діб до появи клінічних симптомів і в перші дні захворювання, що використовується для ранньої діагностики і виявлення джерел збудника. Концентрація HAV у фекаліях є найвищою упродовж 2 тиж перед появою жовтяниці. У дорослих виділення вірусу з фекаліями зазвичай триває менше тижня після появи жовтяниці, у дітей цей період більш тривалий — кілька тижнів після клінічної маніфестації недуги. ГА не призводить до формування хронічного гепатиту та вірусносійства. Визначення антигену HAV також знайшло застосування в санітарній вірусології при дослідженні води на наявність вірусу.

Анти-HAV класу IgG виявляється вже на початку захворювання (з 3-4-го тижня) і зберігаються упродовж усього життя. Визначення у крові людини анти-HAV IgG (за відсутності анти-HAV IgM) свідчить про наявність імунітету до вірусу гепатиту А в результаті перенесеної в минулому інфекції або вакцинації проти цього вірусу. Анти-HAV IgG передаються від матері до плоду трансплацентарно і можуть виявлятися навіть у дітей віком понад 1 рік.

Визначення анти-HAV класу IgG використовується для вивчення імуноструктури населення, динаміки специфічного гуморального імунітету. Оцінка анти-HAV класу IgG важлива також для перед- і поствакцинального скринінгу (мінімальна протекторна концентрація анти-HAV відповідає 20 МО/л). Для визначення цього показника випускаються комерційні діагностичні препарати на основі імуноферментного аналізу (ІФА). Лабораторна діагностика заснована на виявленні маркерів HAV за допомогою специфічних імунодіагностичних методів (ІФА, радіоімунний аналіз — РІА). Зарубіжними промисловими біотехнологічними підприємствами випускаються діагностичні набори, що включають усі необхідні компоненти й реактиви для проведення тесту.

Крім твердофазних ІФА та РІА, з успіхом використовуються метод імуноелектронної мікроскопії, а також полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Усі вищезгадані стратегії імунодіагностики з рівною імовірністю виявляють інапарантні, безсимптомні або клінічно маніфестні форми ГА. Особливе місце в лабораторній діагностиці ГА займають молекулярно-генетичні методи тестування РНК HAV.

## Лабораторна діагностика гепатиту В

Збудник гепатиту В (ГВ) — HBV — належить до ДНК-вірусів, характеризується високою генетичною мінливістю, що зумовлює складність його імунного контролю. Сьогодні виділяють 9 підтипів вірусу, гетерогенних за поверхневим антигеном (HBsAg).

Лабораторна діагностика ГВ заснована на виявленні специфічних для нього антигенів і відповідних антитіл у крові, а також вірусних нуклеїнових кислот, основними з яких є:

- HBsAg — анти-HBs;
- анти-HBc класів IgM та IgG;
- HBeAg — анти-HBe;
- ДНК HBV.

Найчастіше в діагностиці ГВ використовуються визначення HBsAg. Цей антиген виявляється як при гострій, так і при хронічній формі захворювання (проте гостра інфекція зазвичай підтверджується наявністю високих титрів анти-HBc IgM). У разі гострого ГВ поверхневий антиген вірусу виявляється вже через 3-5 тиж від моменту інфікування, тобто задовго до появи клінічних ознак хвороби, і в цих випадках є єдиним серологічним маркером. HBsAg постійно виявляється в переджовтяничному і жовтяничному періодах захворювання. Персистування HBsAg протягом  $\geq 6$  міс вказує на затяжний або хронічний перебіг патології та дозволяє припустити хронічне носійство вірусу.

Елімінація HBsAg і поява антитіл до нього є неодмінними умовами одужання. Необхідно враховувати, що захисні антитіла до HBsAg з'являються через 1-4 міс після зникнення HBsAg у крові і свідчать про сприятливий перебіг ГВ, припинення реплікації вірусу і фазу реконвалесценції. Цей період отримав назву «серологічне вікно», коли виявляються тільки сумарні антитіла до ядерного антигену (анти-HBc), що є єдиним серологічним маркером HBV-інфекції на даному етапі процесу.

Серологічними маркерами реплікації HBV є анти-HBc класу IgM, HBeAg, ДНК і ДНК-полімераза, які визначаються при гострому ГВ з перших днів появи клінічних ознак і можуть бути присутніми при загостренні хронічного ГВ. Серологічні маркери реплікації HBV використовують як із метою діагностики, так і для оцінки ефективності терапії. HBsAg присутній у тканині печінки, але не в сироватці крові. Опосередковано на його наявність в організмі вказують циркулюючі антитіла — анти-HBc класів IgM та IgG. У гострий період ГВ наявність анти-HBc класу IgM є додатковим маркером захворювання. Проте необхідно враховувати, що близько 50% пацієнтів із хронічним ГВ також можуть мати ці антитіла в період загострення, щоправда зазвичай у низьких концентраціях.

Наявність у сироватці крові тільки анти-HBc класу IgG можлива в період між зникненням HBsAg й утворенням анти-HBs. Поєднане виявлення анти-HBc класу IgG в низькому титрі з анти-HBs вказує на перенесеній гострій ГВ і наявність імунітету. Тестування HBeAg проводять у сироватках крові тільки з наявністю HBsAg. Позитивний результат цього маркера свідчить

про активний процес, тобто підтверджує діагноз гострого ГВ, або свідчить про загострення хронічного ГВ. Тривалість циркуляції HBeAg має важливе прогностичне значення: виявлення HBeAg через  $\geq 2$  міс від початку захворювання вказує на можливий розвиток хронічного гепатиту. Ізольована присутність HBeAg без HBsAg у сироватці крові в більшості випадків свідчить про помилковий результат аналізу. Проте хворі, інфіковані мутантним вірусом, можуть залишатися серонегативними за HBeAg, незважаючи на наявність анти-HBe та інфекційність, що зберігається.

Наявність ДНК HBV (найбільш чутливий маркер реплікації HBV) у сироватці крові вказує на високу інфекційність цього зразка й активне розмноження вірусу в організмі. Позитивний результат вдається зареєструвати практично в усіх хворих на гострий ГВ у період розпаду недуги. Зниження концентрації ДНК HBV в процесі лікування хворих на хронічний гепатит є хорошою прогностичною ознакою, що демонструє ефективність терапії. Висока активність амінотрансфераз сироватки відображає запальне ушкодження тканини печінки, зумовлене передусім реакцією імунної системи макроорганізму у відповідь на інфікування вірусом, а не прямою цитопатичною дією вірусу на гепатоцит. Високий рівень ДНК HBV у поєднанні з низькою активністю амінотрансфераз свідчить про недостатню імунну відповідь організму. Виявлення анти-HBe за відсутності HBeAg і ДНК HBV вказує на припинення активної реплікації вірусу.

Сероконверсія HBsAg в анти-HBs, що відбувається у 90-95% хворих на гострий ГВ у стадії завершення інфекційного процесу, є показником імунітету до HBV, тобто наявність анти-HBs свідчить про перенесену інфекцію і виникнення специфічного імунітету. Особи, які мають ці антитіла в захисній концентрації

( $\geq 10$  МО), не хворіють на ГВ і не потребують вакцинації.

Усі використовувані методи дослідження для визначення специфічних маркерів ГВ можна розділити на 2 групи — імунохімічні та молекулярно-біологічні. Серед імунохімічних методів основне місце належить ІФА з його високою чутливістю та специфічністю, простотою проведення і стабільністю реактивів. Молекулярно-біологічні методи (точкова і рідинна гібридизація, а також ПЛР) дозволяють виявляти ДНК HBV безпосередньо або за допомогою визначення ДНК-полімерази — ферменту, специфічного для вірусу.

**HBsAg/анти-HBs.** Для виявлення основного маркера HBV розроблені різноманітні методи, що дозволяють визначити антиген у концентрації до 0,05 нг/мл та умовно поділяються на декілька поколінь (табл. 1).

Нині основним методом виявлення HBsAg є ІФА. Сучасні діагностичні препарати мають високу специфічність, але можливі й псевдопозитивні результати. Для розмежування псевдопозитивних та істинно позитивних результатів застосовується тест нейтралізації HBsAg з використанням специфічної сироватки.

Принципово новою для системи виявлення HBsAg стала вимога до виробників діагностичних препаратів про обов'язкове включення в тест-систему слабкопозитивного контрольного зразка, що містить HBsAg у концентрації 1 нг/мл. Для визначення анти-HBsAg був випробуваний увесь спектр імунохімічних методів, основним з яких є ІФА (для якісного і кількісного аналізу) (табл. 2).

**Анти-HBc класів IgM та IgG, HBeAg — анти-HBe.** Для тестування цих маркерів можуть бути використані різні варіанти твердофазного імуноаналізу: імуноферментний, радіоімунний, хемілюмінесцентний та ін.

**ДНК HBV.** Цей показник визначають за допомогою ПЛР. Наразі ампліфікаційні методи детекції ДНК HBV (якісна та кількісна діагностика) набули найбільшого розповсюдження.

Далі буде.



Таблиця 1. Методи виявлення основного маркера ГВ

Покоління	Метод	Відносна чутливість методу	Кількість частинок HBsAg в 1 мл сироватки крові	Чутливість (нг/мл)
I	Реакція преципітації в гелі	1	$1,0 \times 10^{11}$	2000
	Зустрічний імуноелектрофорез	5	$2,0 \times 10^{10}$	400
II	Реакція зв'язування комплекменту	10	$1,0 \times 10^{10}$	200
	Реакція зворотної пасивної гемаглютинації	100	$1,0 \times 10^9$	20
	Латекс-аглютинація	100	$1,0 \times 10^8$	20
III	РІА	4000	$0,5 \times 10^6$	0,05
	ІФА	4000	$0,5 \times 10^6$	0,05

Таблиця 2. Інтерпретація результатів серологічних досліджень при ГВ

Інтерпретація результатів	HBsAg	Анти-HBs	Анти-HBc класу IgM	Анти-HBc класу IgG	HBeAg	Анти-HBe	ДНК HBV
Активна реплікація HBV (дикий штам)	+	-	+	+	+	-	+
Активна реплікація HBV (мутантний штам)	+	-	+	+	-	+/-	+
Щойно перенесений гострий гепатит	+	-	+	+	-	+/-	-
Носій HBsAg	+	-	-	+	-	+/-	-
Т. зв. фаза вікна гострого ГВ	-	-	+	+	-	-	-
Імунітет після перенесеного ГВ	-	+	-	+	-	+/-	-
Поствакцинальний імунітет	-	+	-	-	-	-	-



**СІНЕВО**  
медична лабораторія

# СПІВПРАЦЯ З «СІНЕВО» — СУЦІЛЬНИЙ ПЛЮС ДЛЯ ЛІКАРЯ

Повний спектр  
досліджень  
на кращому  
світовому  
обладнанні



Міжнародний контроль  
якості досліджень  
і довіра понад 20 тисяч  
лікарів в Україні



**20000**  
**ЛІКАРІВ**



72 медичні  
лабораторії  
у 16 країнах Європи



Інформаційна підтримка  
та зручні онлайн сервіси  
для лікарів і пацієнтів

0 800 50 70 30 безкоштовно зі стаціонарних телефонів по території України

044 20 500 20

[www.synevo.ua](http://www.synevo.ua)

 [synevolab](https://www.facebook.com/synevolab)