

Додає
цінність діагнозу



ЕКСПЕРТ У ЛАБОРАТОРНІЙ
ДІАГНОСТИЦІ

В.С. Копча, д. мед. 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 перенесений ГА, після якого формується тривалий (найчастіше довічний) 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 днів 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 визначатися за декілька днів до підвищення активності аланінамінотрансферази і протягом 5-59 днів захворювання, у затяжних випадках — до 95 днів.

Антиген вірусу ГА (HAV-Ag) виявляється у фекаліях хворих за 7-10 днів 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 вірусоносійства. Визначення антигену HAV також знайшло застосування в санітарній вірусології при дослідженні води на наявність вірусу.

Анти-HAV класу IgG також з'являються 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 інпапаратні, 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 ≥ 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. Поеднане виявлення анти-HBc класу IgG в низькому титрі з анти-HBs вказує на перенесений гострий 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 ≥ 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 гепатоцитів вірусу. 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 наявності анти-HBs свідчить про перенесену інфекцію і виникнення специфічного імунітету. Особи, які мають ці антитіла в захисній концентрації (≥ 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, простою 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.

Продовження в наступному номері.



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	1,0×10 ¹¹	2000
II	Зустрічний імуноелектрофорез	5	2,0×10 ¹⁰	400
	Реакція зв'язування комплексу	10	1,0×10 ¹⁰	200
	Реакція зворотної пасивної гемаглютинації	100	1,0×10 ⁹	20
	Латекс-аглютинація	100	1,0×10 ⁸	20
III	РІА	4000	0,5×10 ⁶	0,05
	ІФА	4000	0,5×10 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	-	+	-	-	-	-	-



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

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