Додає цінність діагнозу

сінево
медична лабораторія

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.

Продовження. Початок у № 5.

Лабораторна діагностика гепатиту С

Відкриття у 1989-1991 рр. збудника гепатиту С (ГС) – HCV – стало можливим завдяки методам молекулярної біології. Спочатку шляхом клонування із сироватки пацієнтів із патологією, що класифікувалася як «гепатит ні А, ні В», дослідники отримали вірусний геном, потім була встановлена і структура самого вірусу.

Фізико-хімічні властивості HCV дозволили віднести його до родини флавівірусів. Геном HCV представлений одноланцюговою РНК, яка складається з 10 тис. нуклеотидних основ. Вони утворюють регіони, які кодують 3 структурні білки (серцевинний, або ядерний – core protein, а також два глікопротеїни оболонки E1, E2/NS1 – envelope protein) і 4 неструктурні – ферменти, що задіяні у реплікації вірусу (зокрема, NS2, NS3-протеаза/геліказа, NS4, NS5 – РНК-полімераза) (рис.). До кожного із цих білків виробляються антитіла, що циркулюють у крові.

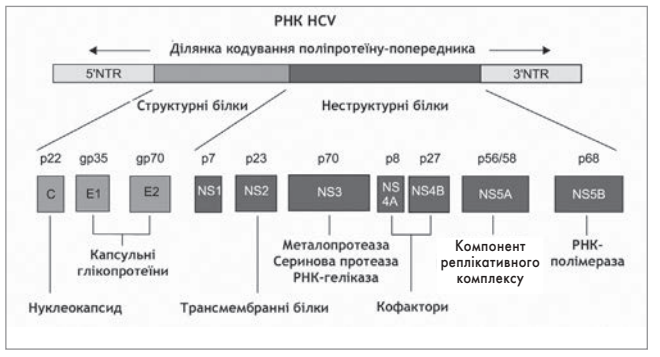

Рис. Геном вірусу гепатиту С

Особливістю HCV є надзвичайно висока гетерогенність його геному. Аналіз нуклеїнових кислот РНК HCV різних ізолятів виявив істотні відмінності в їх первинній структурі. На підставі цих даних була розроблена класифікація HCV, що виділяє 6 генотипів вірусу (1-6), які, у свою чергу, підрозділяються на субтипи, що позначаються буквами латинського алфавіту (нині їх описано понад 90). Вважається, що для клінічної практики необхідно розрізняти такі генотипи HCV: 1a, 1b, 2a, 2b і 3a. На території України переважають генотипи 1b і 3a. Перехресного імунітету ці серотипи не дають.

Оскільки у випадку ГС концентрація вірусу є вкрай низькою, а його антигени не доступні для виявлення за допомогою сучасних індикаційних тестів, лабораторна діагностика ГС проводиться з використанням сучасних методів молекулярної біології. У зв'язку із цим зусилля дослідників зосереджені на виявленні антитіл до різних антигенних компонентів вірусу, що може сигналізувати про його наявність. Роль антигенів виконували білки, що кодуються структурною і неструктурною зонами РНК HCV. Ці білки отримані за допомогою рекомбінантної технології (поліпептиди C22-3, C33c, C100-3, C200, NS5, S-1-1).

Таким чином, лабораторна діагностика ГС базується на виявленні серологічних маркерів HCV: антитіл до HCV (сумарних анти-HCV класів IgM, IgG) методом ІФА та РНК HCV методом ПЛР. Ще один важливий елемент діагностики – встановлення генотипу HCV.

Пацієнтам з підозрою на гостру або хронічну HCV-інфекцію насамперед показане визначення сумарних анти-HCV. ПЛР з метою виявлення РНК HCV рекомендована:

- пацієнтам з позитивним тестом на анти-HCV;
- особам, яким планується призначення противірусної терапії (у цього контингенту застосовується кількісна ПЛР для з'ясування початкового значення вірусного навантаження – РНК HCV);
- хворим з імуносупресією, у яких мають місце ознаки патології печінки і негативний результат на анти-HCV.

Визначення генотипу HCV показане усім пацієнтам до початку противірусної терапії з метою вибору дози препаратів, тривалості лікування і прогнозування його ефективності.

Дотепер розроблено 4 покоління тест-систем для виявлення анти-HCV за допомогою ІФА, проте представники першого покоління наразі не використовуються через низьку чутливість.

РНК HCV є показником активної реплікації HCV і найбільш раннім маркером інфекції. Вона може бути виявлена методом ПЛР вже через 1-2 тиж після інфікування, незадовго до підвищення рівня сироваткових трансаміназ. Методом ІФА анти-HCV виявляються до 5-6-го тижня після початку гепатиту у 80% випадків і до 12-го тижня в 90% осіб. Виявлення анти-HCV має принципове значення передусім в організації скринінгових обстежень, оскільки дозволяє запідозрити наявність ГС та характеризується відносно низькою вартістю обстеження.

Важливо, що маркером гострої стадії інфекційного процесу (первинного інфікування або реактивації) є виявлення анти-HCV класу IgM, які з'являються через 4-6 тиж після інфікування і зберігаються до 5-6 міс при первинному інфікуванні. Рівень IgM може повторно підвищуватися під час наступної реактивації інфекції.

Анти-HCV класу IgG з'являються на 11-12-му тижні після інфікування, досягають максимальної концентрації до 5-6-го міс і зберігаються в крові на постійному рівні протягом усього періоду хвороби і у фазу реконвалесценції, далі поступово знижуються до мінімальних значень. Анти-HCV класу IgG можуть бути присутніми довічно.

Як маркер давності інфікування HCV розглядається авідність IgG до зазначеного вірусу. Так, низька авідність вказує на нещодавнє інфікування HCV (за 3-4 міс до тестування), висока – про інфікування у більш ранні терміни. При визначенні анти-HCV у деяких випадках реєструються псевдонегативна і псевдопозитивна реакції. Псевдонегативні результати виявлення антитіл можуть фіксуватися в пацієнтів з ослабленим імунітетом (ВІЛ-інфікованих), хворих з нирковою недостатністю, а також на тлі есенціальної змішаної кріоглобулінемії; псевдопозитивні – при аутоімунних захворюваннях, вузликовому поліартеріїті, за наявності ревматоїдного фактора, гіпергаммаглобулінемії, парапротеїнемії, при пасивній передачі антитіл.

Для розмежування псевдопозитивних зразків і тих, які дійсно містять антитіла до HCV, розроблені додаткові тести: рекомбінантний імуноблотинг, визначення спектру білків анти-HCV. Імуноблотингові стандартні антигени дозволяють виключити неспецифічний результат, отриманий методом ІФА, проте візуальна оцінка імуноблотингових смуг може бути неоднозначною в різних діагностичних центрах. У мережі лабораторій «Сінево» використовуються твердофазні імуноферментні тест-системи, що засновані на визначенні антитіл до окремих вірусних антигенів (core, NS3, NS4ab, NS5a) та забезпечують отримання достовірних результатів.

Золотим стандартом діагностики ГС і підтвердженням позитивних результатів анти-HCV є виявлення РНК HCV за допомогою ПЛР у якісному і кількісному варіантах. РНК HCV виявляється у крові вже через 5 діб після інфікування, тобто задовго до появи антитіл до HCV. Чутливість методів визначення РНК HCV підвищується з кожним роком і нині сягає 10-15 МО/мл крові. За таких обставин необхідність якісного визначення РНК HCV поступово відходить на другий план. Усі сучасні молекулярні методи діагностики РНК HCV мають чутливість на рівні 98-99%.

Встановлення генотипу HCV здійснюється з епідеміологічною метою і в клінічній практиці для прогнозування ефективності лікування та визначення його тривалості. В Україні найбільш розповсюдженими є генотипи HCV 1a і 1b, рідше зустрічається третій, інші варіанти виявляються вкрай рідко. Приблизно у 5% випадків не вдається ідентифікувати генотип, що може зумовлюватися низьким вірусним навантаженням і дуже високою мінливістю геному вірусу.

Лабораторна діагностика гепатиту D

Вірус гепатиту D (ГD) – HDV – є дефектним, він містить односпіральну РНК. Для реплікації капсульних білків йому необхідна допомога HBV.

HDV не належить до жодної з відомих родин вірусів тварин. За своїми властивостями HDV найбільш подібний до віроїдів і вірусів-сателітів, асоційованих з вірусами рослин. Лабораторна діагностика здійснюється шляхом виявлення серологічних маркерів HDV включно з наявністю антигену, антитіл до нього і РНК HDV.

Виявлення антигену HDV і РНК HDV в сироватці крові або тканині печінки свідчить про активний ГD, проте ці маркери можуть не визначатися в сироватці хворих на фульмінантний ГD.

Маркером активної реплікації HDV також є анти-HDV класу IgM. Серологічні маркери ГD залежать від того, як саме відбулося інфікування – у вигляді коінфекції з HBV (у більшості хворих патологія має гострий перебіг і завершується одужанням) або суперінфекції у пацієнтів з хронічним ГВ (характерний більш тяжкий перебіг, ніж у разі коінфекції, у 10% випадків розвивається фульмінантний гепатит).

При коінфекції в більшості випадків анти-HDV класів IgM та IgG виявляються протягом захворювання. Після одужання титр анти-HDV зазвичай знижується до практично невизначуваних рівнів, серологічні маркери того, що людина колись була інфікована HDV, відсутні.

Антиген HDV визначається лише у 25% хворих і зазвичай зникає разом з HBsAg. При суперінфекції у пацієнтів з хронічним ГВ серологічна картина має такі характерні особливості:

- титр HBsAg знижується до моменту появи антигену HDV у сироватці;
- антиген HDV і РНК HDV продовжують визначатися в сироватці, оскільки на відміну від випадків коінфекції у більшості (70-80%) пацієнтів із суперінфекцією ГD розвивається хронічна інфекція;
- реєструються високі титри антитіл (анти-HDV) як класу IgM, так і IgG, що зберігаються невизначено довго.

Серологічні маркери HDV визначають за допомогою ІФА і РІА, а РНК HDV – методом ПЛР. Зарубіжними промисловими біотехнологічними підприємствами випускаються діагностичні набори, що включають усі необхідні компоненти й реактиви для виконання тесту.

У діагностичних препаратах використовують дельта-антиген, отриманий з печінки бабаків, інфікованих HDV в експериментальних умовах; антиген, виділений з печінки загиблих носіїв HDV; дельта-антиген, одержаний генно-інженерним способом.

Лабораторна діагностика гепатиту Е

Збудник гепатиту Е (ГЕ) – HEV, сферичний вірус, позбавлений зовнішньої оболонки, що містить односпіральну РНК.

При встановленні діагнозу ГЕ в кожному випадку необхідно враховувати ряд діагностичних аргументів:

- наявність у хворого симптомокомплексу гострого та, імовірно, інфекційного гепатиту;
- достовірне виключення етіологічної ролі HAV і HBV, що ґрунтується на негативних результатах серологічних тестів (анти-HAV класу IgM та анти-HBc класу IgM);
- ретельний аналіз даних епідеміологічного анамнезу включно з вказівками на нещодавнє відвідування ендемічних регіонів;
- дослідження (за можливості) фекалій хворого на присутність HEV методом імуноелектронної мікроскопії, ПЛР.

Існують діагностичні методи, засновані на застосуванні реакції імунофлуоресценції для визначення антигену HEV у фекаліях та ІФА для виявлення антитіл до HEV (анти-HEV класів IgM та IgG).

Наявність анти-HEV класу IgM досить часто спостерігається в сироватках пацієнтів з ГЕ в гострій стадії захворювання і в період ранньої реконвалесценції. Виявлення анти-HEV класу IgG свідчить про перенесений у минулому ГЕ. У рамках діагностики ГЕ визначають також РНК HEV.

У сучасних умовах лікар може користуватися послугами великої кількості лабораторій, які виконують зазначені дослідження. Однак нерідко доводиться стикатися як з псевдопозитивними, так і з псевдонегативними результатами через об'єктивні (широкий асортимент і різна якість тест-систем) і суб'єктивні (наприклад, помилка лаборанта) причини. Тому вкрай важливого значення набувають висока стабільність, достовірність і повторюваність наданих результатів.

Наш досвід дозволяє стверджувати, що на сьогодні лабораторними закладами, які гарантовано забезпечують стабільність і відтворюваність даних, а отже, заслуговують на довіру, є «Сінево» – європейська мережа медичних лабораторій в Україні.

Список літератури знаходиться в редакції.

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

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