

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

© А. М. Сокурова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»
Минздрава России

Резюме. В РФ в последние годы заболеваемость хроническими формами вирусных гепатитов возросла. В связи с чем необходимо обеспечить качественную и своевременную диагностику этих инфекций. Методы специфической лабораторной диагностики вирусных гепатитов все время совершенствуются. Перечень маркеров инфицирования расширяется. Правильная интерпретация их сочетаний позволит врачам быстро оценить результаты исследований и назначить лечение. Для специфической лабораторной диагностики применяют следующие методы: иммунная электронная микроскопия (ИЭМ), иммуно-ферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР). Маркерами острого гепатита А являются anti-HAV Ig M и вирусная РНК. Наличие anti-HAV Ig G свидетельствует о перенесенном ранее заболевании. Диагностика вирусного гепатита В основана на выявлении антигенов вируса — HBsAg, HBeAg и антител к антигенам (Ig M и Ig G к HBsAg, Ig G к HBeAg, Ig G к HBsAg). Кроме того, проводят индикацию ДНК-вируса методом ПЦР. Серологическое исследование крови на маркеры гепатита D показано только у пациентов с наличием в крови HBsAg. Маркерами являются РНК вируса гепатита D и Ig M, Ig G к вирусу. Специфическая лабораторная диагностика гепатита С базируется на определении антител к структурным и неструктурным белкам вируса. Это отборочный тест. Выявление вирусной РНК считается «золотым стандартом» в диагностике гепатита С. Лабораторная диагностика гепатита Е проводится методом исключения специфических маркеров острых гепатитов А, В, С, а также методом ИЭМ — обнаружение вируса в фекалиях.

Ключевые слова: лабораторная диагностика; вирусный гепатит; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция; маркеры инфекции.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В РФ в последние годы заболеваемость хроническими формами гепатитов возросла более чем в 2 раза. По данным Роспотребнадзора, в 2013 г. зарегистрировано 73 570 случаев хронических вирусных гепатитов (заболеваемость составляет 51 случай на 100 тыс. населения), в том числе около 500 случаев у детей до 14 лет включительно. В г. Санкт-Петербурге заболеваемость хроническими формами гепатитов значительно выше, чем в среднем по стране и составляет 184 случая на 100 тыс. населения. Заболеваемость острыми вирусными гепатитами в Российской Федерации постепенно снижается (в 2013 г. зарегистрировано 12 745 случаев острых вирусных гепатитов, в том числе около 3 тыс. случаев у детей до 14 лет включительно).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Правильно выбрать алгоритм специфической лабораторной диагностики и интерпретировать полученные результаты, что позволит выявить заболевших, предотвратить распространение вирусных гепатитов, определить схему лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для специфической лабораторной диагностики применяют следующие методы:

- иммунная электронная микроскопия (ИЭМ);
- иммуно-ферментный анализ (ИФА);
- полимеразная цепная реакция (ПЦР).

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА А

Специфическая лабораторная диагностика гепатита А включает:

1. Выявление в сыворотке крови Ig M к вирусу гепатита А (ВГА, HAV) (anti-HAV Ig M) — маркер острой инфекции, в том числе бессимптомной формы. Иммуноглобулины класса М присутствуют в сыворотке крови с первых дней болезни и сохраняются до 3–6 месяцев [7].
2. Определение «anamnestических» Ig G к ВГА (anti-HAV Ig G) — выявление в сыворотке крови (появляются с 3–4-й недели заболевания и сохраняются на протяжении всей жизни, обеспечивая иммунитет; их наличие указывает на перенесенный в прошлом гепатит А или эффективную вакцинацию). Используется для определения иммунного статуса [7, 11].
3. Исследование фекалий на наличие ВГА методом ИЭМ. Проводится с эпидемиологической целью для выявления в очаге вспышки инфицированных лиц до проявления клинических симптомов заболевания, так как к моменту проявления клинических симптомов вирус в фекалиях практически отсутствует. Дети могут выделять вирус более длительно, чем взрослые, возможно, в течение нескольких недель после появления клинических симптомов заболевания [11, 12].
4. Определение в сыворотке крови РНК ВГА методом ПЦР — позволяет установить диагноз «острый гепатит А» (ОГА). РНК ВГА в среднем может определяться до 95 дней [7].

Таблица 1

Соответствие серологических маркеров HAV иммунному статусу обследуемого [11]

Серологические маркеры HAV	Иммунный статус
anti-HAV Ig M	ОГА
anti-HAV Ig M ± anti-HAV Ig G	Недавно перенесённый гепатит А
Отсутствие anti-HAV Ig M и anti-HAV Ig G	Отсутствие иммунитета к HAV
anti-HAV IgG	Иммунитет к HAV
РНК HAV	ОГА

В таблице 1 представлены основные серологические маркеры ВГА и их соответствие иммунному статусу обследуемого.

Условной защитной концентрацией специфических антител к ВГА для населения является 22 МЕ/л, а для спецконтингентов, в том числе военнослужащих, — не менее 30 МЕ/л [7].

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА В

Диагностика вирусного гепатита В (ГВ) основана на выявлении антигенов вируса — HBsAg, HBeAg, антител (Ig M и Ig G к HBcAg, Ig G к HBeAg, Ig G к HBsAg) методом ИФА (чувствительность 0,1 нг/мл), либо его ДНК в крови и других биологических жидкостях организма, а также в клетках и тканях органов методом ПЦР [2].

Самый важный маркер инфекции — HBsAg. Он обнаруживается начиная с 2–5-й недели от момента инфицирования и до момента выздоровления при острой инфекции (при хронической инфекции — пожизненно). Средняя продолжительность циркуляции в крови HBsAg — 70–80 суток. Однако при острой форме вирусного гепатита В существует период «окна», когда единственным маркером инфицированности являются Ig M к HBcAg. Время длительности фазы «окна» колеблется от 3 недель до 1 года [12].

Только комплексный анализ маркеров инфекции позволяет определить наличие вируса, установить клиническую стадию протекания инфекции (табл. 2) и иммунологический статус обследуемого, а также судить об эффективности лечения [11].

Взаимоисключающие маркеры (не могут присутствовать в крови одновременно): HBsAg и Ig G к HBsAg, HBeAg и Ig G к HBeAg.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГВ

HBsAg — основной и первый маркер инфицирования вирусом ГВ, появляется в крови в инкубационном периоде, циркулирует при остром заболевании до 5–6 месяцев. Положительный результат исследования на HBsAg должен быть проверен путем перестановки и последующего подтверждения в одном из тестов.

HBeAg — циркулирует только при наличии HBsAg. Появляется в крови больных острым или хроническим ГВ в фазе вирусемии, указывает на репликацию вируса в гепатоцитах и высокую инфекционность крови (антиген инфекционности).

Тестировать кровь на наличие HBeAg необходимо лишь при положительном результате на HBsAg. Длительность циркуляции HBeAg — важный прогностический признак. Его выявление через два месяца с начала заболевания свидетельствует о вероятном развитии хронического гепатита.

HBcAg — сердцевинный (коровый) антиген в крови в свободном виде не циркулирует и не определяется. Обнаруживается только в гепатоцитах при морфологическом исследовании биоптатов печени.

Ig M±Ig G к HBcAg — антитела к сердцевинному антигену — важный диагностический маркер, особенно при отрицательных результатах индикации HBsAg, свидетельствует о встрече организма с вирусом ГВ.

Таблица 2

Схема определения стадии болезни по серологическим маркерам ВГВ [11]

Стадия болезни	Маркеры ВГВ
Острая фаза болезни	ДНК ВГВ HBsAg HBeAg Ig M к HBcAg
Фаза реконвалесценции/хронический гепатит	Ig G к HBeAg Ig M±Ig G к HBcAg
Фаза «иммунологического» выздоровления	Ig G к HBsAg Ig G к HBeAg Ig M±Ig G к HBcAg

Таблица 3

Интерпретация сочетаний серологических маркеров вируса гепатита В [11]

Клиническое состояние	Серологические маркеры					
	HBsAg	Ig G к HBsAg	Ig M к HBcAg	Ig M±Ig G к HBcAg	HBeAg	Ig G к HBeAg
Острый ГВ, ранняя фаза	±	–	±	±	±	–
Острый ГВ, поздняя фаза	±/–	–	±	±	–	±
Острый ГВ, стадия реконвалесценции	–	–	–	±	–	±
Острый ГВ в анамнезе	–	±	–	±	–	±/–
Хронический ГВ	±/–	–	±/–	±	±/–	±
Вакцинация HBsAg	–	±	–	–	–	–

Ig M к HBcAg — один из наиболее ранних маркеров вирусного гепатита В. Выявляют у 100% больных острым ГВ, т. е. они могут быть единственным маркером в фазу «окна».

Ig G к HBeAg — указывают на начало стадии реконвалесценции при остром вирусном гепатите В.

Ig G к HBsAg — протективные (защитные) антитела к поверхностному антигену, являются показателем иммунитета (выздоровления) или иммунного ответа на вакцинацию против ГВ. «Защитная» концентрация составляет 10 МЕ и более [1–6, 8, 10–12].

В таблице 3 представлены основные алгоритмы интерпретации сочетаний серологических маркеров вируса ГВ.

ДНК вируса ГВ обнаруживается в сыворотке или плазме крови методом ПЦР. Ее наличие свидетельствует о высокой репликативной активности вируса. Количество ДНК вируса в крови быстро возрастает в течение инкубационного периода и становится максимальным в острой фазе заболевания. Циркуляция более 5–6 месяцев является неблагоприятным прогностическим критерием и свидетельствует о переходе инфекции в хроническую форму.

Количественная характеристика содержания ДНК вируса ГВ в клинических образцах важна для оценки эффективности противовирусной терапии. Если концентрация вируса меньше 10^5 копий/мл, то прогноз курса лечения благоприятный, если выше, то необходимо применить другие схемы лечения.

Частота выявления ДНК вируса ГВ коррелирует с частотой определения HBsAg, HBeAg и Ig M к HBcAg.

Используя технику ПЦР, можно определить и подтип HBsAg.

Так как в практику отечественного здравоохранения были включены национальные стандарты обязательного обнаружения различных концентраций поверхностного антигена вируса ГВ в образцах сывороток крови (с 2003 г. — 0,1 нг/мл), решающее

значение для индикации HBsAg имеют такие методы как ИФА в различных модификациях и ПЦР [10, 12].

В исключительных случаях (если нет специального оборудования) разрешено использовать иммунохроматографический экспресс-тест (чувствительность 5 нг/мл) [2].

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА D

Серологическое исследование крови на маркеры вируса гепатита D (ВГD) показано только у пациентов с наличием в крови HBsAg, т. е. инфицированных вирусом ГВ.

Ежегодно на ВГD обследуют «здоровых» носителей HBsAg, а также пациентов с хроническим вирусным гепатитом В при обострениях и ухудшении состояния.

Маркеры инфицированности ВГD:

- РНК ВГD,
- Ig M±Ig G к ВГD,
- Ig M к ВГD,
- Ig G к ВГD.

Методы лабораторной диагностики: антитела в крови определяют методом ИФА, РНК ВГD — методом ПЦР.

При коинфекции в желтушный период на протяжении 2 недель выявляют РНК вируса и Ig M к ВГD. Несколько позднее, через 1–2 месяца с момента появления желтухи, выявляют Ig G к ВГD. Титр Ig G снижается до практически неопределяемых уровней после выздоровления, и не сохраняется никаких серологических маркеров того, что человек был когда-либо инфицирован ВГD.

При суперинфекции в острый период РНК ВГD может не выявляться. Наряду с Ig M к ВГD выявляют Ig G к ВГD, причем в более высоких титрах, чем при коинфекции. Стойкое увеличение титра Ig M±Ig G к ВГD является маркером хронического гепатита D [3–6, 11].

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА С

Материал для исследования — кровь и сыворотка крови.

Первый метод — ИФА — определение антител к белкам вируса гепатита С (ВГС).

Современные диагностические тест-системы ИФА в качестве антигенов должны содержать полный спектр структурных и неструктурных белков вируса. Теперь используются тест-системы 4-го поколения, содержащие рекомбинантные С-, NS3-, NS4-, NS5-белки [2].

Также разработаны тест-системы ИФА и иммуноблотинга для отдельного определения антител к различным белкам ВГС. Их используют в качестве подтверждающих тестов и устанавливают стадию инфекционного процесса, так как первыми появляются антитела к С- и NS3-белкам, а антитела к NS4 и NS5 появляются позже. Но все эти антитела являются только маркерами инфицированности ВГС и защитной роли не играют.

Второй метод диагностики — ПЦР для определения РНК вируса. Этот метод позволяет выявить ВГС на 2–3-й неделе после заражения и это единственный достоверный критерий присутствия вируса в организме. Выявление РНК ВГС считается «золотым» стандартом в диагностике ГС и подтверждением положительных результатов обнаружения антител к белкам вируса. В настоящее время для индикации РНК ВГС используется ПЦР в качественном и количественном варианте. Чувствительность метода составляет 10–50 копий РНК в 1 мл крови. Кроме того, методом ПЦР определяют вирусную нагрузку (вирусная нагрузка считается высокой, если в крови содержится более 800 000 МЕ/мл или 2 000 000 копий/мл вирусных РНК) и проводят генотипирование вируса. Для клинической практики достаточно разграничивать 5 субтипов ВГС: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a. На территории РФ преобладающим генотипом является 1b, составляющий 80 % популяции вируса, далее с убывающей частотой — 3a, 1a, 2a. Генотипирование необходимо проводить всем пациен-

там до начала лечения для правильного назначения противовирусных препаратов и продолжительности терапии [9, 10].

Типируют ВГС путем обнаружения генетических изменений (мутаций) в консервативных областях вирусного генома: амплификация консервативных областей и анализ специфичных нуклеотидных последовательностей при помощи метода прямого секвенирования амплифицированных фрагментов с последующей ПЦР с типоспецифичными праймерами RFLP (анализ амплифицированных фрагментов с помощью ферментов рестрикции), обратной гибридизации с типоспецифичными зондами (LiPA) и SSCP (анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК).

ПЦР позволяет выявить РНК ВГС не только в сыворотке крови, но и в ткани печени, что важно в подтверждении роли вируса в формировании гепатоцеллюлярной карциномы при отсутствии антител к вирусу и его РНК в сыворотке крови [9, 10, 12].

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА Е

Лабораторная диагностика гепатита Е проводится методом исключения специфических маркеров острых гепатитов А, В, С, а также методом ИЭМ — обнаружение вируса гепатита Е (ВГЕ) в фекалиях. Разработана ПЦР для детекции вирусной РНК. Кроме того, разработаны тест-системы ИФА для выявления антител в сыворотке крови к ВГЕ:

- Ig М (выявление больных в острой стадии болезни);
- общие антитела (Ig М±Ig G) — выявление больных в период реконвалесценции [11, 12].

ВЫВОДЫ

Признавая огромное значение вирусных гепатитов, Всемирная ассамблея здравоохранения в 2010 году приняла резолюцию WHA63.18, призывая применять комплексный подход к профилактике вирусных гепатитов и борьбе с ними. В связи с чем необходимо обеспечить качественную и сво-

Перечень маркеров диагностики ВГС [11]

Цель исследования	Маркер ВГС
Диагностика ВГС	<ul style="list-style-type: none"> • Ig М±Ig G к ВГС
Диагностика острого ВГС, мониторинг больных, определение прогноза и исхода	<ul style="list-style-type: none"> • Ig М±Ig G к ВГС; • РНК ВГС; • раздельное определение антител к белкам: С, NS3, NS4, NS5
Скрининг доноров крови	<ul style="list-style-type: none"> • Ig М±Ig G к ВГС
Скрининг беременных	<ul style="list-style-type: none"> • Ig М±Ig G к ВГС
Скрининг групп повышенного риска	<ul style="list-style-type: none"> • Ig М±Ig G к ВГС

Таблица 4

временную диагностику этих заболеваний. Методы специфической лабораторной диагностики вирусных гепатитов все время совершенствуются, перечень маркеров инфицирования расширяется, и правильная интерпретация их сочетаний позволит врачам быстро оценить результаты лабораторных исследований и назначить больному лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 6 апреля 2004 г. № 154 «Вопросы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».
2. Приказ Минздрава России от 21.10.2002 г. № 322 «О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека».
3. Положение о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, утвержденное Постановлением Правительства Российской Федерации от 15.09.2005 г. № 569.3.
4. Приказ Минздравсоцразвития России от 22.02.2008 г. № 91 н «О порядке контроля за качеством донорской крови и ее компонентов».
5. Приказ Роспотребнадзора от 04.10.2007 г. № 269 «Об организации центра молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов».
6. Технический регламент «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии», утвержденный Постановлением Правительства Российской Федерации от 26.01.2010 г. № 29.
7. МУ 3.1.2837–11 «Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор и профилактика вирусного гепатита А».
8. МУ 3.1.2792–10 «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за гепатитом В».
9. Пименов Н.Н., Чуланов В.П., Комарова С.В. и др. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2012. — № 3. — С. 4–9.
10. Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О. и др. Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопрокт. — 2010. — Т. 20, № 6. — С. 4–60.
11. Лабораторная диагностика инфекционных вирусных заболеваний. 2-е издание // Коллектив авторов СПб ГУЗ «Городской диагностический центр (вирусологический)», Экспертная лаборатория Минздрава РФ. — СПб, 2004. — 94 с.
12. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.В. Алексеев, В.Б. Сбойчаков, А.М. Сокурова и др.; Под ред. А.И. Карпищенко. — 3-е изд., перераб. и доп. — Т. 2. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 792 с.

SPECIFIC LABORATORY DIAGNOSIS OF VIRAL HEPATITIS

Sokurova A.M.

◆ **Resume.** During the last years, the incidence of chronic forms of viral hepatitis has increased. This necessitates the need for a reliable and timely means of diagnosis, which have been improved progressively. The list of markers of infection has been expanding, and the appropriate interpretation of this data would allow doctors to make the choice of treatment required for each particular case. The following methods are used for diagnosis of viral hepatitis: immuno-electron microscopy (IEM), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), polymerase chain reaction (PCR). The markers of acute hepatitis A are: anti-HAV Ig M and the viral RNA. The presence of anti-HAV Ig G is indicative of a past history of disease. Diagnosis of viral hepatitis B is based on detection of virus antigens - HBsAg, HBeAg and antibodies (Ig M and G to the HBcAg, Ig G to the HBeAg and Ig G to the HBsAg). In addition, viral DNA detected by PCR is indicative for viral presence. Serological blood testing for markers of hepatitis D is informative only in patients with the presence of HBsAg in the blood. Important are the hepatitis D viral RNA and Ig M/G to the virus. Specific laboratory diagnosis of hepatitis C is based on the detection of antibodies to viral proteins, although detection of viral RNA is considered the «golden standard» in diagnosing of this disease. Laboratory diagnosis of hepatitis E is based on exclusion of specific markers of acute hepatitis A, B, C, as well as by the method of IEM, which relies on the detection of the virus in the feces.

◆ **Key words:** laboratory diagnosis of viral hepatitis; enzyme immunoassay; polymerase chain reaction; markers of infection.

◆ Информация об авторе

Сокурова Алла Михайловна — канд. биол. наук, доцент, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии. ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. E-mail: ansokurov@yandex.ru.

Sokurova Alla Mikhaylovna — PhD, Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology. Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: ansokurov@yandex.ru.