

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Орадова А.Ш.

Научно-образовательная лаборатория, КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы, Казахстан

Расширение возможностей в лечении и профилактике вирусных болезней с использованием противовирусных препаратов, иммуномодуляторов и вакцин с различным механизмом действия нуждается в быстрой и точной лабораторной диагностике. Узкая специфичность некоторых противовирусных препаратов также требует быстрой и высокоспецифичной диагностики инфицирующего агента. Появилась необходимость в количественных методах определения вирусов для мониторинга противовирусной терапии. Помимо установления этиологии заболевания лабораторная диагностика имеет важное значение в организации противоэпидемических мероприятий.

Ранняя диагностика первых случаев эпидемических инфекций позволяет своевременно провести противоэпидемические мероприятия — карантин, госпитализацию и вакцинацию. Реализация программ по ликвидации инфекционных заболеваний, например, натуральной оспы, показала, что по мере их выполнения возрастает роль лабораторной диагностики. Существенную роль играет лабораторная диагностика пациентов, инфицированных вирусом гепатита В (HBV) и С (HCV).

Цель работы — совершенствование лабораторной диагностики вирусных гепатитов на современном этапе.

Материалы и методы. В лабораторной диагностике вирусных гепатитов имеются три основных подхода:

- 1) непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот;
- 2) изоляция и идентификация вируса из клинического материала;
- 3) серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител в течение болезни.

При любом выбранном подходе к вирусной диагностике одним из важнейших факторов является качество исследуемого материала. Так, например, для прямого анализа образца или для изоляции вируса исследуемый материал должен быть получен в самом начале заболевания, когда возбудитель еще экскретируется в относительно больших количествах и не связан пока антителами, а объем образца должен быть достаточен для проведения прямого исследования. Также важен выбор материала в соответствии с предполагаемым заболеванием, то есть того материала, в котором исходя из патогенеза инфекции вероятность присутствия вируса наибольшая.

Не последнюю роль в успешной диагностике играет среда, в которую берется материал, как он транспортируется и как хранится. Так, носоглоточные или ректальные мазки, содержащее везикул помещают в среду, содержащую белок, предотвращающий быструю потерю инфекционности вируса (если планируется его изоляция), или в соответствующий буфер (если планируется работа с нуклеиновыми кислотами).

Результаты и обсуждение. Прямые методы — это методы, которые позволяют обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную нуклеиновую кислоту (НК) непосредственно в клиническом материале, то есть являются наиболее быстрыми (2–24 ч). Однако из-за ряда особенностей возбудителей прямые методы имеют свои ограничения (возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов). Поэтому они часто требуют подтверждения непрямими методами.

Электронная микроскопия (ЭМ). С помощью этого метода можно обнаружить собственно вирус. Для успешного определения вируса его концентрация в пробе должна быть примерно $1 \cdot 10^6$ частиц в 1 мл. Но поскольку концентрация возбудителя, как правило, в материале от больных незначительна, то поиск вируса затруднен и требует предварительного его осаждения с помощью высокоскоростного центрифугирования с последующим негативным контрастированием. Кроме того, ЭМ не позволяет типировать вирусы, так как у многих из них нет морфологических различий внутри семейства. Например, вирусы простого герпеса, цитомегалии или опоясывающего герпеса морфологически практически неотличимы.

Одним из вариантов ЭМ, используемым в диагностических целях, является иммунная электронная микроскопия (ИЭМ), при которой применяются специфические антитела к вирусам. В результате взаимодействия антител с вирусами образуются комплексы, которые после негативного контрастирования легче обнаруживаются.

ИЭМ несколько более чувствительна, чем ЭМ, и используется в тех случаях, когда вирус не удается культивировать *in vitro*, например при поиске возбудителей вирусных гепатитов.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Иммуноферментные методы определения вирусных антигенов в принципе сходны с РИФ, но основываются на мечении антител ферментами, а не красителями. Наиболее широко используется пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза, применяют также β -галактозидазу и β -лактамазы. Меченые антитела связываются с антигеном, и такой комплекс обнаруживается при добавлении субстрата для фермента, с которым конъюгированы антитела. Конечный продукт реакции может быть в виде нерастворимого осадка, и тогда учет проводится с помощью обычного светового микроскопа, или в виде растворимого продукта, который обычно окрашен (или может флюоресцировать или люминесцировать) и регистрируется инструментально.

Поскольку с помощью ИФА можно измерять растворимые антигены, то не требуется наличия интактных клеток в образце, и таким образом могут использоваться различные виды клинического материала.

Другое важное преимущество метода ИФА — возможность количественного определения антигенов, что позволяет применять его для оценки клинического течения болезни и эффективности химиотерапии. ИФА, как и РИФ, может применяться как в прямом, так и в непрямом варианте.

Твердофазный ИФА, дающий растворимый окрашенный продукт реакции, нашел наибольшее распространение. ИФА может быть использован как для определения антигена (тогда на твердую фазу — дно лунки полистиролового планшета — наносится антиген), так и для определения антител (тогда на твердую фазу наносятся антигены).

Радиоиммунный анализ (РИА). Метод основан на метке антител радиоизотопами, что обеспечивало высокую чувствительность в определении вирусного антигена. Широкое распространение метод получил в 80-е годы, особенно для определения маркеров HBV и других некультивируемых вирусов. К недостаткам метода относится необходимость работать с радиоактивными веществами и использование дорогостоящего оборудования (гамма-счетчиков).

Молекулярно-генетические методы. Первоначально классическим методом выявления вирусного генома считался высокоспецифичный метод гибридизации НК, но в настоящее время все шире используется выделение геномов вируса с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот. Метод основан на гибридизации комплементарных нитей ДНК или РНК с образованием дуплетных структур и на выявлении их с помощью метки. Для этой цели используются специальные ДНК- или РНК-зонды, меченные изотопом (^{32}P) или биотином, обнаруживающие комплементарные нити ДНК или РНК. Существуют несколько вариантов метода:

- точечная гибридизация — выделенную и денатурированную НК наносят на фильтры и затем добавляют меченый зонд; индикация результатов — автордиография при использовании ^{32}P или окраска — при авидин-биотины;

- блот-гибридизация — метод выделения фрагментов НК, нарезанных рестрикционными эндонуклеазами из суммарной ДНК и перенесенных на нитроцеллюлозные фильтры и тестируемые мечеными зондами

- гибридизация *in situ* — позволяет определять НК в инфицированных клетках.

ПЦР основана на принципе естественной репликации ДНК. Суть метода заключается в многократном повторении циклов синтеза (амплификации) вирусспецифической последовательности ДНК с помощью термостабильной Taq ДНК-полимеразы и двух специфических затравок — так называемых праймеров.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различным температурным режимом. В каждом цикле удваивается число копий синтезируемого участка. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации, что позволяет за 25–35 циклов наработать достаточное число копий выбранного участка ДНК для ее определения, как правило, с помощью электрофореза в агарозном геле.

Метод высокоспецифичен и очень чувствителен. Он позволяет обнаружить несколько копий вирусной ДНК в исследуемом материале. В последние годы ПЦР находит все более широкое применение для диагностики и мониторинга вирусных инфекций (вирусы гепатитов, герпеса, цитомегалии, папилломы и др.).

Разработан вариант количественной ПЦР, позволяющий определять число копий амплифицированного сайта ДНК. Методика проведения сложна, дорогостояща и пока недостаточно унифицирована для рутинного применения.

Цитологические методы в настоящее время имеют ограниченное диагностическое значение, но при ряде инфекций по-прежнему должны применяться. Исследуются материалы аутопсии, биопсии, мазки, которые после соответствующей обработки окрашиваются и анализируются под микроскопом.

В некоторых случаях, например при дифференциальной диагностике хронических гепатитов, имеет значение оценка состояния ткани печени.

Непрямые методы диагностики

Выделение вирусов — один из самых старых и трудоемких методов диагностики. Однако

и сегодня выделение вируса с последующей идентификацией с помощью одного из современных методов (ИФА с моноклональными антителами или ПЦР) является наиболее достоверным методом диагностики — так называемый «золотой стандарт».

Для успешного выделения вирусов клинический материал должен быть взят в соответствии с патогенезом предполагаемого заболевания и в наиболее ранние сроки.

Как правило, берутся:

- при респираторных инфекциях — носоглоточный смыв;
- при энтеровирусных инфекциях — смыв и фекалии (рео-, энтеровирусы);
- при поражениях кожи и слизистых оболочек — соскобы, содержимое пузырьков (герпес, ветряная оспа);
- при экзантемных инфекциях — смывы (корь, краснуха);
- при арбовирусных инфекциях — кровь, спинномозговая жидкость.

Для выделения вирусов используют культуры клеток, лабораторных животных, эмбрионы кур. Процесс длительный, иногда требующий проведения нескольких пассажей, прежде чем вирус будет обнаружен и идентифицирован с помощью одного или нескольких методов — в реакции нейтрализации (РН), РИФ, ИФА или ПЦР.

В настоящее время в большинстве случаев выделение вирусов заменено обнаружением вирус-специфических антигенов в инфицированных клеточных культурах с помощью указанных методов. Для этих целей широко применяются моноклональные антитела, особенно к ранним белкам возбудителя в РИФ или ИФА. Такой подход позволяет получить ответ уже через 24–72 ч после инфицирования клеток культуры тканей.

Серодиагностика

Серологическая диагностика, основанная на реакции антиген — антитело, может быть использована для определения как тех, так и других, и играет роль в определении этиологии вирусной инфекции даже при отрицательных результатах выделения вируса.

Успех серологической диагностики зависит от специфичности реакции и соблюдения временных условий взятия крови, необходимых для синтеза организмом антител.

В большинстве случаев используют парные сыворотки крови, взятые с интервалом в 2–3 недели. Положительной реакция считается по крайней мере при 4-кратном нарастании титра антител. Известно, что большинство специфических антител относятся к классам IgG и IgM, которые синтезируются в различное время инфекционного процесса. При этом IgM-антитела относятся к ранним, и тесты, используемые для их определения, применяются для ранней диагностики (достаточно исследовать одну сыворотку). Антитела класса IgG синтезируются позже и длительно сохраняются.

ИФ метод также, как ИФА, применяется для определения антител в сыворотке. Все большее значение и распространение получает ИФА для диагностических целей. На твердую фазу (дно лунок полистироловых планшетов или полистироловые шарики) сорбируется вирусный антиген. При добавлении соответствующих антител, находящихся в сыворотке, происходит их связывание с сорбированными антигенами. Наличие искомым антител обнаруживается с помощью анти-антител (например, человеческих), конъюгированных с ферментом (пероксидазой). Добавление субстрата и реакция субстрат — фермент дают окраску. ИФА может быть использован и для определения антигенов. В этом случае на твердую фазу сорбируются антитела.

Моноклональные антитела. Большой прогресс в диагностике вирусных инфекций достигнут в последнее десятилетие, когда с развитием генно-инженерных исследований была разработана система получения моноклональных антител. Тем самым были резко повышены специфичность и чувствительность диагностических методов определения вирусных антигенов. Узкая специфичность моноклонов, представляющих небольшую долю вирусных белков, которые могут не присутствовать в клиническом материале, успешно преодолевается использованием нескольких моноклональных антител к различным вирусным детерминантам.

Выводы. Количество методов, используемых для диагностики вирусных инфекций, непрерывно растет. Одни уходят в прошлое и имеют в основном историческое значение, другие совершенствуются. Несомненно, что технический прогресс в определении антител, белковом анализе и генодиагностике наряду с расширением наших знаний о вирусах и патогенезе вирусных инфекций приведут к появлению новых высокоспецифичных и высокочувствительных методов, удобных для клинического применения.

В настоящее время выпускается большое количество коммерческих сертифицированных тест-систем, в том числе и отечественных, для диагностики наиболее распространенных и социально значимых вирусных инфекций. Однако далеко не для всех групп вирусов имеются диагностические тест-системы. Например, из большой группы энтеровирусов (более 80 членов) только для определения вирусов полиомиелита имеются тест-системы, в то же время для диагностики вирусных гепатитов выпускается более 15 различных наборов.