

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С МЕТОДАМИ ИФА И ПЦР

Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова,
Казахстан

Достоверное и быстрое определение вирусных агентов является актуальной проблемой. Одним из опасных инфекционных возбудителей является вирус гепатита С, последствия воздействия которого хорошо известны. В настоящее время широко используются два метода лабораторного анализа: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА). Для сравнения этих видов исследований необходимо выявить преимущества и недостатки каждого из них.

Обнаружение вируса гепатита С методом ПЦР

Вирус гепатита С (ВГС) в крови в норме отсутствует. С помощью метода ПЦР возможно выявить наличие непосредственно РНК ВГС в крови как качественно, так и количественно. Определяемым фрагментом в обоих случаях служит консервативный участок генома гепатита С.

Обнаружение только антител к ВГС подтверждает лишь факт инфицирования пациента, но не позволяет судить об активности инфекционного процесса (о репликации вируса), о прогнозе заболевания. Кроме того, антитела к вирусу гепатита С обнаруживают как в крови больных острым и хроническим гепатитом, так и у тех пациентов, кто болел и выздоровел, а нередко антитела в крови появляются только спустя несколько месяцев после появления клинической картины заболевания, что затрудняет диагностику. Обнаружение вируса в крови методом ПЦР – более информативный метод диагностики [1].

Качественное выявление ВГС методом ПЦР в крови свидетельствует о виремии, позволяет судить о размножении вируса в организме и является одним из критериев эффективности противовирусной терапии.

Аналитическая чувствительность метода ПЦР составляет не менее 50-100 вирусных частиц в 5 мкл, прошедшей выделение ДНК-пробы, специфичность – 98%. Обнаружение РНК вируса гепатита С с помощью ПЦР на ранних этапах развития вирусной инфекции (возможно уже через 1-2 недели после заражения) на фоне полного отсутствия каких-либо серологических маркеров может служить самым ранним свидетельством инфицирования.

Однако изолированное выявление РНК вируса гепатита С на фоне полного отсутствия каких-либо других серологических маркеров не может полностью исключить ложноположительный результат ПЦР. В таких случаях требуется всесторонняя оценка клинических, биохимических и морфологических исследований и повторное неоднократное подтверждение наличия инфекции ПЦР [2].

Согласно рекомендациям ВОЗ для подтверждения диагноза вирусного гепатита С необходимо трехкратное выявление РНК этого вируса в крови пациента.

Обнаружение РНК вируса гепатита С методом ПЦР используется в целях:

- разрешения сомнительных результатов серологических исследований;
- дифференциация гепатита С от других форм гепатита;
- выявление острой стадии заболевания по сравнению с перенесенной инфекцией или контактом; определения стадии инфицированности новорожденных от серопозитивных по вирусу гепатита С матерей;
- контроля эффективности противовирусного лечения [3].

Количественный анализ вируса гепатита С методом ПЦР

Количественный метод определения содержания РНК вируса гепатита С в крови дает важную информацию об интенсивности развития заболевания, об эффективности лечения и о развитии резистентности к антивирусным препаратам. Аналитическая чувствительность метода составляет от 5.102 копий/мл вирусных частиц в сыворотке крови, специфичность – 98 %.

Уровень виремии оценивают следующим образом: при содержании РНК ВГС от 102 до 104 копий/мл – низкий; от 105 до 107 копий/мл – средний и выше 108 копий /мл – высокий.

Количественное определение содержания РНК ВГС в сыворотке крови методом ПЦР имеет важное значение для прогноза эффективности лечения интерфероном-альфа. Показано, что наиболее благоприятный прогноз заболевания и наибольшую вероятность положительного ответа на противовирусную терапию имеют лица с низким уровнем виремии. При эффективном лечении уровень виремии снижается.

Генотипирование вируса гепатита С Метод ПЦР позволяет не только выявить РНК ВГС в крови, но и установить его генотип. Наиболее важное значение для клинической практики имеют 5 субтипов ВГС – 1a, 1b, 2a, 2b и 3a. В нашей стране наиболее часто встречается субтип 1b, далее идут 3a, 1a, 2a.

Определение генотипа (субтипа) вируса имеет важное значение для прогноза течения ВГС и подбора пациентов с хроническим ВГС к проведению лечения интерфероном-альфа и рибавирином [4].

При инфицировании пациента субтипом 1b хронический ВГС развивается примерно в 90% случаев, при наличии субтипов 2a и 3a – в 33-50%. У пациентов с субтипом 1b заболевание протекает в более тяжелой форме и часто заканчивается развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. При инфицировании субтипом 3a у больных более выражен стеатоз, поражение желчевыводящих путей, активность АЛТ и менее выражены фиброзные изменения в печени, чем у пациентов с субтипом 1b.

Показаниями к лечению хронического ВГС интерфероном-альфа являются:

- повышение уровня трансаминаз;
- наличие РНК ВГС в крови;
- генотип 1 ВГС;
- высокий уровень виремии в крови;
- гистологические изменения в печени: фиброз, умеренные или выраженные воспалительные явления.

При лечении интерфероном-альфа больных вирусным гепатитом С с субтипом 1b эффективность терапии отмечается в среднем в 18% случаев, у инфицированных другими субтипами – в 55%. Использование комбинированной схемы лечения (интерферон-альфа + рибавирин) повышает эффективность терапии. Стойкий ответ наблюдается у 28% больных с субтипом 1b [5].

Определение вируса гепатита С методом ИФА

Как и анализ ПЦР, ИФА-методы широко применяются в современной лабораторной диагностике различных инфекций. Причем врач может назначить не только сделать ПЦР анализ, но и провести ИФА- диагностику для выявления определенной инфекции. С непрофессиональной точки зрения пациента подобный комплекс исследования вызывает много вопросов, поскольку все лабораторные методы исследования на первый взгляд кажутся абсолютно одинаковыми. Но, несмотря на внешнюю схожесть, разница между ПЦР, ИФА и другими иммунологическими исследованиями все же есть.

ИФА-анализ основан на выявлении не самой инфекции, а ее продуктов жизнедеятельности - белков-маркеров. ПЦР-анализ, напротив, выявляет существующие в настоящее время инфекционные агенты (бактерии, вирусы, грибы) [6].

Случается, что результаты ПЦР и ИФА-диагностики могут не совпадать. Обычно это происходит вследствие нескольких причин:

- «Иммунологический след» — «след» от уже перенесенной инфекции. В ответ на внедрение инфекции организм начинает вырабатывать антитела, в частности, антитела класса IgG. Эти антитела «улавливает» ИФА-анализ. Метод ПЦР реагирует только на наличие молекул ДНК инфекции в организме. В такой ситуации ПЦР-анализ дает отрицательный результат, а ИФА - положительный. Причем, в связи с индивидуальными особенностями иммунной системы положительный результат ИФА-диагностики, вызванный повышенным содержанием антител, может сохраняться несколько месяцев и даже лет после полного выздоровления.

- Разница в оборудовании для проведения диагностики. Получение положительного результата ИФА и ПЦР - отрицательного, может быть вызвано использованием особых тест-систем в ИФА-анализе, которые выявляют все виды бактерий, в том числе те, которые в определенном количестве в норме содержатся в организме человека. Тест-система, используемая в ПЦР-анализе, может быть основана только на определении особого вида болезнетворных бактерий. Например, тест-система для ИФА-диагностики настроена на выявление всех видов хламидий: *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae*. А в проведении ПЦР-анализа может быть использована тест-система, выявляющая только *S. trachomatis*. Вот почему, ИФА-анализ на *S. pneumoniae* будет положительным, а ПЦР – отрицательным [7].

- Разница в используемом материале. Материал для ПЦР получают из места предполагаемой локализации инфекции. Для ИФА-диагностики разницы в месте нет, поскольку ИФА «реагирует» на антитела, которые вырабатываются при инфекционном процессе любой локализации. Как результат - ПЦР-диагностика дает отрицательный, а ИФА - положительный результат.

Например, хламидии могут локализоваться в разных местах организма. Вызвав хронический сальпингит, проведенный в области шейки матки, анализ ПЦР хламидии не обнаружит. Но ИФА-диагностика все равно выявит выработку антител, сопровождающую инфекционный процесс.

•Хронические инфекционные заболевания могут стать причиной разницы в результатах ИФА и ПЦР-диагностики. При этом зачастую ПЦР дает положительный, а ИФА — отрицательный результат. Уставшая от хронического инфекционного процесса иммунная система может «не показать» повышенный уровень антител к инфекции. Подобное может наблюдать врач-лаборант в том случае, если инфекция «свежая», т. е. даже при наличии определенных симптомов уровень антител класса IgG в крови не превысит норму, поскольку они еще не начали вырабатываться. Для половых инфекций подобный период «молчания» ИФА-диагностики может достигать двух недель [8].

Подводя итоги, можно сказать, что и ИФА, и ПЦР-анализы сами по себе не являются панацеей в диагностике инфекций. Нельзя одной ПЦР или ИФА-диагностикой заменить все существующие методы исследования, ими можно лишь дополнить их, позволив всем методам достигнуть реальных, точных, достоверных результатов. Следовательно, каждый из этих методов необходимо применять в определенных условиях в зависимости от конкретной цели исследования.

Список литературы

1 Negro F., Pacchioni D., Shimizu Y., et al. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology // Proc Natl Acad Sci USA. – 1992. – Vol. 15. – Issue 89 (6). – P. 2247-2251.

2 Исаева О.В., Гущина А.Е., Малышев В.С. и др. Федеральная система внешнего контроля качества выявления HBsAg, анти-ВГС и РНК ВГС: 1996-2001 годы. Тезисы докладов IV Российской научно-практической конференции, "Гепатит В, С и D - проблемы диагностики, лечения и профилактики". - Москва, 2001, С. 151-153.

3 Yuasa T, Ishikawa G, Manabe S., et al. The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre // J Gen Virol. – 1991. – Vol. 72. – Issue 8. – P. 2021-2214.

4 Кузин С.Н., Лисицина Е.В., Самохвалов Е.И. и др. Распространение гепатита С и отдельных генотипов вируса гепатита С в регионе с умеренной активностью эпидемического процесса. // Вопросы вирусологии. – 1999. – N 2. - С. 79-82.

5 Huber K.R., Sebesta C., Bauer K. Detection of common hepatitis C virus subtypes with a third-generation enzyme immunoassay // Hepatology. – 1996. – Vol. 24. – P. 471-473.

6 Schroter M., Feucht H.H., Schafer P., et al. Definition of false-positive reactions in screening for hepatitis C virus antibodies // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – Issue 1. – P. 233-234.

7 Мукомолов С.Л., Колобов А.А., Плотникова В.А. с соавт. Использование метода серотипирования для определения генотипов вируса гепатита С, циркулирующих в Санкт-Петербурге // Тезисы международного Фальк симпозиума. – Спб., 1992. - С. 266.

8 Quiroga J.A., Campillo M.L., Catillo I., et al. IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C // Hepatology – 1991ю – Vol. 14. – Issue 1. – P. 38-43.

Репозиторий КарГУ