

ДП „Научно-технический центр иммунобиотехнологии
НТК „Институт монокристаллов”
Национальной академии наук Украины
Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний
им. Л.В.Громашевского
Академии медицинских наук Украины
Научно-производственная компания “Диапроф-Мед”

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА В

Практическое пособие

Киев-2004

УДК 616.36-002.2-078

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА В:
Практическое пособие

Под редакцией доктора медицинских наук

профессора Гураля А.Л.

Авторы:

А.Л.Гураль, В.Р.Шагинян, Т.А.Сергеева, Н.В.Иванская,

Е..С.Донская, Г.Е.Раевская, В.А.Шеховцов

Для врачей-лаборантов, эпидемиологов, вирусологов,
врачей-инфекционистов и врачей общетерапевтического
профиля, биологов, студентов высших учебных заведений и
аспирантов

Киев, „Диапроф-Мед”

Сокращения, использованные в тексте пособия:

- АГ – антиген;
 АТ – антитело;
 АлАТ – аланинаминотрансфераза;
 ВГВ – вирус гепатита В;
 ВГС – вирус гепатита С;
 ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;
 ГВ – гепатит В;
 ГЗ – граничное значение (показателя оптической плотности);
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
 ИФА – иммуноферментный анализ;
 К⁺ – положительная контрольная проба;
 К⁻ – отрицательная контрольная проба;
 КВД – кожно-венерологический диспансер;
 МКА – моноклональные антитела;
 МО – международная единица;
 НК – нейтрализующий компонент;
 ОГВ – острый гепатит В;
 ОФД – ортофенилендиамин (*o*-фенилендиамин);
 ОП – оптическая плотность;
 РНК – рибонуклеиновая кислота;
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 ХГВ – хронический гепатит В;
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центры США по проблемам контроля и предупреждения заболеваний;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ, ТИФА;
 HBcAg (core antigen of the hepatitis B virus) – сердцевинный (“коровый”) антиген вируса гепатита В;
 HBsAg (surface antigen of the hepatitis B virus) – поверхностный антиген вируса гепатита В;
 HBxAg – х-антиген вируса гепатита В;
 IgA, IgG, IgM – антитела классов А, G, и М,

соответственно;

USA FDA (USA Food and Drug Administration) –
Федеральное управление США по вопросам продовольствия и
лекарственных.

ВСТУПЛЕНИЕ

Гепатит В (ГВ) остается одной из самых распространенных инфекционных болезней и важной проблемой здравоохранения многих стран мира. По оценкам экспертов ВОЗ, во всем мире вирусом гепатита В (ВГВ) инфицировано свыше 2 млрд чел. Каждый год первично заражаются ВГВ свыше 50 млн чел., а 1,5-2,0 млн чел. умирают от заболеваний печени, вызванных этой инфекцией.

ГВ характеризуется не только широким распространением, высоким уровнем заболеваемости, нередко тяжелым течением, но и склонностью приводить к тяжелым поражениям печени. У 5-10 % и даже у 15 % больных ГВ, независимо от формы инфекционного процесса, острый гепатит переходит в хронический. Более того, у детей, родившихся от зараженных матерей, в том числе и матерей с острым ГВ (ОГВ) и женщин с персистентной HBs-антигемией, риск развития хронической инфекции может достигнуть даже 90 %. Трудности в борьбе с ГВ в значительной мере определяются существованием хронических носителей вируса, число которых в мире достигает 350 млн чел. При этом углубленное обследование таких лиц доказывает, что у большинства из них присутствуют признаки хронического ГВ (ХГВ). В свою очередь, ХГВ может иметь прогностически неблагоприятное течение и приводить у 1/3-1/4 зараженных лиц к развитию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Примерно 80 % первичных злокачественных заболеваний печени связывают с ВГВ.

Этиология

Первые сведения о возбудителе гепатита В получил в 1965 г. B.S. Blumberg. В 1970 г. D. Dane и сотрудники впервые описали полные вирионы ВГВ, названные частицами Дейна, а в 1971 г. J. Almeida с сотрудниками изучили структуру вируса. ВГВ принадлежит к семейству *Hepadnaviridae*, т.е. вирусом, поражающим печень, которые содержат ДНК. ДНК ВГВ представляет собой кольцевую молекулу, которая состоит из двух цепей, одна из которых, плюс-цепь, короче, чем вторая

(минус-цепь). Плюс-цепь постоянно достраивается при помощи фермента ДНК-полимеразы. Вирионы с построенной молекулой ДНК полновценны, способны к размножению и поэтому инфекционны. Вирионы с недостроенной ДНК не способны к размножению. Особенности репродукции ВГВ обуславливают вероятность ошибок синтеза ДНК, многовариантность и гетерогенность вируса. Разные штаммы ВГВ можно выделить не только от разных лиц, но даже от одного и того же больного.

Диаметр вириона – 42-45 нм. Структура частицы ВГВ схематически представлена на рисунке 1.

Рис. 1 Структура вируса гепатита В

В сердцевине (core) вируса расположены вирусные белки, важные для размножения ВГВ. Это внутренний, или сердцевинный антиген – НВсAg и близкий к нему НВеAg. В сердцевине вирусу присутствует еще один антиген, названный НВхAg. Внешнюю оболочку вируса образует поверхностный антиген – НВsAg, названный сначала австралийским, потому что он был впервые выделен из крови аборигенов Австралии. Содержание НВsAg в крови колеблется в очень широких пределах – от концентраций, обнаруживаемых только очень чувствительными методами индикации (0,05-1 нг/мл), до уровня порядка 500 мкг/мл. При хронических формах ГВ, сопровождающихся встройкой генома ВГВ в геном гепатоцитов, возможен избыточный синтез НВsAg. На основе антигенных характеристик выделяют 4 основных субтипа НВsAg: adw, adr, auw, ауt.

Дополнительные поверхностные антигены, важные для взаимодействия ВГВ с клетками печени – это белки рге-S₁ и рге-S₂. ВГВ очень устойчив против физических воздействий (таблица 1).

Таблица 1. Воздействие физико-химических факторов на инфекционную активность ВГВ

Факторы	Инфекционная активность
Температура 30-32 °С	Сохраняется в течение 6 мес.
Висушивание при 25 °С	Сохраняется в течение 1 нед.
Прогревание при 60 °С	Полная инаktivация ВГВ через 10 ч.
Температура 98 °С	Частичная инаktivация через 1 мин. . Полная инаktivация через 20 мин.
Температура 160 °С (сухой жар)	Полная инаktivация через 1 ч.
Автоклавирование (121 °С, 1 атм.)	Полная инаktivация в течение 30 мин.
Значение рН 2,4	Инфекционность утрачивается в течение 6 ч.
Хлорамин (3-5 %)	Полная инаktivация через 2 ч.
Формалин (0,1 %)	Полная инаktivация
Рентгеновское облучение (5 МР)	Полная инаktivация
Уль-трафиолетовое облучение + бета-пропиолактон	Уменьшение инфекционности в 10 млн раз

Патогенез

Парентеральный механизм передачи ВГВ обеспечивает первичное проникновение возбудителя в кровь. Вирус переносится зараженными лимфоцитами и мононуклеарами. Основные клетки-мишени при ГВ – гепатоциты. Разрушительное воздействие ВГВ на гепатоциты опосредовано иммунной системой. Сложные взаимодействия инфекционного процесса и иммунного ответа в различных условиях обуславливают разнообразие клинического течения ГВ – от бессимптомного носительства до тяжелых фульминантных форм. В основе патоморфологических изменений, которые развиваются в печени при ГВ, как и при других вирусных

гепатитах, лежит цитолиз гепацитов, вызванный прямым воздействием вируса, иммунный цитолиз как следствие разрушения клеток, содержащих HBcAg и HBsAg, и зависящее от антител разрушение клеток печени, несущих на своей поверхности комплексы антиген-антитело, под влиянием Т-лимфоцитов.

Отличительная черта инфекционного процесса при ГВ – широкие колебания способности вируса к размножению, что свидетельствует о генетической неоднородности ВГВ. Мутации ВГВ происходят в области pre-S-S и в области pre-Cog/Cog вирусного генома. Мутантный вирусный штамм Pre-S с измененной структурой оболочечных антигенов недоступен для антител против HBsAg, образующихся в результате вакцинации. При заражении этим вирусом регистрируются преимущественно хронические формы ГВ. Мутации в области pre-Cog/Cog приводят к прекращению синтеза HBeAg. При этом в сыворотке крови обнаруживаются антитела против HBeAg и вирусная ДНК; это свидетельствует об активной репликации вируса и большой опасности для лиц, окружающих больного.

При длительном переживании вируса в гепацитах происходит интеграция его генетического аппарата в геном клетки. Вирус становится недоступен для иммунного контроля; это основной механизм становления хронической инфекции, вызванной ВГВ. Различают три фазы этого хронического процесса:

1. Становления иммунной толерантности – происходит активное размножение вируса и синтез его антигенов. В печеночной ткани можно увидеть картину неактивного (персистентного) ВГВ.
2. Иммунная элиминация, или сероконверсия – происходит исчезновение HBeAg, нарастание активности аминотрансфераз; в печени идет активный процесс воспаления.
3. Интеграция – вирусия уменьшается, в сыворотке крови присутствуют антитела против HBeAg, происходит интеграция ДНК вируса в геном гепацитов. гепациты

содержащие интегрированную ДНК ВГВ, синтезируют HBsAg.

Только этих три фазы заболевания отмечаются у больных, зараженных "диким" штаммом вируса. При заражении мутантным HBeAg-негативным штаммом может развиваться и 4-а фаза – возобновление репродукции ВГВ и иммунологически опосредованное поражение печени. Эта фаза характеризуется нарастанием уровня ДНК ВГВ, активности АлАТ, высокими титрами антител против HBeAg.

Эпидемиология ГВ

Гепатит В – кровяная инфекция с парентеральным механизмом передачи возбудителя.

Основные источники инфекции, способствующие широкому ее распространению – это больные с хроническими формами ГВ. Важная роль среди них принадлежит носителям HBeAg. Способность ВГВ в течение длительного времени, а то и пожизненно переживать в организме человека – это экологически обусловленная форма его существования.

При ВГВ большой заразен, начиная с последних недель инкубационного периода и до полного освобождения организма от вируса в период выздоровления. При хронических формах длительность эпидемически опасного периода не ограничена.

Возможные источники и одновременно группы риска при инфекции ГВ – это:

- Доноры и реципиенты крови, ее препаратов, спермы, органов;
- Наркоманы, которые вводят наркотики в вену;
- Медицинские работники, которые профессионально сталкиваются с кровью и другими биосубстратами больных;
- Персонал и больные отделений гемодиализа, гематологии, реанимации, онкологических и туберкулезных стационаров;

- Персонал и больные отделений хирургического профиля;
- Больные хроническими заболеваниями печени и желчевыводящих путей;
- Пациенты с длительными и/или частыми курсами инъекционной терапии;
- Гомосексуалисты;
- Лица, часто меняющие половых партнеров при незащищенных сексуальных контактах;
- Дети, рожденные зараженными матерями;
- Персонал и больные отделений в учреждениях для умственно отсталых лиц, домов ребенка;
- ВИЧ-инфицированные;
- Лица, прибывшие из регионов, эндемичных по гепатиту В.

Основной фактор передачи при ГВ – кровь. Вирус можно обнаружить и в других биологических жидкостях – сперме выделениях из влагалища, асцитической жидкости, изредка в слюне и грудном молоке, но в концентрациях, более низких, чем в крови. Заражение ГВ возможно при инокуляции очень малых объемов крови – 0,0005 мл. Доза крови, необходимая для заражения ВГВ, в 100 раз ниже, чем, например, при ВИЛ-инфекции. Длительное сохранение вируса на объектах внешней среды расширяет возможности передачи возбудителя. К таким объектам относят инструменты для бритья и маникюра, гребенки, зубные щетки, ножницы, мочалки и другие зараженные предметы, попадающие в общее пользование.

Пути передачи. ВГВ передается парентерально в природных и искусственных условиях. Природные пути передачи – половой, перинатальный и горизонтальный (в результате бытовых контактов). К искусственным путям заражения относят парентеральные медицинские и немедицинские вмешательства – лечебно-диагностические, профилактические и оперативные манипуляции, внутривенное введение наркотиков.

Наиболее полно изучены искусственные пути передачи в результате лечебных парентеральных манипуляций. По данным

И.А.Храпуновой с соавторами (2003 г.), важнейшие факторы заражения парентеральными вирусными гепатитами в стационарах – это инъекции (27,2 %), оперативные вмешательства (23,7 %), взятие крови из вены (26,1 %). Риск заражения при переливаниях крови составляет 5,3-7,7 %. Внедрение и осуществление комплекса мероприятий, направленных на предупреждение искусственного парентерального заражения при лечебных манипуляциях, привело к снижению их роли в заражении ВГВ. Однако в последнее время возрастает эпидемическая значимость передачи возбудителя при инъекционном введении наркотиков и заражения половым путем. Частота перинатальной передачи ВГВ колеблется от 10 до 90 % и зависит от активности инфекционного процесса у матери.

Распространенность ВГВ в мире неравномерна, что позволяет выделить регионы с высокой, промежуточной и низкой эндемичностью. Частота выявления серологических маркеров ВГВ в регионах с высокой эндемичностью составляет 70-95 % (8-20 % вирусносителей), с промежуточной – 20-55 % (2-7 % вирусносителей), с низкой – 4-6 % (2 % вирусносителей). Значимость тех или иных путей передачи также изменяется в зависимости от региона. В регионах с высокой эндемичностью преобладают перинатальная и горизонтальная передача ВГВ, тогда как в регионах с низким уровнем эндемичности основной путь передачи – половой.

Украина относится к регионам с промежуточной эндемичностью ВГВ. Показатели заболеваемости ВГВ в Украине с 1970 г. (начало официальной регистрации) до 1989 г. выросли в 4,6 раза – с 6,8 до 31,5 на 100 тыс. населения. Решающим фактором, который способствовал возрастанию заболеваемости ВГВ в этот период, был искусственный парентеральный путь передачи вируса при проведении лечебных манипуляций. В 1990 г. заболеваемость ВГВ оставалась высокой (29,6 на 100 тыс. населения), а в последующие 6 лет (1991-1996) уровень ее несколько упал – в среднем до 24,6 на 100 тыс. населения. В 1997-2003 гг. вновь наметилась тенденция к снижению заболеваемости, но уровень ее оставался достаточно высоким

(среднегодовой показатель – 18,5 на 100 тыс. населения). Следовательно, эпидемическое неблагополучие в стране продолжается..

Произошли, вместе с тем, изменения в структуре путей передачи ВГВ. В Киеве, например, удельный вес больных, заразившихся при парентальном введении лекарственных препаратов, снизился с 52,1 % в 1989 г. и 27,3 % в 1995 г. до 11,2 % в 2002 г. Вместе с тем возросло количество больных, заразившихся половым путем (с 13,3 % в 1995 г. до 36,2 % в 2002 г.) и при инъекционном введении наркотиков (с 11,6 % в 1993 г. до 33,2 % в 2000 г. и 28,7 % в 2002 г.). В последние годы (1996-2002) среди больных ГВ преобладают лица в возрасте 15-29 лет (их свыше 70 %).

По современным представлениям, результаты сероэпидемиологических исследований, направленных на обнаружение в пробах крови специфических маркеров заражения, можно рассматривать как критерий распространения инфекции среди отдельных групп населения, на определенной территории, а также в популяции в целом. Исследования, проведенные в Институте эпидемиологии и инфекционных болезней им.Л.В.Громашевского Академии медицинских наук Украины, дали возможность установить, что самые высокие уровни маркеров заражения ВГВ (HBsAg и антител против HBcAg) характерны для инъекционных наркоманов (15,0 % и 55,9 %, соответственно), ВИЧ-инфицированных лиц (10,2 % и 49,5 %, соответственно), пациентов кожно-венерологического диспансера (КВД) (6,5 % и 36,8 %, соответственно). До сих пор очень высока вероятность внутрибольничного заражения. Серологические маркеры заражения (HBsAg, антитела против HBcAg), позволяющие объективно оценить интенсивность эпидемического процесса, обнаружены, соответственно, 4,2 % и 24,4 % пациентов специализированных отделений больниц (с КВД включительно) и у 5,4 % и 26,8 % медицинских работников. В то же время в сыворотках крови безоплатных доноров, взятых для сравнения, HBsAg найден в 1,4 %, а антитела проти HBcAg – у 13,9 % случаев.

Анализ заболеваемости ГВ в Украине и результаты сероэпидемиологических исследований доказывают, что основной фактор, который способствует распространению этой инфекции в современных условиях – внутривенное введение наркотиков. До сих пор не исчезла возможность внутрибольничного распространения ГВ среди пациентов и персонала лечебных учреждений разного профиля. Возрастает значение природных путей заражения ВГВ – перинаatalного и полового.

Специфическая диагностика ГВ

Специфическая диагностика ГВ основана на обнаружении антигенов вируса или соответствующих антител, вырабатываемых в зараженном организме. Каждый маркер сам по себе или в сочетании с другими показателями заражения ВГВ может быть важным диагностическим и прогностическим критерием, свидетельствовать об эффективности проведенного лечения, о перенесенной инфекции или становлении иммунного ответа.

HBsAg при остром ГВ может быть найден в сыворотке крови в последние 1-2 недели инкубационного периода и в течение 4-6 недель клинического периода. Позже у большинства больных *HBsAg* связывается с соответствующими антителами и образует иммунные комплексы, а потому не обнаруживается в свободном состоянии. Нахождение *HBsAg* в сыворотке крови позже чем через 6 месяцев после начала заболевания – это прогностически неблагоприятный признак, свидетельствующий о возможной хронизации процесса. Количественное или полуколичественное определение концентрации *HBsAg* в сыворотке крови в ходе заболевания может помочь в прогнозе течения ОГВ. Низкие концентрации *HBsAg* в начальный период заболевания – это благоприятный прогностический признак. Высокое содержание *HBsAg* при ОГВ указывает на активное размножение вируса. В то же время при хроническом ГВ (ХГВ) высокий уровень *HBsAg* может говорить только об активном его

синтезе в гепатоцитах, когда размножения самого вируса не происходит. Отсутствие HBsAg в сыворотке крови не обязательно свидетельствует об избавлении организма от вируса и о полном выздоровлении. При прогрессивном течении ВГВ концентрация HBsAg может падать до показателей, не определяемых даже самыми чувствительными методами. Однако при этом у больных можно обнаружить вирусную ДНК.

HBcAg, белок с очень высокой иммуногенностью, можно обнаружить только в биоптатах печени в ядрах гепатоцитов; в крови несвязанный HBcAg не выявляется.

HBeAg при ОГВ обнаруживается в крови на ранних этапах инфекционного процесса и, как правило, он исчезает из крови в тот период, когда там еще есть HBsAg. HBeAg – это маркер активного размножения вируса; он имеет и клиническое, и эпидемиологическое значения. Опасность заражения кровью, содержащей HBeAg, на много порядков (в 10^6 раз) превышает опасность инфицирования после сероконверсии HBeAg → анти-HBeAg. При циклическом течении ОГВ такая сероконверсия происходит в течение 6-8 недель. Обнаружение HBeAg в течение более полугода после начала заболевания следует расценивать как неблагоприятный прогноз. Следует помнить, что HBeAg присутствует только у так называемого «дикого» штамма ВГВ. При заражении человека мутантами этого штамма HBeAg в сыворотке крови отсутствует при значительном размножении вируса и активном течении инфекционного процесса.

Анти-HBs у больных с ОГВ обнаруживается в крови через длительное время после исчезновения HBsAg. Период «окна» длится от трех месяцев до года. При хроническом течении ГВ у части больных антитела против HBsAg могут обнаруживаться одновременно с этим антигеном. Они важны для оценки клинического течения инфекционного процесса при ГВ. Нахождение этих антител, особенно при наличии также антител против HBeAg – это надежный критерий развития

постинфекционного иммунитета. Определение титра антител против HBsAg служит наиболее информативным тестом для оценки эффективности вакцинации против ГВ.

Анти-НВс – это самый ранний антительный маркер при заражении ВГВ; его можно обнаружить во время инкубационного периода, еще до повышения активности АЛАТ. Анти-НВс класса IgM важны в диагностическом отношении и указывают на активность инфекционного процесса. Во время так называемого «окна» – после исчезновения HBsAg и до появления антител против него – антитела против HBcAg остаются единственным маркером инфекции ВГВ. АнтиНВс класса IgM циркулируют в крови в течение 4-8 недель, а затем, после завершения инфекционного процесса, исчезают. В дальнейшем (практически пожизненно) у всех лиц, зараженных ВГВ, в крови можно обнаружить антитела против HBcAg класса IgG. Лиц, у которых находят только анти-НВс, следует считать возможными источниками инфекции: у 4-40 % из них в сыворотке крови находят вирусную ДНК. Антитела против HBcAg обнаруживаются при отсутствии иных серологических маркеров ГВ; их называют «обособленными анти-НВс». Их часто находят у ВИЧ-инфицированных (у 33,1 %), у лиц с антителами против вируса гепатита С (ВГС) (9,3 %), при совместной инфекции ВГС и ВИЧ (5,3 %). Возможное объяснение такого явления – угнетение экспрессии HBsAg другими вирусами или вследствие мутации в «а»-детерминанте ВГВ, ответственной за синтез HBsAg. В таблице 2 приведены данные, касающиеся клинической интерпретации результатов серологического обследования на маркеры ГВ.

Таблица 2. Истолкование результатов обнаружения серологических маркеров при различных формах гепатита В

Серологические маркеры					Интерпретация результатов
HBs Ag	анти HBc -IgM	анти HBc -IgG	анти HBs	анти HBs	
Острый гепатит В					
+	+	-	-	-	Конец инкубационного периода, начало заболевания
+/-	+	+	-	-	Разгар заболевания
-/+	+	+	+/-	-	Разгар заболевания, начало выздоровления
-	-/+	+	+	+/-	Выздоровление
Хронический гепатит В					
+/-	-	+	-/+	-	Интегративная фаза
+	-/+	+	-	-	Репликативная фаза
-	-	+	-	+/-	Инфекция, перенесенная в прошлом (годы тому)
-	-	-	-	+	Послевакцинальный иммунитет

На рисунках 3 и 4 представлены¹ основные серологические профили (динамика обнаружения серологических маркеров) у больных с ОГВ и ХГВ.

¹ Обратите внимание на номера рисунков. Видимо, тут не стоит давать карту Украины, поэтому сместится нумерация рисунков.

Профилактика ГВ

Наиболее перспективная и социально оправданная стратегия борьбы с ВГВ – это внедрение программ вакцинопрофилактики. Применение вакцин приводит к возникновению защитного иммунитета у 90-98 % привитых лиц. Чтобы определить наличие послевакцинального иммунитета и при необходимости провести подлѣстывающую (бустерную) иммунизацию, рекомендуют определять уровень антител против HBsAg в сыворотках крови (таблица 3).

Таблица 3. Определение антител после вакцинации против гепатита В

Титр антител против HBsAg (МО/л)	Показания к бустер-вакцинации
< 10	Иммунитета нет. Необходима вакцинация.
10 – 100	Необходимо провести вакцинацию не позже, чем через год
> 1. 000	Иммунизация через 2–3 года.
> 10.000	Иммунизация через 3 – 6 лет.

Научно-производственная компания „Диапроф-Мед” серийно выпускает следующие тест-системы для диагностики гепатита В:

"DIA-HBV" – тест-система иммуноферментная для обнаружения поверхностного антигена (HBsAg) ВГВ в сыворотках или плазме крови человека;

"DIA-C-HBV" – тест-система иммуноферментная для подтверждения наличия поверхностного антигена (HBsAg) ВГВ в образцах сывороток и плазмы крови человека после первичного скрининга методом иммуноферментного анализа;

"DIA-HBscore" – тест-система иммуноферментная для обнаружения антител классов IgG и IgM против сердцевинного

антигена ВГВ.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

В течение последних лет иммуноферментный анализ (ИФА) стал одним из самых распространенных методов серологических исследований. Благодаря успехам биотехнологии и генетической инженерии удается получать высокоочищенные белки-антигены, разнообразные поли- и моноклональные антитела заданной специфичности и аффинности, ферменты-маркеры и конъюгаты ферментов с антигенами та антителами.

Весь процесс проведения ИФА можно разделить на три основных стадии: формирования специфического комплекса антиген-антитело (иммунохимический процесс), введение в него (присоединение к нему) метки и ее обнаружение (визуализация).

ИФА ныне широко используется благодаря ряду безусловных преимуществ. К ним относят высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов, возможность использования минимальных объемов исследуемых образцов биологических жидкостей, доступность и стабильность реагентов, простоту и скорость проведения реакции, инструментальный учет полученных результатов и автоматизацию почти всех этапов анализа, возможность проведения массовых обследований и, не в последнюю очередь, относительно низкую стоимость диагностических наборов. Следует указать, что хотя существует несколько вариантов ИФА (прямой, непрямой, конкурентный, "сандвич"), во всех их используют конъюгат фермента со специфическими или противовидовыми антителами или антигенами и проявитель (смесь субстрата с хромогеном); в результате ферментативной реакции с субстратом реакционная смесь окрашивается при помощи хромогена. Это дает возможность визуально или автоматически оценить наличие антигенов или антител в исследуемом материале.

Терминология

Антиген (“иммуноген”) – это вещество, вызывающее возникновение специфического иммунного ответа и специфически реагирующее с антителами, которые возникают при введении этого антигена в организм.

Антитело – сложное природное соединение (гликозилированный полипептид), которое возникает как результат иммунного ответа организма при введении в организм или попадании в него чужеродных веществ, а также возбудителей инфекционных заболеваний, различных паразитов и т.д.

Конъюгат – искусственная молекула, которая состоит по крайней мере из двух химически объединенных компонентов, часто разного происхождения. Для проведения ИФА обычно используют конъюгаты, которые содержат ферментную (или иную) метку, пришитую к антигену (антигенам), антителам или белку *A Staphylococcus aureus*.

Проявитель – смесь ферментного субстрата с хромогеном, которая служит для выявления (проявления) иммуноферментной реакции. В результате ферментативной реакции с субстратом образуется продукт, и тогда хромогена превращает этот продукт в окрашенное соединение.

Оборудование и аппаратура, необходимые для работы с тест-системами на основе ИФА

Лаборатории, где проводят ИФА, должны быть укомплектованы таким оборудованием:

- термостатом, поддерживающим температуру 37 °С;
- холодильником с морозильной камерой;
- дистиллятором лабораторным для получения дистиллированной воды;
- промывалкой для планшетов (вошером);
- спектрофотометром многоканальным (ридером);
- центрифугой для приготовления образцов;

- набором автоматических пипеток (микродозаторов), в который входят одноканальные пипетки переменного объема, рассчитанные на дозирование 5-40, 40-200 и 200-1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки переменного объема на 5-50 та 50-200 мкл и наконечниками для дозаторов;

Добавочные реактивы, материалы и оборудование

- вода дистиллированная;
- перекись водорода, 6 %;
- спирт этиловый, 70°;
- вага гигроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- пипетки одноканальные (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) и наконечники к ним;
- пипетки 8-канальные (50-300 мкл) и наконечники к ним;
- мерная склянка или цилиндр (1000 мл);
- ванночки для реактивов;
- флаконы для реактивов (20 мл);
- суховоздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывания планшетов (вошер);
- фотометр для измерения оптической плотности в лунках планшета;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива отработанных загрязненных жидкостей.

Необходимые предостережения

Меры безопасности при использовании набора:

- работу проводить в специально оборудованном помещении;
- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворов ртом;
- все использованные растворы обрабатывать 6 % раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы собирать в специальный контейнер, стерилизовать его в автоклаве в течение 1 ч при

температуре 120 °С;

- инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности протирать 70° этиловым спиртом.

Правила работы с иммуноферментными тест-системами:

- не использовать набор после окончания срока годности, не смешивать компоненты наборов разных серий;
- тщательно перемешивать реагенты при подготовке и проведении анализа;
- использовать для приготовления реагентов чисто вымытую посуду, ополоснутую дистиллированной водой;
- не допускать подсыхания лунок на всех этапах постановки ИФА;
- проверять точность дозирования, следить за рабочим состоянием пипеток и другого оборудования;
- избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность во время проведения анализа.

Требования к промыванию планшетов:

- некачественное промывание планшета приводит к некорректным результатам;
- для промывания планшета рекомендуют использовать автоматическую промывалку – вошер; при отсутствии или плохой работе вошера лунки можно промывать при помощи 8-канальной пипетки;
- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение лунок и полное удаление жидкости из них: лунки должны заполняться доверху (350 мкл промывной жидкости на лунку), без переполнения лунок и перетекания жидкости из соседних лунок.

Подготовка образцов

Образцы сывороток сохраняют температуре 2-8 °С в течение

72 ч. Допускается замораживание образцов (желательно до температуры ниже 20 °С) не более чем дважды. Образцы

сывороток, содержащие агрегаты и осадок, необходимо осветлить при помощи центрифугирования.

Образцы, где заметны гемолиз, гиперлипидемия или бактериальное загрязнение (проросты), а также образцы, куда добавлен как консервант азид натрия, не годятся для анализа.

Методика работы с тест-системой иммуноферментной "DIA-HBV"

Общая характеристика

Тест-система "DIA-HBV" представляет собой набор, включающий следующие компоненты: иммуносорбент – полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы моноклональными антителами (МКА) против HBsAg; конъюгат – МКА против HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена; положительный контроль – инактивированная сыворотка крови человека, содержащая HBsAg ВГВ; отрицательный контроль – сыворотка крови человека, не содержащая поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) и антител против ВИЧ, ВГС, возбудителя сифилиса Tетрoпeтa pallidum; хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин); концентрат фосфатного буфера для промывания планшетов; раствор для разведения конъюгата; раствор для приготовления проявителя и стоп-реагент.

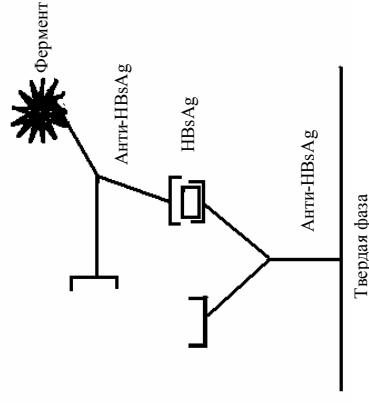
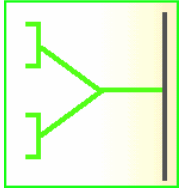
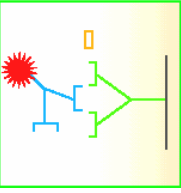
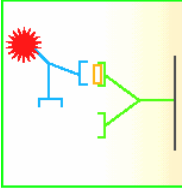
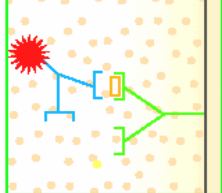


Рис. 5. Принцип проведения иммуноферментного анализа

При внесении в лунки планшета образцов сывороток инфицированной крови HBsAg связывается со специфическими антителами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-

антигелю. Образовавшиеся комплексы обнаруживают при помощи специфичного к HBsAg иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки вносят раствор проявителя – смесь субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазную реакцию прекращают, добавив стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках; при длине волны 450 нм ОП пропорциональна концентрации HBsAg в образцах сывороток или плазмы крови.

Схема 1 Проведения ИФА на тест-системе “DIA-HBV”
Этапы проведения анализа

Процедура	Формирование комплекса
<p>Полистироловые стрипы, сенсibiliзированные МКА против HBsAg.</p>	
<p>Внесение в лунки по 100 мкл образцов контролей и сывороток. Внесение в лунки по 50 мкл раствора конъюгата.</p>	
<p>Инкубация в течение 120 мин при 37 °С (формирование комплекса АГ-АТ с конъюгатом). Промывание 6 раз буферным раствором.</p>	
<p>Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (смеси перекиси водорода и хромогена). Инкубация 30 мин при комнатной температуре (окрашивание). Остановка реакции добавлением стоп-реагента.. Регистрация оптической плотности.</p>	

Форма выпуска наборов

Набор Ф2-монолит – монолитный планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на проведение двух постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

Набор Ф6-стрип – стриповый планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на проведение 6 постановок ИФА: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки);

Набор Ф12-стрип – стриповый планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на 12 постановок ИФА: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок);

Набор Т2-монолит – монолитный планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на проведения двух постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

Набор Т12-стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 12 постановок ИФА: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок). Набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроли).

Характеристика показателей качества тест-системы «DIA-HBV»

Чувствительность тест-системы «DIA-HBV»

Определение чувствительности тест-системы «DIA-HBV» проводили путем тестирования образцов сывороток больных хроническим гепатитом В, а также на панелях и стандартных препаратах с определенной концентрацией HBsAg.

Границу чувствительности определяли с использованием панелей и стандартных образцов HBsAg производства Boston Biomedica Inc. (США) и Агентства по контролю безопасности лекарственных препаратов (AFSSAPS, Франция).

Таблица 4. Определение чувствительности тест-системы «DIA- HBV» на панелях сывороток и стандартных образцах HBsAg

Панель или стандарт	Чувствительность «DIA-HBV»	
	хромоген ОФД	хромоген ТМБ
AFSSAPS, набор образцов HBsAg, субтипы adw2 и ayw3	0,3 нг/мл	0,2 нг/мл
РНА 806 (ВВ1), панель образцов HBsAg, субтип ad	0,3 нг/мл	0,2 нг/мл
РНА 806 (ВВ1), панель образцов HBsAg, субтип ay	0,3 нг/мл	0,2 нг/мл

Согласно полученным результатам, чувствительность тест-набора «DIA-HBV» лежит в пределах 0,2-0,3 нг/мл при использовании разных стандартов HBsAg субтипов *ad* и *ay*. При исследовании 212 образцов сывороток от больных ХГВ не было обнаружено ложноположительных результатов.

Специфичность тест-системы «DIA-HBV»

Определение специфичности тест-системы «DIA-HBV» проводили с использованием рандомизированной выборки образцов донорской крови, а также на образцах сывороток, полученных от беременных женщин и от больных различными инфекционными заболеваниями (цитомегаловирусная инфекция, герпетическая инфекция, туберкулез, краснуха, сифилис и гепатиты иной этиологии).

Специфичность «DIA-HBV» при анализе 8.869 рандомизированных образцов донорской крови составила 99,2 %. Исследования проб сывороток крови от других названных выше групп больных не обнаружили значительной

перекрестной реактивности (она не превышала 1,3 % ложноположительных результатов).

Основные особенности и преимущества тест-системы «DIA-HBV»

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоаффинных и специфичных МКА в составе иммуносорбента и иммуноферментного конъюгата.
- Систему легко приспособить к условиям повседневных серологических исследований.
- Использование общепринятых методов стандартизации при учете результатов.
- Длительность анализа – 2, 5 ч.
- Один набор рассчитан на проведение 192 анализов.
- Имеются разные варианты комплектации наборов по выбору потребителя – стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.
- Срок годности 12 мес.

Методика работы с тест-системой иммуноферментной "DIA-C-HBV"

"DIA-C-HBV" - тест-система иммуноферментная для подтверждения присутствия поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) в образцах сывороток и плазмы крови человека после первичного скрининга методом ИФА.

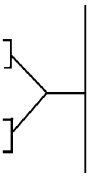
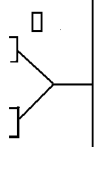
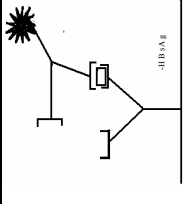
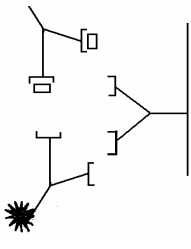
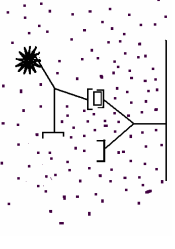
Принцип анализа

Главные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент – это полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы МКА против HBsAg. Иммуноферментный конъюгат представляет собой МКА против HBsAg, конъюгированные с пероксидазой хрена. Нейтрализующий компонент (НК) системы – это МКА против HBsAg.

При внесении в лунки планшета проб сывороток зараженной крови присутствующий там HBsAg связывается со специфическими антителами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Эти комплексы обнаруживают при помощи иммуноферментного конъюгата, специфичного к HBsAg. После отмывания несвязавшихся молекул в лунки добавляют раствор проявителя – смесь субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, добавив стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках; при длине волны 450 нм ОП пропорциональна концентрации HBsAg в образцах сывороток или плазмы крови.

Метод подтверждения результатов скринингового анализа на наличие HBsAg основан на принципе блокирования поверхностного антигена ВГВ в образцах сывороток под действием НК (МКА против HBsAg). При внесении НК в реакционную смесь присутствующие в ней антитела тормозят образование комплекса АГ-АТ на твердой фазе из-за связывания антигенных детерминант HBsAg с МКА, присутствующих в НК; это приводит к снижению ОП окрашенного раствора в лунках (схема 2).

Схема 2 Проведение ИФА на тест-системе “DIA-C-НСУ”

Процедура	Комплекс
Полистироловые стрипы, сенсibilизированные рекомбинантными антигенами.	
Внесение в лунки по 100 мкл контролей и образцов сывороток.	
<p>Внесение в лунки по 50 мкл раствора конъюгата. Инкубация в течение 120 мин. при 37 °С (образование комплекса АГ-АТ с конъюгатом).</p>	<p>парные ряды</p> 
<p>Внесение в лунки по 50 мкл раствора конъюгата з НК. Инкубация в течение 120 мин. при 37 °С (образование комплекса АГ-АТ с НК в растворе).</p>	<p>непарные ряды</p> 
<p>Промывание лунок 6 раз буфером. Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя. Инкубация 30 мин. (окрашивание). Остановка реакции стоп-реагентом. Регистрация оптической плотности.</p>	<p>парные ряды</p> 
	<p>непарные ряды</p>



Форма выпуска наборов

- набор Ф6-стрип – стриповый планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на 6 постановок ИФА: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки);
- набор Т6-стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 6 постановок ИФА: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки).

Набор предназначен для проведения 96 анализов.

Основные особенности и преимущества тест-системы «DIA-C-HBV»

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоаффинных и специфичных МКА в составе иммуносорбента, нейтрализующего компонента и иммуноферментного конъюгата.
- Одновременная инкубация сывороток и конъюгата.
- Систему легко приспособить к условиям повседневных серологических исследований.
- Использование общепринятых методов стандартизации при учете результатов.
- Длительность анализа – 2, 5 ч.
- Один набор рассчитан на проведение 96 анализов.
- Имеются разные варианты комплекции наборов по выбору потребителя – стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.
- Срок годности 12 мес.

Методика работы с тест-системой иммуноферментной "DIA-HVscore"

"DIA-HVscore" – тест-система иммуноферментная для выявления антител классов IgG и IgM против сердцевинного («корового») антигена ВГВ.

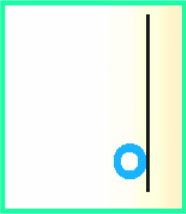
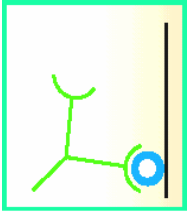
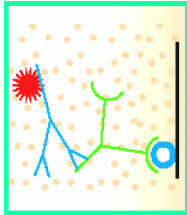
Набор предназначен для первичного анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител против сердцевинного антигена ВГВ методом ИФА.

Принцип анализа

Главные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент представляет собой полистироловый планшет, лунки которого сенсibilизированы рекомбинантными полипептидами-аналогами сердцевинного антигена ВГВ. Конъюгат – это смесь МКА против иммуноглобулинов классов G и M человека, пришитых к пероксидазе хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела IgG и IgM, специфичные к сердцевинному антигену HVscore, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Эти комплексы обнаруживаются при помощи специфического иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязавшихся компонентов в лунки вносят раствор проявителя – смеси субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазную реакцию прекращают, добавив стоп-реагент (2 M раствор серной кислоты), и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках; при длине волны 450 нм ОП пропорциональна концентрации специфических антител в образцах сывороток или плазмы крови.

Схема 3. Проведение ИФА на тест-системе “DIA-НВscore”
Этапы анализа

Процедура	Формирование комплекса
<p>Полистироловые планшеты, сенсibilизированные рекомбинантными белками-аналогами НВscore.</p>	
<p>Внесение в лунки стрипов раствора для розведения образцов и по 20 мкл контрольных образцов и исследуемых сывороток. Инкубация 60 мин. при 37 °С – формирование комплекса АГ-АТ.</p> <p>Промывание лунок буферным раствором 4 раза.</p>	
<p>Внесение в лунки раствора конъюгата. Инкубация 30 мин. при 37 °С – формирование комплекса 3 конъюгатом.</p> <p>Промывание лунок буферным раствором 6 раз.</p>	
<p>Внесение в лунки раствора проявителя. Инкубация 30 мин. (окрашивание). Остановка реакции. Регистрация оптической плотности.</p>	

Форма выпуска наборов

- набор Ф2-монолит – монолитный планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на проведение 2 постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
- набор Ф6-стрип – стриповый планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на 6 постановок ИФА: 1 постановка – 2 стрипа (32 лунки);
- набор Ф12-стрип – стриповый планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система рассчитана на 12 постановок ИФА: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок);
- набор T2-монолит - монолитный планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на проведение 2 постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);
- набор T12-стрип – стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 12 постановок ИФА: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

Набор рассчитан на проведение 192 анализов.

Характеристика показателей качества тест-системы “DIA-HVscore”

Чувствительность тест-системы “DIA-HVscore”

Определение чувствительности тест-системы «DIA-HVscore» проводили на 72 образцах стандартной панели сывороток от больных с ГВ, которые содержат антитела против сердцевинного антигена ВГВ; набор сывороток представлен лабораторией гепатитов и ВИЧ-инфекции Института эпидемиологии и инфекционных болезней АМНУ. Все образцы были определены как положительные.

Специфичность тест-системы «DIA-HVscore»

При определении специфичности тест-системы «DIA-HVscore» проанализировали 26.097 рандомизированных проб донорской крови, из них определены как положительные 2.236 проб; после повторного тестирования остались положительными 2.089 образцов. Ложноположительными оказались 167 проб донорской крови. Специфичность тест-системы составила 99,4 %. На образцах, взятых от доноров, обнаружена незначительная неспецифическая реактивность – 0,6 %.

Основные особенности и преимущества тест-системы «DIA-HVscore»

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоспецифичного рекомбинантного белка HVscore в составе иммуносорбента.
 - Визуальный контроль внесения образцов сыворотки или плазмы в лунки планшета за счет изменения цвета раствора.
- Систему легко приспособить к условиям повседневных серологических исследований.
- Использование общепринятых методов стандартизации при учете результатов.
- Длительность анализа – 2, 5 ч.
- Один набор рассчитан на проведение 192 анализов.
- Имеются разные варианты комплекции наборов по выбору потребителя – стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.
- Срок годности 12 мес.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blumberg BS, Hesser JE, Economidou I. et al. The variety of responses with8in a community to infection with Australia (hepatitis B) antigen. *Dev Biol Stand* 1975, 30, 270-283
2. Балаян М.С., Михайлов М.И. Энциклопедический словарь – вирусные гепатиты. Русско-укр. Изд. / Под ред. Б.А.Герасуна. Львов: ЛДМУ, 2000. - 584 с.
3. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // В кн. "Інфекційні і паразитарні хвороби": в 3 т. - К.: "Здоров'я", 2001.т.1,601-614.
4. Горбаков В.В. Современные подходы к лечению хронических вирусных заболеваний печени // Терапевтический архив. – 2000. - N 8. - С. 5-9.
5. «Епідеміологічна характеристика гепатиту В в Україні і шляхи підвищення ефективності його профілактики»/ Гураль А.Л., Марієвський, Сергеев Т.А. та ін.// Інф.хвороби. – 2003. – N 2. – С. 35-42.
6. Львов Д.К. Вирусные гепатиты от А до G и далее // ЖМЭИ. - 1997. - N 1. - С. 70-77.
7. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. С.-Птб.-1998.-391 с.
8. Шагинян В.Р., Гураль А.Л., Маричев И.Л. Задачи и возможности лабораторного тестирования при вирусных гепатитах // Лаб. диагностика. – 2000. - N 2. – С. 36-39.
9. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. рук.: Пер. с англ. / Под ред. З.Г.Апроксиной, Н.А.Мухина. - М.: Гэотар Медицина, 1999. - 864 с.
10. Епидемиологическая оценка традиционных и современных методов взятия крови в профилактике внутрибольничного распространения парентеральных вирусных гепатитов. / Храпунова И.А., Филиппов В.Ю., Николаева Г.И., Садикова Н.В.// Эпид. инф. болезни.-2003.-№1.-с.19-21.
11. Hepatitis B // *World Health Rep.* - 1996. - P. 33-35.
12. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // *Postgrad. Med. J.* - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
13. Maddy W.C. Hepatitis B – an important public health issue // *Clin. Lab.* - 2001. - V. 47, N 1-2. - P. 51-55.

Содержание²

Сокращения, использованные в тексте пособия	3
Вступление	
Этиология	
Патогенез	
Эпидемиология ГВ	
Специфическая диагностика ГВ	
Профилактика ГВ	
Иммуноферментный анализ	
Терминология	
Оборудование, необходимое для работы с тест-системами на основе ИФА	
Правила работы с иммуноферментными тест-системами	
Методика работы с тест-системой иммуноферментной "DIA-HBV"	
Характеристика показателей качества тест-системы "DIA-HBV"	
Чувствительность тест-системы "DIA-HBV"	
Специфичность тест-системы "DIA-HBV"	
Основные особенности и преимущества тест-системы "DIA-HBV"	
Методика работы с тест-системой иммуноферментной "DIA-C-HBV"	
Принцип анализа	
Форма выпуска наборов	
Основные особенности и преимущества тест-системы "DIA-C-HBV"	
Методика работы с тест-системой иммуноферментной "DIA-HVscore"	
Принцип анализа	
Формы выпуска наборов	
Характеристика показателей качества	

² Не знаю, как выйдут страницы; это придется проверять.

тест-системы "DIA- HBscore"	
Чувствительность тест-системы «DIA- HBscore»	
Специфичность тест-системы "DIA- HBscore"	
Основные особенности и преимущества тест-системы "DIA- HBscore"	
Литература	