

ГП Научно-технический центр иммунологической
НТК „Институт монокристаллов”
Национальной академии наук Украины
Институт эпидемиологии и инфекционных болезней
им.Л.В.Громашевского
Академии медицинских наук Украины
АОЗТ НПК “Диапроф-Мед”

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА С

Практическое пособие

Киев-2004

УДК 616.36-002.2-078
СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕПАТИТА С

Практическое пособие

Под редакцией доктора медицинских наук,
профессора Гураля А.Л.

Авторы:

А.Л.Гураль, Т.А.Сергеева, В.Р.Шагинян, Н.В.Иванская,
Г.Е.Раевская, Г.В.Касяненко, В.А.Шеховцов

Для врачей-лаборантов эпидемиологов, вирусологов,
врачей инфекционного и общетерапевтического профиля,
биологов.

Киев, „Диапроф-Мед”, 2004

Содержание

Сокращения, использованные в тексте пособия	
Вступление	
Этиология	
Патогенез	
Эпидемиология	
Лабораторная диагностика	
Иммуноферментный анализ	
Методика работы с иммуноферментной тест-системой „DIA-НСУ”	
Характеристика показателей качества	
Методика работы с иммуноферментной тест-системой „DIA-С-НСУ”	
Литература	

31. Gowans E.J. Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body // *Semin. Liver Dis.* – 2000. – Vol. 20, N 1. – P. 85-102.
32. Hepatitis C assays: operational characteristics (phase I). Report I, January 2001 / WHO/BCT/BST/01.2.
33. IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C / Quiroga J.A., Campillo M., Castillo I. et al. // *Hepatology.* – 1991. – Vol. 14. – P. 38-43.
34. Pawlotsky J.-M. Diagnostic tests for hepatitis C // *J. Hepatol.* – 1999. – Vol. 31 (Suppl. 1). – P. 71-79.
35. Saldanha J., Lelie N., Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborated Study Group // *Vox. Sang.* – 1999. – Vol. 76. – P. 149-158.
36. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of literature / Colin C., Lanoir D., Touzet S. et al. // *J. Viral. Hepat.* – 2001. – Vol. 8, N 2. – P. 87-95.
37. Serum and liver HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and histological features / De Moliner L., Pontisso P., De Salvo G.L. et al. // *Gut.* – 1998. – Vol. 42, N 5. – P. 856-860.
38. Significance of anti-HCV core IgM antibodies in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alfa / Pawlotsky J.-M., Roudot-Thoraval F., Pellerin M. et al. // *Hepatology.* – 1996. – Vol. 24. – P. 391 A.
39. Strategies for reliable diagnosis of hepatitis C infection: The need for a serological confirmatory assay / Schroter M., Schafer P., Zollner B. et al. // *J. Med. Virol.* – 2001. – Vol. 64, N 3. – P. 320-324.
40. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? / Pawlotsky J.-M., Lonjon I., Hezode C. et al. // *Hepatology.* – 1998. – Vol. 27, N 6. – P. 1700-1702.
41. Zein N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes / *Clin. Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol. 13, N 2. – P. 223-235.

Сокращения, использованные в тексте пособия:

- АГ – антиген;
 Анти-ВГС – антитела против вируса гепатита С;
 АТ – антитело;
 АлАТ – аланинаминотрансфераза;
 ВГС – вирус гепатита С;
 ГС – гепатит С;
 ГЗ – граничное значения (показателя оптической плотности);
 ГИСК – Государственный институт стандартизации и контроля качества медицинских и биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Российской академии медицинских наук (Москва);
 ИБ – иммуноблот;
 ИППП – инфекции, передающиеся половым путем;
 ИФА – иммуноферментный анализ;
 К⁺ – положительная контрольная проба;
 К⁻ – отрицательная контрольная проба;
 ЛПС – лечебно-профилактический стационар;
 ОГС – острый гепатит С;
 ОП – оптическая плотность;
 ОФД – ортофенилендиамин (о-фенилендиамин);
 ППГ – посттрансузионный гепатит С;
 ПЦР – полимеразная цепная реакция;
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 ХГС – хронический гепатит С;
 ЦМВ – цитомегаловирус;
 ВБИ – Boston Biomedica Inc.;
 ВСPI – Bio Clinical Partners Inc.;
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центры США по проблемам контроля и предупреждения заболеваний;
 EALS – Европейская ассоциация по изучению печени;
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазный иммуноферментный анализ, ТИФА;
 HVR – гипервариабельный участок генома;
 IgA, IgG, IgM – иммуноглобулины классов А, G и M;

- полимеразной цепной реакции и морфологического анализа биопсий печени / Непомнящих Г.И., Толоконская Н.П., Айдагулова С.В. и др. // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2003. – Т. 135, №3. – С. 343-348.
22. Ackerman Z., Ackerman E., Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review // *J. Viral Hepat.* – 2000. – N 2. – P. 93-103.
23. Alter M., Margolis H., Bell B. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease // *MMWR.* – 1998. – Vol. 47, N RR-19. – 39 p.
24. Berger A., Preiser W., Doerr H.W. The role of viral load determination for the management of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection // *J. Clin. Virol.* – 2001. – Vol. 20. – P. 23–30.
25. Detection of anti-hepatitis C virus antibodies in patients undergoing dialysis by utilizing a hepatitis C virus 3.0 assay: correlation with hepatitis C virus RNA / De Medina M., Hill M., Sullivan H.O. et al. // *J. Lab. Clin. Med.* – 1998. – Vol. 132. – P. 73-75.
26. EASL International Consensus of Hepatitis C: Paris, 26-28 February 1999, consensus statement // *J. Hepatol.* – 1999. – Vol. 30. – P. 209-212.
27. Epidemiology of hepatitis C virus infection in seven European Union countries: a critical analysis of the literature / Touzet S., Kraemer L., Colin C., Pradat P. // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2000. – Vol. 12. – P. 667-678.
28. Erensoy S. Diagnosis of hepatitis C virus infection and laboratory monitoring of its therapy // *J. of Clin. Virol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 271-281.
29. Evaluation of hepatitis C virus RNA: RT/PCR qualitative and quantitative second generation assays / Castro F.J., Sauleda S., Esteban J.I. et al. // *J. Viral Meth.* – 2001. – Vol. 91, N 1. – P. 51-58.
30. Evaluation of molecular parameters for routine assessment of viremia in patients with chronic hepatitis C who are undergoing antiviral therapy / Kessler H.H., Pierer K., Santner B.I. et al. // *J. Hum. Virol.* – 1998. – 1. – P. 314–319.

10. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита: Практическое руководство; пер. с нем. / Под ред. А.А.Шептулина. М.: Гэотар Медицина, 1999. – 432 с.
11. Майер К.-П. Естественное течение и диагностика вирусного гепатита С // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – N 4. – С. 21-32.
12. Мариевский В.Ф., Гураль А.Л., Шагинян В.Р. Серозидемиологическое изучение гепатита С как внутрибольничной инфекции // Проблемы медицинской науки та освіти. – 2000. – N 2. – С. 23-27.
13. Михайлов М.И. Лабораторная диагностика гепатита С (серологические маркеры и методы их выявления) // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2001. – N 2. – С. 8-18.
14. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.
15. Сергеева Т.А. Серологическая диагностика гепатита С: проблемы и перспективы // Лаб.диагностика. – 2003. – № 1. – С.7-15.
16. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. – СПб.: Теза, 1998. – 332 с.
17. Спектр антител к различным антигенам ВГС при разных вариантах течения хронической ВГС-инфекции / Круглов И.В., Знойко О.О., Огиенко О.Л. и др. // Вопр. вирусологии. – 2002. – N2. – С. 11-16.
18. Шахгильдян И.В. Характеристика групп высокого риска инфицирования вирусом гепатита С // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2000. – N 2 (9). – С. 3-4.
19. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. рук.: Пер. с англ. / Под ред. З.Г.Апроксиной, Н.А.Мушкина. – М.: Гэотар Медицина, 1999. – 864 с.
20. Эпидемиологические особенности распространения гепатита С среди различных групп населения / Гураль А.Л., Мариевский В.Ф., Громашевская Л.Л. и др. // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2001. – N 2. – С. 74-77.
21. Является ли репликация вируса гепатита С маркером степени активности инфекционного процесса? По данным

ВСТУПЛЕНИЕ

Гепатит С (ГС) занимает одну из ведущих позиций в инфекционной патологии человека и представляет актуальную проблему медицинской науки и практического здравоохранения во всех странах мира. По экспертным оценкам, во всем мире вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано свыше 500 млн. чел.

Медицинская и социальная проблематика ГС обусловлена не только его широким распространением, но и крайне пагубными последствиями, к которым может привести это заболевание. Острый ГС (ОГС) в большинстве случаев протекает с минимальной клинической симптоматикой. Желтуха и другие клинические проявления инфекции отмечены только примерно у 20 % больных, тогда как у 50-85 % лиц, зараженных ВГС, развивается хронический гепатит С (ХГС), представляющий основную клиническую форму ГС. Многолетнее переживание вируса при ХГС может вызвать развитие цирроза печени с последующим высоким риском возникновения гепатоцеллюлярной карциномы. По данным Европейской ассоциации по изучению печени (EASL), ГС – это причина 40 % случаев цирроза печени и 60 % случаев гепатоцеллюлярной карциномы. Вместе с тем ГС – это самое распространенное показание для пересадки печени. По прогнозам ВОЗ, в течение следующих 10-20 лет ХГС станет основной проблемой национальных органов здравоохранения, т.к. количество больных с циррозом печени может возрасти на 60 %, пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой – на 68 %, больных с декомпенсацией печени – на 280 %; смертность от заболеваний печени может увеличиться вдвое.

Несмотря интенсивное изучение ГС и достигнутый при этом существенный прогресс, нынешнее состояние разработки проблем эпидемиологии, диагностики, клиники, лечения и профилактики все еще не позволяет успешно решить проблемы, связанные с ограничением распространения возбудителя, снижением заболеваемости ГС и профилактикой развития хронических поражений печени. Одно из важнейших направлений борьбы с ГС – своевременное обнаружение

зараженных лиц, назначение при необходимости специфической терапии и проверка ее эффективности.

Этиология

ВГС – это первый вирус, идентифицированный путем молекулярного клонирования без применения прямых биологических или биофизических методов, когда довольно мало было известно о природе этого возбудителя. ВГС принадлежит к семейству Флавивирусов (Flaviviridae) и отдельному роду Гепацивирусов (Hepacivirus). Это мелкий вирус диаметром до 30-60 нм, покрытый белково-липидной оболочкой (рис. 1).

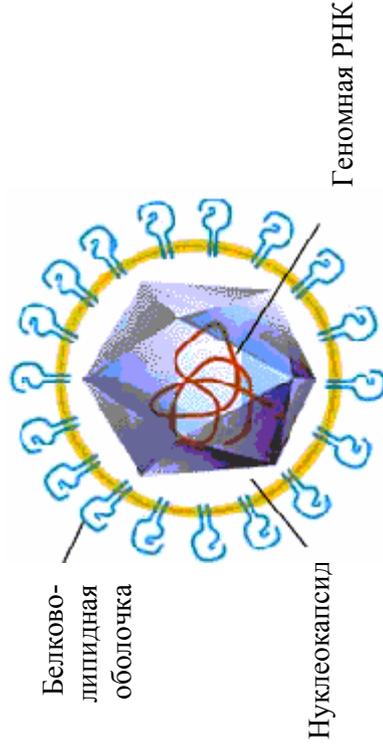


Рис. 1. Схема строения вируса гепатита С

ВГС стоек к нагреванию до 50 °С; при температуре 60 °С он инактивируется в течение 30 мин., а при 100 °С – за 2 мин. Вирус можно обезвредить формалином в разведении 1:1.000 в течение 96 ч. при температуре 37 °С; он чувствителен к ультрафиолетовому облучению, действию хлороформа. Период полужизни вируса ВГС в сыворотке крови длится не менее трех часов; минимальный уровень продукции/клиренса. ВГС составляет 10¹² синтезированных вирусных частиц в сутки.

Геном ВГС представлен одноцепочечной линейной молекулой РНК, состоящей из 9.400-9.500 нуклеотидов; он

Литература

1. Балаян М.С., Михайлов М.И. Энциклопедический словарь – вирусные гепатиты. Русско-украинское издание. / Под ред. Б.А.Герасуна. Львов: ЛДМУ. – 2000. – 584 с.
2. Вирусная нагрузка и тяжесть заболевания гепатитом С: есть ли связь? / Лакина Е.И., Масалова О.В., Абдулмеджидова А.А. и др. // В кн.: Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2001. – N 3 (13). – С.16-32
3. Возіанова Ж.І. Вірусні гепатити // В кн. "Інфекційні і паразитарні хвороби". – К.: "Здоров'я". – 2001. – Т. 1. – С. 566-633.
4. Возіанова Ж.І., Чуба П.С. Поширеність та особливості вірусних гепатитів у осіб, що вживають наркотики // Інфекційні хвороби. – 1999. – N 4. – С. 51-54.
5. Громашевская Л.Л. Вирусные гепатиты как полиорганный, системная патология // Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи возбудителей и их исходы. – Киев. – 2001. – С. 97-101.
6. Гураль А.Л. Гепатит С: проблеми епідеміології // В кн.: "Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи возбудителей и их исходы. – К., 2001. – С. 21-25.
7. Диагностическая значимость определения антител к различным антигенам вируса гепатита С у пациентов с острой и хронической ВГС-инфекцией / Ющук Н.Д., Огиенко О.Л., Круглов И.В. и др. // Терапевтический архив. – 2002. – N 4. – С. 18-22.
8. Крель П.Е. Клиническое значение полимеразной цепной реакции при лечении хронических гепатитов В и С // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1999. – N 5. – С. 45-47.
9. Лопаткина Т.Н. Хронический гепатит С: внепеченочные проявления, особенности клинического течения, диагностика // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2000. – N 2 (9). – С. 5-6.

- набор Т6-стрип – 2 стриповых планшета, хромоген – розчин ТМБ; тест-система рассчитана на 6 постановок ИФА: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки).

Набор рассчитан на проведение 24 анализов (включая контроли).

Условия сохранения и транспортирования

Набор сохраняют и перевозят при температуре 2-8 °С. Замораживать набор не разрешается.

Срок хранения набора – 6 месяцев.

Основные свойства и преимущества иммуноферментных тест-систем производства НПК „Дианроф-Мед”

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоспецифичных рекомбинантных полипептидов в составе иммуносорбента и моноклональных антител в иммуноферментном конъюгате.
- Тест-системы легко приспособить к условиям повседневного серологического тестирования.
- Визуальный контроль внесения образцов сыворотки или плазмы в лунки планшета за счет изменения цвета раствора для разведения сывороток.
- Общепринятая стандартизация учета результатов.
- Длительность анализа – 2,5 ч.
- Разные варианты комплекции наборов по выбору потребителя: стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.

имеет открытую рамку считывания, где закодирована информация о вирусоспецифическом полипептиде (около 3.000 аминокислотных остатков). В нем выделяют 5'- и 3'-участки, кодирующие, соответственно структурные и неструктурные белки (рис. 2). Отличают три структурных¹ белка: нуклеокапсидный «серцевинный» белок С (core protein, р19) и два белка внешней оболочки (envelope proteins), кодируемые участками E1 (р18 и gr33) и E2/NS1 (р38 и gr72); эти гликозилированные белки важны для прикрепления и проникновения вируса в клетку. К неструктурным принадлежат белки, кодируемые участками генома NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b. Названные белки выполняют функции протеазы, геликазы, РНК-зависимой РНК-полимеразы, а потому необходимы для репродукции вируса.

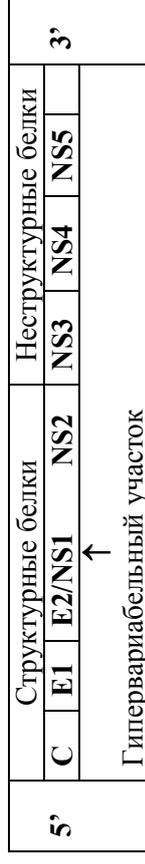


Рис. 2. Схема организации генома ВГС

ВГС принадлежит к возбудителям с чрезвычайно высокой гетерогенностью генома, преимущественно в участках РНК, кодирующих вирусные оболочечные белки. Обнаружено два гипервариабельных участка (hypervariable regions, HVR) генома, HVR1 и HVR2, расположенных в N-концевой части E2, с высокой частотой замены аминокислотных остатков. Наиболее консервативными считаются участки генома, ответственные за С-белок и белки NS5. Анализ нуклеотидных последовательностей РНК в изолятах из разных регионов мира позволяет, в зависимости от степени подобия геномов, выделить, по разным классификациям, 6 или 11 основных генотипов и свыше 100 субтипов. В генотипах степень гомологии нуклеотидных последовательностей составляет менее

¹ Считают, что на 5'-конце генома ВГС кодируется синтез еще одного белка (р29) с пока еще не установленными функциями.

72 %, а в субтипах – 72-86 %. У больных, зараженных ВГС, могут циркулировать многочисленные варианты вируса с измененными, но близкородственными геномами (которые отличаются между собой на 1-2 %); такие варианты называются квазивидами ("quasiprecies"). Значительная генетическая вариабельность РНК ВГС приводит к образованию мутантных штаммов и помогает вирусу "уклоняться" от иммунного надзора организма; именно этим можно объяснить длительное (иногда пожизненное) носительство вируса, развитие преимущественно хронических форм инфекционного процесса, трудности в лечении, в создании действенных вакцинных препаратов.

Исследования показали, что самые распространенные генотипы ВГС – 1a, 1b, 2a, 2b, 2c и 3a, на долю которых приходится свыше 90 % всех изолятов вируса, выделенных от больных в Северной и Южной Америке, Европе, России, Китае, Японии, Австралии, Новой Зеландии. В европейских странах у 50-91 % больных ГС обнаруживают генотип 1b, а у 40 % зараженных лиц – генотип 1a. В США преобладают генотипы 1a и 1b, регистрируемые, соответственно, у 37 % и 30 % зараженных. В большинстве стран Восточной и Юго-Восточной Азии, Японии, Китае, Сингапуре, Индонезии, Южной Корее до 58 % изолятов ВГС представлены генотипом 1b. Генотипы 2a и 2b менее распространены в мире и чаще встречаются в странах Востока. В Таиланде, Северной Европе и Австралии встречается, главным образом, генотип 3a. Генотипы 4, 5a и 6 регистрируются, соответственно, в Центральной и Южной Африке, Юго-Восточной Азии. В России и странах СНГ преобладает генотип 1b (не менее чем 68,9 % всех изолятов).

Установлены некоторые расхождения, касающиеся частоты обнаружения того или иного генотипа ВГС в зависимости от пути передачи. Так, в европейских странах генотип 1b чаще находят при заражении после переливания загрязненной крови и ее продуктов (в частности, плазмы), генотипы 1a и 3a – у инъекционных наркоманов, а генотипы 2 и 3 ассоциируются с заражением в отделениях и центрах гемодиализа. Считают, что у больных, инфицированных ВГС генотипа 1b, болезнь протекает тяжелее; у них высокий уровень

Оптическую плотность можно определять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланка). Необходимо оставить пустую лунку при проведении анализа.

Учет и интерпретация результатов анализа

- Проведение анализа считают корректным, если значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контролем для каждого антигена (ОГ К⁻) не выше 0,1 оптической единицы (о.е.), а значения ОП положительного контроля (ОГ К⁺) для каждого антигена не ниже чем 0,6 о.е.
- Граничное значение ОП (ГЗ). ГЗ анализа для каждого антигена рассчитывают отдельно, добавляя константную величину **0,12** до значения ОП К⁻ соответствующего антигена.
- Если ОП образца в лунке с определенным антигеном превышает ГЗ, считают, что образец содержит антитела к соответствующему антигену.
- Результаты анализа считаются **отрицательными**, если значения ОП исследуемого образца ниже уровня ГЗ для всех исследуемых антигенов.
- Результаты анализа считаются **неопределенными**, если ОП образца превышает ГЗ лишь для одного исследуемого антигена.
- Результаты анализа считаются **положительными**, если значение ОП исследуемого образца превышает ГЗ более чем для одного антигена.

Форма выпуска набора

- **набор ТЗ-стрип** – 1 стриповый планшет, хромоген – раствор ТМБ; тест-система рассчитана на 3 постановки ИФА: 1 постановка – 4 стрипа (32 лунки).

- В лунки A1, A2, A3 и A4 вносят по 20 мкл положительного контроля, а в лунки B1, B2, B3 и B4 – по 20 мкл отрицательного контроля.

При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно пипетировать смесь. (Во время пипетирования цвет раствора в лунках изменяется.)

- В остальные лунки стрипов вносят по 20 мкл образцов исследуемых сывороток. Антигены core, NS3, NS4 и NS5 сорбированы на отдельных стрипах. При проведении анализа каждый исследуемый образец вносят в четыре лунки с разными антигенами.

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 мин.

- По окончании инкубации удаляют содержимое лунок при помощи промывалки или 8-канальной пипетки и промывают лунки четыре раза раствором для промывания, после чего удаляют избыточную влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

- Готовят раствор конъюгата согласно п. 1.2.

- В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора конъюгата.

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин.

- По окончании инкубации удаляют содержимое лунок при помощи промывалки или 8-канальной пипетки и промывают лунки восемь раз раствором для промывания, после чего удаляют избыточную влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

- Готовят раствор проявителя согласно п. 1.3.

- Вносят в лунки стрипов по 100 мкл раствора проявителя.

- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин.

- Останавливают цветную реакцию внесением в лунки по 100 мкл стоп-реагента.

- Не позже чем через 1 мин. после прекращения цветной реакции определяют оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (450 нм относительно 620 нм).

вирусной РНК в сыворотке крови, хуже ответ на лечение препаратами интерферона и выше вероятность развития рецидивов.

Патогенез

Патогенез ГС до сих пор полностью не изучен. Проникновение ВГС из крови в печень и другие органы и ткани, где он размножается, приводит к запуску каскада обменных и иммунных реакций, развитию деструктивных и защитных, а также репаративных процессов. Данные о точных механизмах репродукции ВГС пока недостаточны, однако известно, что оно связано с синтезом комплементарных промежуточных форм РНК – цепей с отрицательной полярностью (образуется «минус»-цепь РНК – репликативная форма РНК ВГС). Доказана также лимфотропность ВГС: в большинстве исследований «минус»-цепь РНК обнаружена в мононуклеарных клетках крови – моноцитах/макрофагах, В-лимфоцитах и полиморфноядерных лейкоцитах.

У патогенезе заболевания разные авторы выделяют:

- 1) прямое цитопатическое действие вируса и связанные с этим иммунные нарушения;
- 2) последствия размножения вируса как в печени, так и за ее пределами;
- 3) роль гетерогенности генотипов ВГС и мутаций вирусного генома.

В процессах повреждения органов и систем, вызванных инфекцией ВГС, прежде всего рассматривают взаимосвязь между организмом человека и вирусом. Генетические факторы макроорганизма, первоначальное состояние противовирусного иммунитета определяют первичную реакцию на заражение и влияют на характер последующего иммунного ответа. Основные вирусные факторы, обуславливающие характер и развитие инфекционного процесса – это количество инфекционных частиц, занесенных при заражении, набор зараженных клеток, активность размножения, способность возбудителя к мутированию, мера выраженности прямого цитопатического воздействия.

До сих пор все еще обсуждается механизм повреждения гепатоцитов при ГС. Одно из предположений – непосредственное цитопатическое воздействие вируса: белки ВГС вызывают апоптоз зараженных клеток. Прямое цитотоксическое действие ВГС на гепатоцит связывают с активацией рецепторов особого рода – Aro-I/Fas-рецепторов, экспрессия которых на гепатоцитах больных ХГС возрастает более чем в 3-5 раз. Рецепторы APO-I/Fas стимулируются лигандной матричной мРНК, которой не обнаруживают в здоровой печени; зато ее синтез возрастает при гепатоцеллюлярных повреждениях. При заболеваниях печени вирусной природы экспрессия такой лигандной мРНК осуществляется в цитотоксических Т-лимфоцитах (в отличие от поражений печени невирусной природы, когда мРНК выражается непосредственно гепатоцитами); это свидетельствует о важной роли иммунной системы в патогенезе ГС.

Высокая степень генетической изменчивости ВГС и его способность размножаться в иммунокомпетентных клетках (моноцитах/макрофагах, В-лимфоцитах), по мнению ряда специалистов, обеспечивают распространение и длительное выживание ВГС в организме человека; именно это обстоятельство обуславливает патогенетические особенности инфекции при ГС. Одна из таких особенностей состоит в том, что в организме зараженного человека появляется значительное количество аутоантител и аутоантигенов, происходит хроническая стимуляция лимфоцитарного звена иммунного ответа. Это и приводит к многочисленным внепеченочным проявлениям ГС (смешанная криоглобулинемия, мембранопролиферативный гломерулонефрит, аутоиммунный тиреоидит и т.д.). Размножение ВГС вне печени вызывает, кроме того, нарушения функций иммунного контроля зараженных лимфоцитов и моноцитов/макрофагов. Это обстоятельство имеет важное значение не только при последующем повреждении многих органов и систем. Оно также помогает ВГС «избежать» удара со стороны иммунного ответа (мононуклеарные клетки крови, клетки костного мозга и некоторые другие считаются зонами, недоступными для влияния иммунной системы –

В чистый флакон отбирают 4 мл раствора для разведения коньюгата (№ 4) и добавляют 80 мкл концентрата коньюгата. Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская пенообразования.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

1.3 Подготовка проявителя

В чистый флакон отбирают 2 мл раствора хромогена ГМБ и добавляют 2 мл буфера, содержащего субстрат; смесь интенсивно встряхивают.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Раствор проявителя необходимо беречь от света и от контакта с металлами и ионами металлов. Перед использованием раствор субстрата должен быть бесцветным.

2 Проведение анализа

- Рекомбинантные белки-аналоги антигенов ВГС сорбированы в вертикальных рядах планшета следующим образом:

с0е – стрипы № 1, 5, 9 – обозначены буквой «С».

NS3 – стрипы № 2, 6, 10 – обозначены цифрой «3».

NS4 – стрипы № 3, 7, 11 – обозначены цифрой «4».

NS5 – стрипы № 4, 8, 12 – обозначены цифрой «5».

- Перед проведением анализа вынимают из упаковки необходимое количество стрипов, вставляя их в рамку. Стрипы, не используемые в данной постановке, сохраняют в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С в течение 1 месяца.

- Готовят раствор для промывания согласно п. 1.1.

- Промывают лунки планшета раствором для промывания (350 мкл раствора на лунку) один раз при помощи промывалки или 8-канальной пипетки, после чего удаляют избыточную влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

- В каждую лунку стрипов вносят по 80 мкл раствора для розведения сывороток (№ 3).

Состав набора

В состав набора входят:

N	Название компонента	Количество
1	Концентрат раствора для промывания планшетов (№ 1)	2 фл. × 25 мл
2	Иммуносорбент	1 планшет
3	Раствор для разведения сывороток (№ 3)	1 фл. × 15 мл
4	Раствор для разведения конъюгата (№ 4)	1 фл. × 15 мл
5	Раствор субстрата в буфере	1 фл. × 7 мл
6	Хромоген ТМБ	1 фл. × 7 мл
7	Концентрат конъюгата (50х)	1 амп. × 0,3 мл
8	Отрицательный контроль	1 амп. × 0,3 мл
9	Положительный контроль	1 амп. × 0,3 мл
10	Стоп-реагент	1 фл. × 15 мл
11	Клейкая пленка	3 шт.

Проведение анализа

1 Подготовка к анализу (из расчета на 32 лунки)
Выдерживают компоненты набора при температуре 18-25°C в течение 30 мин.

1.1 Приготовление раствора для промывания

Содержание одного флакона концентрата раствора для промывания (№ 1) интенсивно встряхивают. Отбирают 12 мл раствора и разводят в 540 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед использованием при 35-37°C до полного растворения кристаллов.

Раствор можно сохранять при температуре 2-8 °С не более 10 суток.

1.2 Приготовление раствора конъюгата

immune-free zones). Считают также, что способность ВГС персистировать в клетках крови играет определенную роль в нарушениях регуляции кроветворения; к ним относятся: повреждение физиологических функций моноцитов/макрофагов; дисбаланс синтеза цитокинов; торможение или стимуляция гемопоэза; развитие цитопенических или пролиферативных гематологических синдромов. Такие повреждения могут стать причиной возникновения иммунных цитопений, лейкомии, лимфосарком, лимфогранулематоза.

Первичный иммунный ответ на инфекцию характеризуется мобилизацией неспецифической иммунной защиты (синтезом интерферонов, появлением природных киллерных клеток). Однако уже через несколько дней возникает специфический иммунный ответ, направленный на удаление свободных частиц вируса и защиту (за счет гуморального звена) от повторного заражения, а также на уничтожение вируса, проникшего в клетки, путем лизиса зараженных клеток и торможения репродукции вируса цитокинами без лизиса клеток (клеточное звено иммунного ответа). Активация Т-лимфоцитов вызывает повреждение гепатоцитов после распознавания антигенов на их поверхности; при этом мишенью цитотоксичности становится сердцевинный (core) белок ВГС. Поскольку возбудитель ГС – внутриклеточный паразит, то клеточный иммунный ответ имеет наибольшее значение для специфической защиты организма.

Специфический гуморальный иммунный ответ состоит в синтезе антител против структурных и неструктурных белков ВГС. Вирус обладает слабой иммуногенностью, и поэтому антитела синтезуются поздно; они практически не способны нейтрализовать вирус, не мешают переживанию возбудителя, не гарантируют надежного иммунитета при реинфекции, не играют решающей роли в удалении ВГС. Некоторое противовирусное действие присуще антителам, специфичным для продуктов гена E2/NS1, однако оно проявляется только на ранних стадиях заболевания. Мишенью для антител, нейтрализующих вирус, становятся белки гипервариабельного участка HVRI ВГС. Гетерогенность этих белков среди разных изолятов ВГС очень значительна; кроме того, наблюдается чрезвычайно высокая

изменчивость этих белков во время инфекции у одного и того же больного. Все это обуславливает бездействие гуморального иммунного ответа (как и трудности в создании вакцин), т.к. защитное действие синтезированных антител длится только в течение очень короткого времени.

Неспецифический гуморальный иммунный ответ характеризуется возрастанием концентрации сывороточных иммуноглобулинов, появлением противоядерных антител, антител против гладкой мускулатуры, против структур эндотелия, ревматоидного фактора, а в ряде случаев – так называемых антител I типа против микросом почек/лечени (их расценивают как маркеры аутоиммунного хронического активного гепатита II типа), а также антител против тиреоглобулина, надпочечников и β -клеток поджелудочной железы.

Реакции, опосредованные Т-клетками, обуславливают появление в органах и тканях лимфоидных инфильтратов, гранулематоза; сочетание реакций гиперчувствительности замедленного типа с иммунокомпетентными реакциями определяет развитие у таких больных васкулитов, артритов, миокардитов.

Особо обсуждается роль интерферона в патогенезе ГС как ответа организма на инфекцию, а также клеточного иммунного ответа на интерферон, который может быть изменен у зараженного человека. Есть точка зрения, согласно которой ВГС при определенной генетически обусловленной склонности организма (первичный генетический дефект противовирусного иммунитета) вызывает синтез «аномальных» интерферонов; Это, в свою очередь, приводит к становлению сложных нарушений иммунитета, которые проявляются в виде аутоиммунных реакций, неконтролируемой пролиферации, развитии опухолей.

Показана возможность повторного заражения как другими, так и гомологичными штаммами ВГС.

Эпидемиология

По экспертным оценкам ВОЗ, в мире инфицировано ВГС свыше 500 млн. чел. В США ежегодно первично заражается 150

МЕТОДИКА РАБОТЫ С ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ "DIA-C-НСУ"

«DIA-C-НСУ» – тест-система иммуноферментная для обнаружения антител к отдельным белкам ВГС.

Назначение набора

Набор предназначен для анализа сыворотки или плазмы крови человека на наличие антител к отдельным белкам ВГС методом иммуноферментного анализа.

Принцип анализа

Основные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент – полистироловый планшет, в лунках которого отдельно сорбированы рекомбинантные антигены-аналоги антигенов core, NS3, NS4 и NS5 ВГС (каждый антиген сорбирован на трех отдельных стрипах). Конъюгат – моноклональные антитела против человеческих иммуноглобулинов класса IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфичные к отдельным белкам ВГС, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы обнаруживают при помощи специфичного пероксидазного конъюгата моноклональных антител против иммуноглобулинов класса IgG. После отмывания несвязанных компонентов в лунки вносят раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекись водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидина – ТМБ). Ферментативную реакцию останавливают, добавив стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность смеси в лунках при длине волны 450/620 нм. Положительные результаты в определенных лунках свидетельствуют о наличии в образце антител против соответствующего антигена ВГС.

разными инфекционными заболеваниями и беременными женщинами не обнаружилось значительной перекрестной реактивности (не свыше 1,2 % ложноположительных результатов).

тыс. чел, а число зараженных достигает 4 млн. чел. (1,8 % населения). В этой стране от хронических болезней печени, связанных с ГС, ежегодно умирает 8-10 тыс. чел, а одной тысяче пациентов проводят трансплантацию печени. В Европе зарегистрировано свыше 10 млн. больных с ХГС. Частота впервые обнаруженных случаев ГС в развитых странах составляет 1-5 на 100 тыс. населения; при этом считают, что истинные цифры превышают регистрируемые показатели в 5-8 раз. Неблагополучная эпидемиологическая ситуация отмечается и в странах СНГ. В Российской Федерации в 1994 г. официальный показатель заболеваемости достигал 3,2, а в 2000 г. – уже 20,7 на 100 тыс. населения. По данным М.С.Балаяна и М.И.Михайлова (2000), общее число зараженных лиц в РФ приближается к 5 млн. чел, а частота вновь обнаруженных случаев ГС составляет 60-80 на 100 тыс. населения в год. Результаты наблюдений в Украине тоже свидетельствуют об актуальности проблемы и росте заболеваемости. По статистическим данным – а регистрацию ГС как самостоятельной нозологической единицы здесь начали в 2003 г. – за год, минувший после ее начала в Украине учтено 1.327 случаев заболевания (2,8 на 100 тыс. населения). Однако действительный уровень заболеваемости значительно превышает этот показатель, т.к. в официальную статистику входят лишь случаи ОГС, а лица с хроническими формами инфекции, количество которых значительно выше числа лиц с ОГС, все еще не попадают в государственную регистрацию.

Частота выявления актуальных маркеров инфицирования позволяет оценить распространение той или иной инфекции. Такой маркер при ГС – противовирусные антитела (анти-ВГС). Показатели частоты обнаружения анти-ВГС среди здорового населения (а прежде всего доноров крови) в разных странах колеблются от 0,14 до 6 % и выше. В США этот показатель составляет 0,5-1,5 %; в странах Евросоюза средняя распространенность анти-ВГС у доноров – 1 %, от 0,04 % на севере до 2 % на юге. В Восточной Европе и Азии показатели лежат в пределах 1,5-4 %, в некоторых регионах Африки, Ближнего и Среднего Востока – от 4 до 10 %, а в ряде стран Центральной Африки превышают 10 %. При этом результаты

обследования представителей взрослой неорганизованной популяции свидетельствуют о том, что среди них показатели инфицированности ВГС более чем вдвое превышают показатели частоты обнаружения анти-ВГС у доноров. Частота выявления анти-ВГС среди добровольных безоплатных доноров крови в Украине составляет 1,3 %, а у беременных – 2,0 %. Соответственно действующим критериям, такие показатели характерны для регионов с достаточно высоким уровнем зараженности населения ВГС.

ГС – это антропоноз, относящийся к кровяным инфекциям с парентеральным механизмом передачи возбудителя; этот механизм может срабатывать как в естественных, так и в искусственных условиях (благодаря природным и искусственным путям передачи). Источником инфекции бывают больные со всеми формами ОГС и ХГС, а также вирусносители. С эпидемиологической точки зрения наибольшую опасность представляют больные с такими формами ГС, которые протекают скрыто (безжелтушные, субклинические, латентные), и вирусносители, обнаружить которых очень трудно. По оценкам специалистов, на одного больного с ОГС и желтухой приходится 5-6 случаев безжелтушного гепатита; по литературным данным, частота безжелтушных случаев ГС может достигать даже 95 %. Главная форма инфекционного процесса при ГС представлена ХГС, и его клиническое течение длительное время бессимптомно; при этом больной является источником инфекции в течение одной или нескольких недель до начала заболевания, всего острого периода и длительного время при формировании ХГС и состоянии вирусносительства. Исто основания предполагать, что больные с разными вариантами ХГС пожизненно остаются источником заражения. Лишь 15-18 % зараженных лиц могут самостоятельно освободиться от вируса.

Чтобы человек заразился ВГС, возбудитель должен попасть в кровяное русло. ВГС обнаруживается в крови и практически во всех биологических жидкостях организма. В контролируемых исследованиях геном ВГС обнаруживали в моче, желчи, слюне, грудном молоке, сперме, вагинальных секретах, асцитах и других биологических жидкостях организма.

определения РНК ВГС методом ПЦР, что соответствует показателям чувствительности иммуноферментных тест-систем 3-го поколения. Результаты определения чувствительности «DIA-HCV» на вышеупомянутых панелях низкотитражных сывороток с антителами против ВГС приведены в таблице 5.

Таблица 5. Определение чувствительности тест-системы «DIA-HCV» на панелях низкотитражных сывороток, содержащих антитела против ВГС

Панель	Количество образцов с положительным ответом на присутствие анти-ВГС из общего количества сывороток панели	Количество положительных результатов в тест-системе «DIA-HCV»
RNV105	14 из 15	14
ГИСК	16 из 24	16

При исследовании 347 образцов сывороток от больных ХГС ложноположительных результатов не было.

Специфичность

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

По результатам исследования 8.869 образцов сывороток донорской крови специфичность тест-системы «DIA-HCV» составила 99,3 %. Тестирование сывороток от больных с

Но самый опасный фактор передачи ВГС – это кровь и ее компоненты. В 1 мл крови зараженных людей в среднем содержится 10^3 - 10^4 вирусных частиц, но это количество может возрасти даже до 10^6 /мл. При этом доза вируса, достаточная для заражения, может содержаться в 0,01-0,001 мл крови.

К природным путям передачи ВГС, которые обеспечивают сохранение вируса в природе как биологического вида, принадлежат половой, вертикальный (от матери к ребенку) и горизонтальный (заражение в результате так называемых бытовых гемоперкутаных контактов). Искусственное заражение ВГС осуществляется при проведении медицинских и немедицинских парентеральных манипуляций.

Сейчас один из основных факторов риска заражения ВГС – введение в вену наркотических веществ загрязненными шприцами. Данные мировой литературы говорят о том, что у 65-90 % инъекционных наркоманов обнаруживаются антитела к ВГС. Показатель частоты обнаружения этого маркера заражения прямо зависит от длительности применения наркотиков и частоты уколов. Потребление наркотиков влияет на клиническое течение и лабораторные показатели при ГС. Широкое распространение ГС в среде наркоманов определяет высокую интенсивность эпидемического процесса, рост показателей заболеваемости, смену возрастного состава больных (преимущественное заражение подростков 15-17 лет и молодых людей в возрасте 18-29 лет).

Еще один важный путь распространения ГС – заражение при переливании крови, введении ее продуктов и препаратов. В предыдущие годы у 60-90 % больных с посттрансфузионными гепатитами (ПТГ) инфекцию вызывал ВГС. После разработки специфических тест-систем для обнаружения анти-ВГС и внедрения в начале 1990-х гг. обязательной проверки каждой порции донорской крови опасность заражения при переливаниях крови существенно снизилась. В современных условиях в развитых странах частота возникновения ПТГ не превышает 1 %, а при использовании для контроля донорской крови молекулярно-биологических и генетических методов исследования этот показатель еще падает. Но и сейчас есть риск заражения ВГС у больных гемофилией, талассемией, болезнью

- набор Т12-стрип – стриповый планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система рассчитана на 12 постановок ИФА: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

Набор рассчитан на проведение 192 анализов (включая контроль).

Условия сохранения и транспортирования

Набор сохраняют и перевозят при температуре 2-8 °С. Замораживать набор не разрешается.

Срок хранения набора – 1 год.

Характеристика показателей качества

Чувствительность

Определение чувствительности тест-системы «DIA-HCV» проводили на образцах сывороток, взятых от больных ХГС, а также на панелях охарактеризованных сывороток крови производства Boston Biomedica Inc. (BBI, США), Bio Clinical Partners Inc. (BCPI, США), Государственного института стандартизации и контроля качества медицинских и биологических препаратов им.Л.А.Гарасевича (ГИСК) Российской академии медицинских наук (Москва).

Таблица 4. Характеристика панелей сывороток

Панель	Характеристика образцов панели
6212 (BCPI)	Анти-HCV сероконверсионные (9)
RHV105 (BBI)	Анти-HCV низкотитражные (14), отрицательные (1)
ГИСК	Анти-HCV низкотитражные (16), отрицательные (8)

На сероконверсионной панели 6212 (BCPI) тест-набор «DIA-HCV» обнаруживает заражение ВГС с 26-го дня с момента

Вицебранда и другими недугами, которые связаны с нарушениями системы свертывания крови и лечение которых предусматривает частые переливания крови, введение ее компонентов и препаратов.

Передача ВГС может происходить также и при пересадке органов. Есть данные, что показатели заражения ВГС после пересадки печени могут доходить до 15-25 %. Описаны также случаи заражения после пересадки сердца и почек.

Риск заражения ВГС довольно высок для больных с хронической почечной недостаточностью, пребывающих на лечении в отделениях и центрах гемодиализа. У таких больных анти-ВГС обнаруживаются в 15-20 раз чаще, чем у доноров крови. Показатель частоты обнаружения специфических антител среди больных, лечимых гемодиализом, колеблется от 20 % до 30 %, но может превышать даже 50-70 %. Уровень зараженности ВГС среди таких больных непосредственно зависит от длительности заместительной терапии. Факторы, благоприятствующие заражению больных – это не только переливание крови само по себе, но и нарушения правил асептики при проведении гемодиализа из-за сложности дезинфекции и невозможности полной стерилизации гемодиализных аппаратов. Непрерывность работы в отделениях и центрах гемодиализа, многочисленные оперативные и другие парентеральные вмешательства приводят к постоянному контакту медицинских работников с кровью и другими биологическими жидкостями доноров и больных; все это создает условия для заражения персонала ВГС. По аналогии с гепатитом В, многие специалисты рассматривают ГС как профессиональное заболевание медицинских работников.

В последние годы появились сообщения о возможности внутрибольничного заражения ВГС больных и медицинских работников не только в отделениях гематологии и переливания крови, отделениях и центрах гемодиализа, но и в других лечебных учреждениях. В ЛПУ различного (неинфекционного) профиля могут находиться больные с недиагностированными формами ОГС и ХГС, вирусносители, не знающие, что они заражены. При этом больных, находящихся в стационарах для лечения неинфекционных заболеваний, обычно не обследуют на маркеры вирусных гепатитов. При нарушениях санитарно-

Если одно из трех значений ОП К не превышает 0,1 о.е. или более чем вдвое превышает ОПер К, его отбрасывают и рассчитывают ОПер К по остальным значениям ОП К.

• Граничное значение ОП (ГЗ). ГЗ рассчитывают, добавив константную величину 0,12 к значению ОПер К.

• “Серая зона” – зона значений ОП, которая простирается от ГЗ до значений, меньших, чем ГЗ, на 10 %.

• Результаты анализа считаются **отрицательными**, если значения ОП исследуемого образца меньше нижнего уровня ОП “серой зоны”.

• Результаты анализа считаются **положительными**, если значения ОП исследуемого образца превышают ГЗ.

• Образцы со значениями ОП в границах “серой зоны”, считаются **неопределенными**.

• Образцы, давшие положительный или неопределенный результат, следует проверить повторно не менее чем в двух лунках тест-системы:

- пробы положительные в одной или более лунках следует считать **положительными**;

- пробы, отрицательные в двух или более лунках следует считать **отрицательными**.

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 лунок);

• 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 проведение 2 постановок ИФА: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

- Закончив инкубацию, удаляют раствор при помощи промывалки или 8-канальной пипетки, после чего удаляют избыточную влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор конъюгата согласно п. 1.2.
- В лунки стрипов вносят по 100 мкл раствора конъюгата.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин.
- Закончив инкубацию, удаляют раствор при помощи промывалки или 8-канальной пипетки, после чего удаляют лишнюю влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).
- Готовят раствор проявителя согласно п. 1.3.
- Вносят в лунки стрипов по 100 мкл раствора проявителя.
- Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 18-22 °С в темноте в течение 30 мин.
- Останавливают цветную реакцию внесением во все лунки по 100 мкл стоп-реактива.
- Не позже чем через 1 мин. после остановки цветной реакции определяют оптическую плотность в лунках в двухволновом режиме (при 450 нм относительно 620 нм).
Как исключение, ОП можно определять в одноволновом режиме (450 нм) относительно пустой лунки (бланка). В этом случае необходимо оставить пустую лунку при раскапывании проб. При работе в одноволновом режиме понижается чувствительность и точность анализа.

Учет результатов анализа

- Рассчитывают среднее значение ОП для лунок отрицательного контроля (ОП_{сер К⁻}) и для положительного контроля (ОП_{сер К⁺}).

Проведение анализа считают корректным, если величина ОП_{сер К⁻} не выше 0,1 оптической единицы (о.е.), а значение ОП_{сер К⁺} не ниже 0,6 о.е.

эпидемического режима в условиях ЛПУ и наличии обнаруженных источников инфекции создаются все предпосылки для скрытого парентерального распространения возбудителя. Важнейшие факторы, которые при таких условиях благоприятствуют распространению ГС среди больных, – это длительное проведение курсов интенсивной инъекционной терапии, частые переливания крови и ее препаратов, взятие проб крови, биопсий, зондовые процедуры, эндоскопии, оперативные вмешательства, другие лечебно-диагностические инвазивные манипуляции. Отмечена непосредственная взаимосвязь между интенсивностью медицинских парентеральных вмешательств и частотой выявления серологических маркеров инфицирования ВГС.

К путям, поддерживающим природную циркуляцию ВГС, относится передача этого возбудителя от матери к ребенку. По данным литературы, риск вертикальной передачи ВГС колеблется от 0 % до 5-12 %, но может достигать 33 % и даже 50 % при высоком уровне вирусемии у зараженной матери (свыше 10⁶-10⁷ копий РНК ВГС/мл крови). К факторам, которые усиливают передачу ВГС от матери к ребенку, относят смешанную инфекцию или суперинфекцию вирусом гепатита В, и ВИЧ, инъекционную наркоманию, хронические заболевания печени и т.д. При этом наибольший риск заражения новорожденного возникает в том случае, когда заражение матери происходит в третьем триместре беременности. Передача ВГС происходит, главным образом, во время родов при контакте слизистых оболочек и поверхности тела ребенка с кровью, околоплодными водами, вагинальным секретом матери. Вместе с тем есть данные, полученные при определении РНК ВГС в крови рожениц и в пуповинной крови, которые говорят также и о возможности трансплацентарного заражения. Пока не известно, есть ли связь между выкармливанием ребенка грудным молоком и передачей ВГС от матери к ребенку.

О возможности половой передачи ВГС свидетельствует обнаружение маркеров инфицирования в секретах половых органов мужчин и женщин, повышенный уровень заражаемости в семейных очагах, среди половых партнеров бессимптомных носителей ВГС и партнеров лиц с ОГС и ХГС. Показана

повышенная частота случаев ОГС и ХГС, а также высокий уровень обнаружения маркеров инфекции в «традиционных» группах повышенного риска заражения «классическими» инфекциями, которые передаются половым путем (ИППП): среди мужчин-гомосексуалистов, работников коммерческого секса, лиц с беспорядочной половой жизнью и т.д. Зараженность ВГС среди названных лиц колеблется от 3-6 % до 10 %, но может и превышать 16-17 %, в зависимости от количества половых партнеров, степени «защищенности» сексуальных контактов, травматичности секса, наличия сопутствующих ИППП, а также других возбудителей, употребления наркотиков. Есть доказательства половой передачи ВГС и среди супружеских пар в семейных очагах инфекции. Риск заражения при этом составляет 0,5-5 % в год. Частота обнаружения анти-ВГС выше у партнеров лиц, больных ХГС.

Горизонтальная передача ВГС может происходить в организованных коллективах, семейных и других очагах инфекции, когда есть условия для скрытого парентерального заражения благодаря так называемым бытовым гемоперкутаным контактам с большими ГС и вирусносителями. Передаче ВГС в таких условиях могут благоприятствовать микротравмы, ссадины, царапины, в большинстве случаев едва заметные, а то и вовсе незаметные. Повышение риска заражения ВГС горизонтальным путем коррелирует со степенью выраженности патологии печени у зараженного лица, с количеством зараженных членов семьи или коллектива и т.д.

Результаты многочисленных сероэпидемиологических исследований доказывают широкое, но неравномерное распространение ГС среди разных групп населения. Среди основных групп повышенного риска заражения ВГС можно выделить:

- Инъекционных наркоманов, ВИЧ-инфицированных;
- Лиц с ИППП, пациентов кожно-венерологических диспансеров;
- Больных гемофилией и другими гематологическими заболеваниями, онкогематологических больных, лиц, которым многократно переливают кровь, ее продукты и препараты;

Содержимое флакона тщательно перемешивают, не допуская пенообразования.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

1.3 Приготовление раствора проявителя

В чистый флакон отбирают 1 мл хромогена ТМБ и добавляют 1 мл раствора № 5Т для приготовления проявителя, смесь энергично встряхивают.

Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Раствор проявителя следует предохранять от попадания света и от контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор проявителя должен быть бесцветен.

2 Проведение анализа

• Перед проведением анализа освобождают от упаковки необходимое количество стрипов, вставляя их в рамку. Стрипы, не используемые в данной постановке, сохраняют в плотно закрытом пакете при температуре 2-8 °С в течение 1 месяца.

• Готовят раствор № 1 согласно п. 1.1.

• Вносят во все лунки по 350 мкл раствора № 1, выдерживают залитыми в течение 30-40 с и удаляют раствор при помощи промывалки или 8-канальной пипетки, после чего удаляют лишнюю влагу (постукивая планшетом по фильтровальной бумаге).

• В каждую лунку стрипов вносят по 80 мкл раствора № 3 для разведения сывороток.

• В лунки стрипов вносят по 20 мкл образцов исследуемых сывороток, оставив свободными 5 лунок первого ряда (лунки для контролей).

• В две лунки (А1, В1) вносят по 20 мкл положительного контроля (К⁺), а в три других (С1-Е1) – по 20 мкл отрицательного контроля (К⁻). При внесении контрольных и исследуемых образцов необходимо осторожно pipетировать смесь. (Во время pipетирования изменяется цвет раствора в лунках).

• Накрывают стрипы клейкой пленкой или крышкой и инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 мин.

- Лиц с хронической почечной недостаточностью, лечение которых требует гемодиализа;
- Пациентов с хроническими заболеваниями печени и желчевыводящих путей;
- Больных в ЛПУ, подвергающихся длительным и/или интенсивным курсам инъекционной терапии, эндоскопическим вмешательствам и т.д.;
- Медицинских работников, прежде всего тех, которые имеют профессиональный контакт с кровью и ее препаратами, с другими биологическими жидкостями больных;
- Детей, родившихся от матерей с активным инфекционным процессом ГС;
- Лиц, которые общаются с больными ОГС или ХГС, с вирусносителями в семейных и других очагах инфекции;
- Работников коммерческого секса; лиц, ведущих беспорядочную половую жизнь и т.д.

Лабораторная диагностика

При диагностике ГС следует учитывать целый ряд факторов, включая данные эпидемиологического анамнеза, результаты лабораторных и инструментальных исследований и т.д. Одно из ведущих мест принадлежит методам специфической диагностики, направленным на обнаружение диагностических маркеров заражения: антигенов, антител, генов, нуклеиновых кислот ВГС и соответствующих белковых продуктов при помощи современных серологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Серологические исследования

Серологические исследования направлены на обнаружение специфических антигенов и антител к ВГС. Среди них различают первичные скрининговые тесты, проводимые, главным образом, методом иммуноферментного анализа (ИФА); добавочные аналитические тесты, где используют метод иммунного блоттинга (ИБ); определение серотипа вируса – так называемое «серотипирование» ВГС.

В состав набора входят:

N	Название компонента	Количество
1	Концентрат раствора № 1 для промывания планшета	3 фл. по 25 мл
2	Иммуносорбент	2 планшета
3	Раствор № 3 для разведения сывороток	1 фл., 20 мл
4	Раствор № 4 для разведения конъюгата	1 фл., 26 мл
5	Раствор № 5 Г для приготовления проявителя	1 фл., 14 мл
6	Конъюгат иммуноферментный	1 амп., 0,75 мл
7	Хромоген ГМБ	1 фл., 14 мл
8	Положительный контроль (К ⁺)	1 амп., 0,6 мл
9	Отрицательный контроль (К ⁻)	1 амп., 0,9 мл
10	Стоп-реагент	1 фл., 25 мл
11	Клейкая пленка	6 шт.

1. Подготовка к анализу

Выдерживают компоненты набора при температуре 18-22 °С в течение 30 мин.

1.1 Подготовка раствора № 1 для промывания планшета

Содержимое одного флакона концентрата раствора № 1 энергично встряхивают. Отбирают 6 мл раствора и разводят в 270 мл дистиллированной воды, перемешивают. Если концентрат раствора содержит кристаллы, его прогревают перед употреблением при 35-37 °С до полного растворения кристаллов.

Раствор можно сохранять при температуре 2-8 °С не более 5 суток.

1.2 Подготовка раствора конъюгата

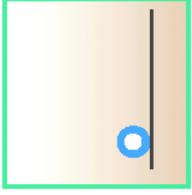
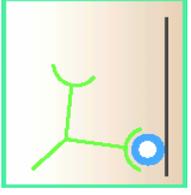
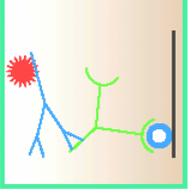
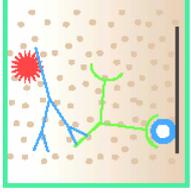
В чистый флакон отбирают 2 мл раствора № 4 для разведения конъюгата и добавляют 80 мкл конъюгата.

Материалом для обнаружения серологических маркеров могут быть все биологические жидкости организма, в которых содержится антиген или антитела к вирусу. Сегодня в серологической диагностике ГС наиболее распространено и отработано обнаружение специфических антител в сыворотке и/или плазме крови обследуемого лица методом ИФА.

Несмотря на то, что гуморальный иммунный ответ при ГС выражен слабо, против каждого из структурных и неструктурных белков ВГС синтезируются специфические антитела, по присутствию которых в периферической крови определяют серопозитивность в отношении ВГС; она свидетельствует о наличии заражения или о пережитой болезни. ОГС у 50-70 % больных анти-ВГС можно обнаружить уже в начале симптоматической фазы инфекции. В среднем же сероконверсия происходит через 3-6 недель от момента заражения, но этот промежуток может колебаться от 5 до 50 недель и зависит от способа заражения ВГС, а также от чувствительности диагностикумов. Промежутков времени, предшествующий сероконверсии, когда заражение ВГС уже произошло, но специфических антител в сыворотке крови еще нет или количество их столь незначительно, что они не определяются современными тест-системами ИФА, называют периодом «окна» (серонегативное, латентное, диагностическое «окно»). Описаны также случаи отсутствия анти-ВГС в крови при развитии клеточного иммунного ответа у больных со скрытой инфекцией, завершившейся без врачебного вмешательства.

Для определения специфических антител к ВГС применяют тест-системы, в большинстве которых использован принцип классического твердофазного непрямого ИФА (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Основные компоненты тест-систем – иммуносорбент и конъюгат, содержащий фермент. Иммуносорбент – это полистироловый или полихлорвиниловый планшет, лунки которого сенсibilизированы антигенами. Конъюгат представлен антителами против иммуноглобулинов человека, синтетическими или рекомбинантными пептидами, конъюгированными с ферментом. При наличии анти-ВГС в исследуемом образце антитела связываются с

Схема проведения ИФА

Процедура	Формирование комплекса
Полистироловые стрипы, сенсibilизированные рекомбинантными белками	
Внесение в лунки стрипов раствора для разведения образцов и образцов контролей и сывороток Инкубация 60 мин. при 37 °С – формирование комплекса АГ-АТ Промывание лунок буферным раствором 4 раза	
Внесение в лунки раствора конъюгата Инкубация 30 мин. при 37°С (образование комплекса с конъюгатом) Промывание лунок буферным раствором (6 раз)	
Внесение в лунки раствора проявителя Инкубация 30 мин. (окрашивание) Остановка реакции Регистрация оптической плотности	

МЕТОДИКА РАБОТЫ С ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ "DIA-НСУ"

Иммуноферментная тест-система "DIA-НСУ" предназначена для анализа сыворотки и плазмы крови человека на наличие антител против ВГС.

Принцип анализа

Главные компоненты набора – иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент – это полистироловый планшет, лунки которого сенсифицированы рекомбинантными полипептидами-аналогами антигенов NS3, NS4 и Core ВГС. Конъюгат – это моноклональные антитела против человеческих иммуноглобулинов класса IgG, пришитых к пероксидазе хрена.

При внесении в лунки планшета образцов исследуемых сывороток антитела, специфичные к ВГС, связываются с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, образуя комплексы антиген-антитело. Образовавшиеся комплексы обнаруживают при помощи специфического иммуноферментного конъюгата. После отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор проявителя – субстрата пероксидазы (перекиси водорода) и хромогена (3,3',5,5'-тетраметилбензидина – ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, добавив стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках; при длине волны 450 нм значение ОП пропорционально концентрации специфических антител в образцах сывороток или плазмы крови.

антигеном на твердой фазе 3 последующим образованием комплекса антиген-антитело. Индикатором для обнаружения комплекса служит проявитель – смесь субстрата с хромогеном. После присоединения конъюгата к комплексу антиген-антитело появляется окрашивание реакционной смеси, интенсивность которого определяют фотометрически по величине оптической плотности (ОП), которая линейно зависит от наличия и концентрации анти-ВГС в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови: чем выше концентрация, антител, тем интенсивнее окрашивание и, соответственно, значение ОП.

Современные диагностикумы ИФА представлены тест-системами 4-х поколений (ИФА-1, ИФА-2, ИФА-3, ИФА-4). Первую коммерческую тест-систему для выявления анти-ВГС создали в 1990 г. исследователи фирмы "Chiron Corporation". Основной этой тест-системы стали иммунореактивные олигопептиды, взаимодействующие с компонентами сывороток больных гепатитом "ни А, ни В". В тест-системах 1-го поколения как антиген использованы рекомбинантные белки-аналоги неструктурных белков вируса – NS3 та NS4. Появление на рынке первых тест-систем очень способствовало повышению качества диагностики гепатита "ни А, ни В" и, в первую очередь – уменьшению количества ППГ. Однако при работе с тестами ИФА-1 регистрировали значительную долю ложноположительных результатов, из-за чего часто производили необоснованную выбраковку большого количества донорской крови. Кроме того, эти диагностикумы были недостаточно чувствительны и определяли анти-ВГС в среднем через 30-90 дней после появления признаков ОГС (от момента появления желтухи, если развивалась желтуха) и, по расчетам, обнаруживали только 70-80 % лиц, зараженных ВГС. Если заражение произошло при переливании крови, т.е. самым «эффективным» путем, то тест-системы 1-го поколения определяли сероконверсию приблизительно на 16-й неделе после заражения, а чувствительность диагностикумов составляла в среднем 64 %.

Наряду с накоплением новых знаний о структуре ВГС совершенствовались также и серологические тесты для определения специфических маркеров заражения. Успехи в

области молекулярного клонирования генома ВГС помогли созданию рекомбинантных антигенов, отбору оптимальных иммунодоминантных эпитопов, что, в свою очередь, позволило создать на основе ИФА чувствительные и специфичные тест-системы последующих поколений (табл. 1). Тест-системы 2-го (с 1991 г.) и 3-го (с 1993 г.) поколения позволяют, благодаря присутствию добавочных рекомбинантных пептидов в составе иммуносорбента, определить анти-ВГС начиная, соответственно, с 20-25-го и 7-10-го дней с момента появления желтухи; таким образом можно обнаружить, соответственно, 92-95 % и 97 % лиц, зараженных ВГС. Средний период от заражения при переливании крови до сероконверсии, после которой ИФА-2 и ИФА-3 дают возможность выявить присутствие инфекции, составляет, соответственно, 10 и 7-8 недель. Диагностикумы 4-го поколения отличаются от предыдущих тем, что при создании их использованы рекомбинантные и синтетические пептиды, благодаря чему дополнительно повысилась специфичность тестирования.

Таблица 1. Иммуноферментные тест-системы для обнаружения антител к ВГС

Использованный иммуносорбент	Поколение тест-систем		
	I	II	III
Пептиды	5-1-1 C100-3	C22-3 C200 C33с C100-3	C22-3 C200 C33с пептид
Зоны генома ВГС, кодирующие пептиды	NS3 NS4	Core NS3 и NS4 NS3 NS4	Core NS3 и NS4 NS3 NS5

Сегодня наиболее широко используют тест-системы 3-го поколения, при помощи которых можно определять анти-ВГС к структурным (core) и неструктурным (NS3, NS4, NS5) белкам ВГС. По сравнению с ИФА-2, они имеют более высокие

Научно-производственная компания „Диапроф-Мед” серийно производит следующую продукцию для диагностики гепатита С:

“DIA-HCV” – высокоэффективная иммуноферментная тест-система для обнаружения антител к ВГС. Относится к третьему поколению тест-систем на основе ИФА и дает возможность определять антитела к структурному белку нуклеокапсида (core) и неструктурным белкам ВГС (NS3, NS4, NS5);

“DIA-C-HCV” – иммуноферментная тест-система для подтверждения присутствия антител к ВГС. Метод подтверждения основан на обнаружении антител к отдельным вирусным белкам ВГС (NS3, NS4, NS5, core).

- использовать для приготовления реактивов 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 минус 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 (пророслы), а также образцы, куда добавлен как консервант азид натрия, не годятся для анализа.

показатели чувствительности (благодаря введению NS5 в состав иммуносорбента). Чувствительность современных тест-систем 3-го поколения составляет в среднем 96 %. Этот показатель обусловлен уровнем распространения инфекции в обследованной популяции и зависит от контингентов обследуемых лиц. Так, при тестировании проб сывороток крови лиц из популяции с высоким уровнем распространения инфекции рассчитанная чувствительность ИФА-3 лежит в пределах от 98,8 до 100 %. При обследовании пациентов, находящихся на гемодиализе, лиц с нарушениями иммунной системы (лиц с пересадкой органов, костного мозга, ВИЧ-инфицированных) и при некоторых патологических состояниях чувствительность исследований ниже – 50-95 %. Что касается специфичности ИФА-3, то в среднем она не ниже 98 %, однако этот показатель зависит от ряда факторов. Ложноположительные результаты тестирования можно получить, прежде всего, при скрининге в популяции с низким уровнем распространения ВГС, например, среди доноров крови. Ложноположительные результаты исследования могут быть также обусловлены неспецифическим связыванием иммуноглобулинов сыворотки (плазмы) крови с компонентами иммуносорбента, например, при повышенном уровне γ -глобулинов (у больных ревматизмом, при некоторых новообразованиях и т.д.), при наличии у обследуемого лица аутоиммунных заболеваний, болезней соединительной ткани, при некоторых инфекциях (гепатит В, туберкулез), после введения некоторых иммунобиологических препаратов (например, вакцинация против ГВ), у беременных и в ряде других случаев, не связанных с диагностическими характеристиками тест-систем.

Сегодня нет метода обнаружения антител, который бы всегда гарантировал 100 %-ную точность результатов теста, но показатели, полученные при проверке образцов стандартных панелей при помощи современных тест-систем на основе ИФА, достигают или максимально приближаются к 100 %. Это справедливо и при обнаружении анти-ВГС: при обследовании разных групп лиц могут регистрироваться ложноположительные и ложноотрицательные результаты, даже при использовании

современных диагностикумов отличного качества, с высокими показателями чувствительности и специфичности.

Для максимального исключения возможных ложноположительных результатов все положительные результаты первичного обследования необходимо проверить при помощи подтверждающих и/или добавочных тестов. С этой целью применяют метод нейтрализации антител высокоочищенными антигенами, метод иммунного блота, определение антител к отдельным структурным и неструктурным белкам ВГС, молекулярно-биологические методы. Все перечисленные методические подходы используются в разных подтверждающих тест-системах. Подтвердить наличие анти-ВГС можно при помощи альтернативных вариантов ИФА, т.е. прибегнув к дополнительным тестам. Под словом «альтернативный» подразумевают, что диагностикум, применяемый для подтверждающих обследований, должен отличаться от предыдущего или поколением, или форматом (плащечный, шариковый), или принципом анализа (прямой, непрямой, «сандвич», конкурентный ИФА) и т.д. При этом все названные методы имеют свои достоинства и недостатки, и сегодня нет еще "золотого стандарта". В каждом конкретном случае, когда возникает необходимость в подтверждающих исследованиях, надо помнить о цели тестирования (обследование по эпидемическим или клиническим показаниям, перед назначением специфической терапии, скрининг донорской крови, определение фазы протекания ГС), учитывать распространение инфекции в данной популяции, степень риска заражения обследуемого лица, «парентеральный» анамнез и т.д.

Для подтверждения результатов первичного тестирования наиболее широко применяют метод рекомбинантного иммуноблота – RIBA; тест-системы для него создавались и совершенствовались параллельно с диагностикумами на основе ИФА. Сегодня наилучшие диагностические характеристики имеют RIBA 3-го поколения. Однако некоторые специалисты в области специфической диагностики ГС считают, что применение RIBA не всегда целесообразно при проведении подтверждающих исследований, т.к. результаты этого анализа

- наконечниками для дозаторов.

Добавочные реактивы, материалы и оборудование:

- вода дистиллированная;
- перекись водорода, 6 %;
- спирт этиловый, 70°;
- вата гипроскопическая;
- фильтровальная бумага;
- мерная склянка или цилиндр (1.000 мл);
- ванночки для реактивов;
- флаконы для реактивов (20 мл);
- 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;

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, разлчных 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 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 хромоген 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), который входят одноканальные пипетки переменного объема, рассчитанные на отмеривание 5-40, 40-200 и 200-1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки переменного объема на 5-50 та 50-200 мкл;

практически не дают никакой добавочной диагностической информации по сравнению с результатами ИФА, поскольку в тестах RIBA представлены те же антигены, что и в ИФА, но в «блотовом формате». К тому же диагностическая ценность RIBA значительно ограничена из-за получения некоторого количества неопределенных результатов, в первую очередь, при тестировании образцов сывороток с низким оптическим сигналом в первичном ИФА (тестам RIBA присущ более высокий показатель специфичности, чем ИФА, но чувствительность их ниже). Однако считают все же, что сегодня нельзя полностью отказываться от тестов на основе ИБ при обследованиях на ГС. Так, например, при проведении верификационных исследований на наличие анти-ВГС среди лиц с низким риском заражения, в популяции с небольшим уровнем распространения ВГС именно тест-системы RIBA оказались самыми целесообразными как с точки зрения эффективности подтверждающих исследований, так и из экономических соображений.

Сегодня в широкой лабораторной практике в большинстве случаев определяют суммарные антитела к ВГС или антитела, принадлежащие к иммуноглобулинам класса G. Корреляция между обнаружением анти-ВГС методом ИФА и обнаружением РНК вируса при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) составляет около 80 %; доказано, что наличие суммарных антител в 70-80 % случаев ОГС или при обострении ХГС свидетельствует о размножении вируса. Вместе с тем эти антитела часто оценивают лишь как «диагностическую пометку» или как ретроспективный маркер заражения. Действительно, определение самих лишь суммарных анти-ВГС (так же, как и вирусной РНК) не дает возможности отличать ОГС от ХГС, текущую инфекцию от уже пережитой, установить давность заражения и фазу заболевания. Однако нахождение суммарных анти-ВГС даже при отсутствии какой-либо симптоматики должно насторожить врача; логично продолжать наблюдение за таким больным, прибегнув к углубленному клинико-лабораторному обследованию, чтобы подтвердить или снять диагноз ГС. Вместе с тем на рынке появляются тест-системы, дающие возможность обнаружить антитела к отдельным белкам

ВГС, различать классы выявляемых антител (IgG, IgM). Как уже сказано, диагностика, обнаруживающие антитела к отдельным структурным и неструктурным белкам ВГС, можно применять для верификации результатов первичного тестирования. К тому же эти тест-системы дают определенную диагностическую информацию (таблица 2).

Таблица 2 Маркеры заражения ВГС на разных стадиях инфекционного процесса

Гепатит С	Маркеры заражения	
	Серологические	РНК вируса
Острая фаза	<input type="checkbox"/> вначале в крови находят только анти-ВГС core IgM, анти-NS3 (возможно присутствие анти-NS3, анти-NS4* и анти-NS5 одновременно); <input type="checkbox"/> постепенное нарастание титров анти-ВГС core IgG.	+
Выздоровление**	<input type="checkbox"/> анти-ВГС core IgM исчезают после 8-й недели заболевания; Определяются анти-ВГС IgG**** (годы)	Не определяется
Латентная фаза ХГС	<input type="checkbox"/> стабильный уровень анти-ВГС core IgG; <input type="checkbox"/> высокое содержание анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5; <input type="checkbox"/> возможно периодическое обнаружение анти-ВГС core IgM – обострение	Не определяется или обнаруживается в низких

* Анти-NS4 могут обнаруживаться при разных формах инфекционного процесса ГС.

** Критерии выздоровления от ГС окончательно не установлены: все случаи заболевания, длящегося свыше 6 месяцев, расценивают как хроническую инфекцию ВГС.

*** У большинства больных циркуляция специфических антител прекращается через 18-20 лет после выздоровления.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

В последние годы ИФА стал одним из самых распространенных методов исследования. Благодаря успехам биотехнологии и геной инженерии удается получать высокоочищенные белки-антигены, разнообразные поли- и моноклональные антитела заданной специфичности и афинности, ферменты-маркеры и конъюгаты ферментов с антигенами и антителами.

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

ИФА ныне наиболее распространен благодаря ряду безоговорочных преимуществ. К ним относят высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов, возможность использовать минимальные объемы исследуемых проб биологических жидкостей, доступность и стабильность реагентов, простоту и скорость проведения реакции, инструментальный учет полученных результатов и автоматизацию почти всех этапов ИФА, возможность проведения массовых анализов и, не в последнюю очередь, относительно низкую стоимость диагностических наборов. Следует отметить, что хотя существует несколько вариантов ИФА, во всех их используют конъюгат фермента со специфическими или противоядовыми антителами или антигенами и проявитель (смесь субстрата с хромогеном); в результате ферментативной реакции с субстратом получают продукт, окрашиваемый под действием хромогена. Это позволяет визуально или автоматически оценивать наличие антигенов или антител в исследуемом материале.

Терминология

Антиген (“иммуноген”) – это вещество, вызывающее появление специфического иммунного ответа и специфически

печени, назначить и коррегировать противовирусную терапию. Если предвидят специфическое лечение, то спектр лабораторных тестов должен включать установление генотипа вируса, качественные и количественные молекулярно-генетические исследования или вместо них – определение анти-ВГС core IgM и антител к отдельным белкам вируса. Если обследуют ребенка в возрасте 6-15 месяцев, рожденного ВГС-зараженной матерью, то не следует определять антител против возбудителя, т.к. они могут быть пассивно перенесены от матери; в таком случае рекомендуют определить наличие вирусной РНК.

При обследованиях по эпидемическим показателям наиболее информативные специфические маркеры заражения – это суммарные антитела против ВГС, а также анти-ВГС core IgM. К подтверждающим исследованиям надо подходить обдуманно: если риск заражения высокий, то целесообразно проводить верификацию с использованием добавочных тестов ИФА, а если низкий – методом ИБ; неопределенные результаты серологической диагностики требуют подтверждения методом ПЦР. Для установления источника инфекции принесут пользу исследования, позволяющие определить генотип вируса.

Алгоритм первичных и подтверждающих серологических и молекулярно-биологических исследований с профилактической целью зависит от того, к какой группе риска принадлежит обследуемое лицо. При проведении сероэпидемиологических исследований достаточно провести определение суммарных анти-ВГС.

Фаза реактивации ХГС	<input type="checkbox"/> обнаружение анти-ВГС core IgM в высоких титрах; <input type="checkbox"/> анти-ВГС core IgG, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5	титрах
		+

После заражения ВГС первыми в сыворотке появляются специфические антитела класса IgM (анти-ВГС core IgM) к *core*-белку ВГС. Присутствие этих антител, как правило, совпадает с наличием виремии и повышенной активностью АЛАТ (иногда у отдельных пациентов активность АЛАТ не повышается). Корреляция между обнаружением вирусной РНК в сыворотках крови и анти-ВГС core IgM, по разным данным, составляет 77-92 %. При этом анти-ВГС core IgM обнаруживается в сыворотках крови 50-93 % больных с ОГС и у 50-70 % больных с ХГС. Несколько позже находят анти-NS3 (возможно присутствие анти-NS3, анти-NS4 и анти-NS5 одновременно), а затем – анти-ВГС core IgG. Экспрессия NS3 совпадает с усиленным размножением ВГС, а концентрация анти-NS3 постепенно снижается в течение года, после чего прекращается виремия. Белок, кодированный вирусным геном NS4, считается наиболее иммуногенным; его экспрессия мало меняется при разных формах ГС, и анти-NS4 может быть обнаружен почти у 100 % лиц, зараженных ВГС.

Наличие антител к NS4 в ряде случаев напрямую подтверждает активное размножение ВГС при ХГС, а обнаружение их у больных с ОГС может говорить о начале хронизации гепатита. Что касается значения анти-NS5, то здесь у исследователей нет единого мнения. Хотя показано, что в сыворотках около 5 % зараженных лиц присутствуют антитела только к этому антигену. В целом, обнаружение антител к NS5, коррелирует с наличием вирусной РНК при нормальных биохимических показателях крови. Во всяком случае, этот белок – необходимый компонент иммуносорбента при создании тест-систем для нахождения антител к ВГС на основе ИФА.

Следует помнить, что обнаружение антител к разным белкам ВГС при помощи ИФА информативно только в том

случае, когда серологические исследования проводятся систематически в динамике инфекционного процесса, с учетом того, что постоянно будет определяться определенный спектр антител при использовании тех же диагностических систем (результаты тестирования в значительной степени зависят от набора антигенов ВГС в составе иммуносорбента). Что же касается одноразового обнаружения антител к отдельным белкам ВГС, то истолкование результатов такого анализа может быть неоднозначным (таблица 3).

Таблица 3. Варианты интерпретации результатов при обнаружении антител к ВГС

Маркеры заражения	Трактовка результатов исследования
Анти-ВГС (суммарные)	ОГС
	ХГС
	Ретроспективный маркер паст-инфекции
Анти-ВГС core IgM + анти-ВГС core IgG	ОГС
	Паст-инфекция
	Переход в латентную фазу ХГС
Анти-ВГС core IgG + антитела против неструктурных белков ВГС	Начало выздоровления
	Латентная фаза ХГС
Анти-ВГС core IgM + анти-ВГС core IgG + анти-ВГС против неструктурных белков ВГС	ОГС
	Обострение латентной фазы ХГС
	Фаза реактивации ХГС

Молекулярно-биологические методы

В последнее время в диагностику все более внедряются молекулярно-биологические методы обнаружения РНК ВГС, основанные на гибридизации и амплификации нуклеиновых

кислот (Nucleic Acid Amplification Technologies, NAT). Эти методы предназначены для обнаружения генетического материала ВГС, количественного определения вирусной РНК, характеристики вирусного генома, изучения мутаций и т.д. При помощи этих методов можно обнаружить РНК ВГС, встроенную в геном зараженных клеток при отсутствии в сыворотке крови вирусоспецифических антител или при их количестве, недостаточном для выявления доступными серологическими методами. РНК ВГС можно обнаружить уже на 7-21-й день после заражения, т.е. на несколько недель раньше, чем антитела против вируса. Как материал для исследования можно использовать образцы, выделенные не только из недавно полученных биосубстратов, но и из замороженных, высушенных или фиксированных проб, содержащих частично разрушенные нуклеиновые кислоты.

НПК „Диапроф-Мед” сейчас начинает выпуск тест-наборов „DIA-Amplisense HCV-Monitor” для количественного обнаружения РНК ВГС методом ПЦР с использованием обратной транскрипции.

Обнаружение комплекса специфических диагностических маркеров ВГС

Обнаружение комплекса специфических диагностических маркеров ВГС должно осуществляться в зависимости от цели и задач исследования, что и обосновывает определенный набор необходимых методологических подходов и соответствующих тестов.

Если обследование проводят с диагностической целью, то на первом этапе следует проводить тестирование на суммарные анти-ВГС методом ИФА. При получении положительного результата первичного анализа целесообразно использовать для подтверждения ту же тест-систему на основе ИФА или альтернативный добавочный диагностикум на основе ИФА для анализа повторно взятой сыворотки крови. Положительный результат повторного тестирования диктует необходимость углубленного клинико-лабораторного обследования, чтобы установить стадию инфекционного процесса, меру повреждения