

УДК: 616.36-002.1-022-078.33

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМ «ВЕКТОР-БЕСТ» И «MONOLISA» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С

Невзорова М.С., Высотин С.А., Сайфитова А.Т.

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, России

Специальность 14.03.10

Цель исследования: сравнить результаты определения антител к вирусу гепатита С в сыворотке крови методом ИФА двух тест-систем **Материалы и методы.** Для достижения поставленной цели было проведено скрининговое обследование 7814 человек на обнаружение анти-НСV АТ методом ИФА. Для выявления в сыворотках крови антител к ВГС (IgG и IgM) применялись 2 тест — системы: «Бест-анти ВГС (комплект 1/стрип)» и Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2”. Для сравнительного анализа двух тест — систем было поставлено параллельно 57 тестов. Полученные результаты подверглись статистической обработке определения экстенсивных показателей с помощью программы Microsoft Excel 2010.В результате исследования было установлено, что АТ к вирусу гепатита С обнаружены в 7 % случаев (у 537 из 7 814 пациентов). Анти — НCV АТ были обнаружены у 213 мужчин, что составило 10% и у 324 женщин, что составляет 6%. Ложноположительная реакция наблюдалась у 42 пациентов. Параллельное исследование показало, что в 28 % случаев, набор Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2” дал отрицательный результат, набор «Бест — анти ВГС» - положительный. В подтверждающей тест-системе в большинстве образцов крови присутствовал только нуклеокапсидный белок core или только неструктурные белки NS₃ - NS₅ т. е. систематическое использование данной тест-системы для диагностики гепатита С может привести к снижению выявления антител к вирусу. **Заключение.** Алгоритм диагностики гепатита С должен строго соблюдаться, в соответствии с СП 3.1.3112 — 13 «Профилактика вирусного гепатита С». Наличие антител к вирусу гепатита С должно быть подтверждено с помощью специального подтверждающего диагностического набора.

Ключевые слова: гепатит С, диагностика, тест-система

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF "VECTOR-BEST" AND "MONOLISA" SETS FOR DETERMINATION OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS

Nevzorova M.S., Vysotin S.A., Sayfitova A.T.

E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm

The aim of the study is to compare the results of detection of antibodies to hepatitis C virus in blood serum by IFA method of two test systems **Materials and methods. To achieve this goal, 7,814 people were screened for detection of anti-HCV AT by the IFA method. In order to detect antibodies to HCV (IgG and IgM) in blood serums, 2 tests were used: "Best-anti HCV (set 1/strip)" and Monolisa "Anti - HCV PLUS Version 2". For comparative analysis of two tests - systems 57 tests were delivered in parallel. The results were statistically processed to determine extensive indicators using Microsoft Excel 2010.В a result of the study, it was found that AT to hepatitis C virus was found in 7% of cases (537 out of 7,814 patients). Anti-HCV AT was found in 213 men, which was 10% and in 324 women, which is 6%. False positive response was observed in 42**

patients. A parallel study showed that in 28% of cases, the set Monalisa "Anti - HCV PLUS Version 2" gave a negative result, the set "Best - anti HCV" - positive. In the confirmation test system, only nucleocapsid core protein or only non-structural NS₃ proteins were present in most blood samples - NS₅ is, the systematic use of this test system to diagnose hepatitis C can lead to a decrease in the detection of antibodies to the virus. Conclusion. The algorithm of hepatitis C diagnostics shall be strictly observed, in accordance with SP 3.1.3112 - 13 "Prevention of viral hepatitis C". The presence of antibodies to hepatitis C virus should be confirmed by a special confirmation diagnostic kit.

Keywords: hepatitis C, diagnostics, test system

В настоящее время в Российской Федерации, как и в большинстве стран, сложилась неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по парентеральному вирусному гепатиту. С 2001 года в нашей стране наблюдается тенденция к снижению заболеваемости острым гепатитом С (ОГС) [4]. После 2004 года выявление людей с хроническим гепатитом С (ХГС) стало снижаться. Однако до 2006 года наблюдалось увеличение числа больных ХГС среди детей. По данным специалистов, 1,4 - 2,4% граждан РФ заражены вирусом гепатита С (ВГС), при этом большинство этих людей уже имеют хроническую форму инфекции. ХГС характеризуется прогрессирующим течением, приводящим к циррозу печени (до 30%), первичной гепатоцеллюлярной карциноме (до 15%) и экстракорпоральным проявлениям (до 74%) [9]. Вирус гепатита С - уникальный патоген, который может уйти от иммунного контроля, создавая новые генетические и антигенные варианты, задерживая образование Т-хелперного и Т-киллерного ответа при остром гепатите С и вызывать повторную инфекцию у выздоровевших людей. Интенсивное изучение инфекции HCV началось после идентификации её возбудителя в 1989 году и в первую очередь преследовало главную цель - создание профилактической вакцины [3, 5].

ВГС - вирусное заболевание, которое чаще всего возникает в виде посттрансфузионного гепатита с преобладанием безжелтушной и легких форм и склонно к хроническому протеканию процесса [7, 8]. Возбудитель - ВГС, содержит РНК. Геном HCV представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК, которая кодирует 3 структурных (нуклеокапсидный белок core и нуклеопротеиды оболочки E1 - E2) и 5 неструктурных (NS₁, NS₂, NS₃, NS₄, NS₅) белков. Антитела (АТ), обнаруженные в крови пациентов с ВГС, синтезируют к каждому из этих белков.

Отличительной особенностью ВГС является волнообразное течение заболевания, при котором выделяют три фазы: острую, латентную и фазу реактивации. Острая фаза характеризуется повышенной активностью печеночных ферментов в сыворотке крови, содержащей классы АТ IgM и IgG (к нуклеокапсидному белку core) к

HCV с ростом титров, а также РНК HCV. Латентная фаза характеризуется отсутствием клинических проявлений, наличием в крови АТ класса IgG (к нуклеокапсидному белку core и неструктурным белкам NS₁ - NS₅) к HCV в высоких титрах, отсутствии АТ класса IgM и РНК HCV или их присутствии в низких концентрациях на фоне небольшого увеличения активности печеночных ферментов в периоды обострения. Фаза реактивации характеризуется появлением клинических признаков, повышенной активностью печеночных ферментов, наличием АТ класса IgG (к нуклеотидному белку core и неструктурным белкам NS) в высоких титрах, наличием HCV РНК и ростом титров АТ класса IgM до HCV в динамике [6, 9].

АТ к HCV в сыворотке крови в норме отсутствует. Диагноз ВГС на основании выявления суммарных АТ к HCV методом ИФА, которые появляются в первые 2 недели заболевания и указывают на возможное заражение вирусом или перенесенной инфекцией. Анти-HCV АТ может сохраняться в крови реконвалесцентов в течение 8 - 10 лет с постепенным снижением их концентрации. Обнаружить АТ можно более года и более после заражения [1, 2]. При хронической ВГС АТ определяют постоянно и в более высоких титрах. Большинство тест-систем, используемых в настоящее время для диагностики ВГС, основаны на определении АТ класса IgM, что позволяет верифицировать активную инфекцию. АТ класса IgM можно обнаружить не только при ОГС, но и при ХГС. Снижение их числа во время лечения пациентов ХГС может свидетельствовать об эффективной лекарственной терапии. В острой фазе инфекции отношение АТ IgM/IgG составляет от 3 до 4 (преобладание АТ IgM указывает на высокую активность процесса). По мере выздоровления это соотношение уменьшается в 1,5-2 раз, что указывает на минимальную репликационную активность [9].

Выявление суммарных АТ IgG к HCV методом ИФА недостаточно для диагностики ВГС, необходимо подтвердить их наличие методом иммуноблоттинга, чтобы исключить ложноположительный результат исследования. Пациента исследуют на наличие IgG класса АТ к различным белкам HCV и IgM класса АТ к HCV в динамике. Результаты серологического исследования вместе с клинико-эпидемиологическими данными позволяют установить диагноз и стадию заболевания, что играет важную роль для правильного выбора метода лечения. В основе ИФА лежит иммунная реакция взаимодействия антиген с антителом. Для обнаружения образовавшихся иммунных комплексов используют фермент, который предварительно метится узнающий компонент (антиген или антитело). Сам фермент визуализируют с использованием хромогенного медиатора, продуцирующего цвет. Превращение

бесцветного хромогена в окрашенное вещество хромофор, который несет цвет, происходит под действием фермента, для которого хромоген является субстратом [2].

Цель исследования: сравнить результаты определения антител к вирусу гепатита С в сыворотке крови методом ИФА двух тест-систем.

Материалы и методы.

Для достижения поставленной цели было проведено скрининговое обследование 7814 человек на обнаружение анти-НСV АТ методом ИФА. Было обследовано 2266 мужчин, что составило 29% и 5548 женщин (71%), дети в возрасте до 15 лет составили ,4% (267 человек). Иммуноферментный анализ проводят в несколько этапов:

1) проведение иммунной реакции: получение иммунохимического комплекса в результате поэтапного или одномоментного добавления иммунных реагентов, один из которых содержит ферментную резку;

2) промывка твердой фазы, целью которой является удаление не связавшихся компонентов;

3) проведение ферментативной реакции, начинающейся после добавления раствора субстрата и хромогена с последующим внесением стоп-реагента для остановки реакции;

4) учет результатов анализа;

5) оценка результатов анализа.

Регистрация результатов иммуноферментного анализа заключается в оценке степени окрашивания основной части индикаторной полоски, измерении оптической плотности окрашенных растворов или интенсивности флуоресценции и хемилуминесценции. При исследовании, для выявления в сыворотках крови антител к ВГС (IgG и IgM) применялись 2 тест — системы:

- «Бест-анти ВГС (комплект 1/стрип)»
- Monolisa «Anti — HCV PLUS Version 2»

Для сравнительного анализа двух тест — систем было поставлено параллельно 57 тестов исследования уровня антител к ВГС методом ИФА наборами «Бест — анти ВГС» и Monolisa «Anti — HCV PLUS Version 2». Полученные результаты подверглись статистической обработке определения экстенсивных показателей с помощью программы Microsoft Excel 2010.

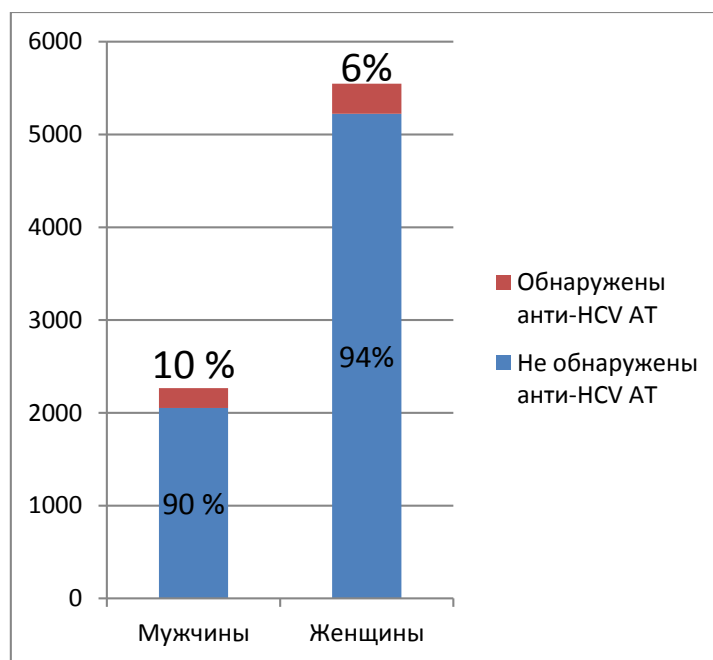
Результаты исследования и их обсуждения.

Тест — системы представляют собой набор реагентов, основой которых являются рекомбинантные антигены ВГС, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS) областью генома ВГС,

иммобилизированные на поверхности лунок полистироловых планшетов. Основным свойством набора является способность выявлять в сыворотках крови человека антитела к ВГС (IgG b IgM) за счет их взаимодействия с рекомбинантными антигенами, иммобилизованными на поверхности лунок планшета. Образование комплекса антиген — антитело вызывают с помощью иммуноферментного конъюгата.

Полученные результаты обследования 7814 человек установили, что антитела к вирусу гепатиту С были обнаружены в 7 % случаев (537 человек). Из 537 человек анти — HCV AT были обнаружены у 213 мужчин, что составило 40 % и у 324 женщин, что составляет 60%. При сопоставлении исследуемых по полу результаты исследований показали, что у обследованных женщин (6%) 1,5 раза реже, чем у мужчин (10%) обнаруживаются анти — HCV AT (Рисунок 1).

Рисунок 1. Выявляемость положительных результатов при ВГС – скрининге в зависимости от пола



Положительная реакция на антитела подтверждалась тест-системой «Бест анти-ВГС» (набор реагентов для подтверждения наличия иммуноглобулинов классов G и M к вирусу гепатита С). Данный набор предполагает дифференцированное определение антител к структурным (core) и неструктурным (NS 3-5) белкам вирусной частицы.

Одновременное присутствие core и NS белков в крови наблюдалось у 76,5% мужчин и у 66 % женщин. В то же время антитела только к ядерным белкам были обнаружены у 15% женщин и у 8% мужчин. Только NS антитела выявлены у 12% женщин и 6% мужчин. Из 537 положительных исследований наличие антител к вирусу гепатита С было подтверждено у 495 пациентов. В 42 (22 женщины и 20 мужчин)

случаях наблюдалась ложноположительная реакция, которая не была подтверждена в подтверждающем тесте.

В 57 образцах сыворотки крови определение антител было выполнено параллельно в двух тест-системах: «Бест — анти ВГС» и Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2. При проведении сравнительно скрининга двух систем были получены следующие результаты. В обоих тест-системах в 72 % случаях, в 41 из 57 образцов – реакция на антитела положительная. В подтверждающем тесте наличие антител подтверждено. В 16 тестах, что составило 28 %, было установлено несоответствие результатов исследования уровня антител к ВГС наборами «Бест — анти ВГС» и Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2.

При анализе несоответствующих результатов было установлено: в 14 тестах (87%) набор Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2 дал отрицательный результат, набор «Бест — анти ВГС» - положительный. В подтверждающей тест-системе в этих образцах сывороток крови присутствовал только нуклеокапсидный белок core или только неструктурные белки NS₃ - NS₅; и только в одном образце были обнаружены оба вида антител.

В 2 образцах сыворотки набор Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2” дал положительный результат на антитела к ВГС, при отрицательном результате в подтверждающей тест-системе (нуклеокапсидный белок core и неструктурные белки NS₃ - NS₅ не обнаружены).

Таблица № 1

№ пробы	Monolisa «Anti — HCV PLUS Version 2»	«Бест — анти ВГС» (подтверждающий тест)
1	0,188 «-»	«+» NS +
2	0,178 «-»	«+» NS +
3	0,094 «-»	«+» NS +
4	0,164 «-»	«+» NS + core +
5	0,331 «-»	«+» NS +
6	0,291 «-»	«+» NS +
7	0,290 «-»	«+» NS +
8	0,265 «-»	«+» NS +
9	0,059 «-»	«+» NS + core -
10	0,050 «-»	«+» NS +

11	0,047 «-»	«+» NS +
12	0,398 «-»	«+» NS + core -
13	0,186 «-»	«+» NS + core -
14	0,281 «-»	«+» NS +
15	0,305 «+»	«-» NS + core -
16	0,277 «+»	«-» NS + core -

Заключение

Таким образом, было установлено, что АТ к вирусу гепатита С обнаружены в 7 % случаев (у 537 из 7 814 пациентов). Анти — HCV АТ были обнаружены у 213 мужчин, что составило 10% и у 324 женщин, что составляет 6%. В 495 случаях наличие антител было подтверждено при помощи специального набора реагентов для подтверждения наличия иммуноглобулинов классов IgG и IgM к вирусу гепатита С. Ложноположительная реакция наблюдалась у 42 пациентов. Алгоритм диагностики гепатита С должен строго соблюдаться, в соответствии с СП 3.1.3112 — 13 «Профилактика вирусного гепатита С» [10]. Наличие антител к вирусу гепатита С должно быть подтверждено с помощью специального подтверждающего диагностического набора. Параллельное исследование сывороток крови в двух диагностических тест-системах «Бест — анти ВГС (комплект 1/ стрип)» и Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2” показало, что в 28 % случаев, набор Monolisa “Anti — HCV PLUS Version 2” дал отрицательный результат, набор «Бест — анти ВГС» - положительный. В подтверждающей тест-системе в большинстве образцов крови присутствовал только нуклеокапсидный белок core или только неструктурные белки NS₃ - NS₅ т. е. систематическое использование данной тест-системы для диагностики гепатита С может привести к снижению выявления антител к вирусу.

Список литературы.

1. Бушманова А.Д., Сухорук А.А., Иванова Н.В., Эсауленко Е.В. Характеристика вирусного гепатита А на фоне хронического вирусного гепатита С // Казанский медицинский журнал. 2017. Т.98. №4. С.521-526
2. Воропаев Е.В., Воропаева А.В., Зубов С.В., Павлович И.Л., Калинин А.Л., Жаворонок С.В. Использование метода иммуноферментного анализа для контроля за спектром антител к антигенам вируса гепатита С // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2000. №3. С.73-74

3. Дерябин Н.Г. Гепатит С: современное состояние и перспективы // Вопросы вирусологии. 2012. №S1. С.91-103
4. Ершова О.Н., Шахгильдян И.В., Коленова Т.В., Кузин С.Н., Самохвалов Е.И., Кириллова И.Л., Розова А.В. Естественные пути передачи вируса гепатита С – современный взгляд на проблему // Детские инъекции. 2006. №1. С.16-18
5. Кудрявцева Е.Н., Ястребова О.Н., Растегаева А.И., Корабельникова М.И., Кузина Л.Е., Брагинский Д.М., Мартынюк А.П., Лебедева Е.И., Сметанникова М.А., Туманова О.Ю., Кузин С.Н. О проблеме верификации результатов скрининговых исследований по определению антител к вирусу гепатита С // Альманах клинической медицины. 2011. №4. С.53-59
6. Кудрявцева Е.Н., Корабельникова М.И., Кузина Л.Е. Региональная программа внешней оценки качества определения антител к вирусу гепатита С // Альманах клинической медицины. 2012. №26. С.39-44
7. Николаева Л.И., Петрова Е.В., Макашова В.В., Токмалаев А.К., Рослый И.М. Динамика специфических антител при интерферонотерапии больных вирусным гепатитом С // Инфекционные болезни. 2004. Т.2. №; С.22-46
8. Николаева Л.И., Макашова В.В., Петрова Е.В., Шипулин Г.А., Самохвалов Е.И., Токмалаев А.К., Львов Д.К. Снижение содержания антител к вирусу гепатита С при антивирусной терапии // Биомедицинская химия. 2009. Т.55. №2. С.201-212
9. Попонин Д.М., Горовиц Э.С., Тимашева О.А. Динамика титров специфических антител к белкам вируса гепатита С у лиц с острым вирусным гепатитом С на разных стадиях инфекционного процесса // ПМЖ. 2015 Т.22. №2. С.37-42
10. СП 3.1.3112 – 13 «Профилактика вирусного гепатита С» от 22.12.2013