

ДП Науково-технічний центр імунології  
НТК „Інститут монокристалів” НАНУ  
Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім.  
Л.В.Громашевського АМНУ  
АТЗТ НВК “Діапроф-Мед”

## **СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГЕПАТИТУ С**

**Практичний посібник**

Київ-2004

УДК 616.36-002.2-078

## СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГЕПАТИТУ С

Практичний посібник

Під редакцією доктора медичних наук,  
професора Гураля А.Л.

Автори:

А.Л.Гураль, Т.А.Сергеева, В.Р.Шагінян, Н.В.Іванська,  
Г.С.Раєвська, Т.В.Кас'яненко, В.О.Шеховцов

Для лікарів-лаборантів епідеміологів, вірусологів, лікарів  
інфекційного та загального терапевтичного профілю, біологів.

Київ, „Діапроф-Мед”, 2004

## Зміст

Скорочення використані в тексті посібника	3
Вступ	4
Етіологія	5
Патогенез	7
Епідеміологія	11
Лабораторна діагностика	17
Імуноферментний аналіз	29
Методика роботи з імуноферментною тест-системою „DIA-НСУ”	33
Характеристика показників якості	39
Методика роботи з імуноферментною тест-системою „DIA-С-НСУ”	41
Література	47

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.
- Скорочення, використані в тексті посібника:
- АГ – антиген;  
 Анти-ВГС – антитіла проти вірусу гепатиту С;  
 АТ – антитіло;  
 АлАТ – аланін амінотрансфераза;  
 ВГС – вірус гепатиту С;  
 ГС – гепатит С;  
 ГГС – гострий гепатит С;  
 ГЗ – граничне значення (показника оптичної густини);  
 ДІСК- Державний інститут стандартизації та контролю якості медичних біологічних препаратів ім. Л.О.Тарасевича, РФ  
 ІБ – імуноблот;  
 ІПСШ – інфекції, що передаються статевим шляхом;  
 ІФА – імуноферментний аналіз;  
 К<sup>+</sup> – позитивна контрольна проба;  
 К<sup>-</sup> – негативна контрольна проба;  
 ЛПС – лікувально-профілактичний заклад;  
 ОГ – оптична густина;  
 ОФД – ортофенілдіамін (о-фенілдіамін);  
 ПЛР – полімераза ланцюгова реакція;  
 ППТ – посттрансфузійний гепатит С;  
 РНК – рибонуклеїнова кислота;  
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;  
 ХГС – хронічний гепатит С;  
 ЦМВ – цитомегаловірус;  
 ВВІ – Boston Biomedica Inc.;  
 ВСРІ – Bio Clinical Partners Inc.;  
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередження захворювань;  
 ЕАДІ – Європейська асоціація по вивченню печінки;  
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз, ТІФА;  
 HVR – гіперваріабельна ділянка генома ВГС;  
 IgG, IgM – імуноглобуліни класів G і M;  
 NASBA, NAT, RT-PCR – модифікації ампліфікаційних методів.

## ВСТУП

Гепатит С (ГС) посідає одне з чільних місць в інфекційній патології людини і становить актуальну проблему медичної науки та практичної охорони здоров'я в усіх країнах світу. За експертними оцінками, у світі інфіковано вірусом гепатиту С понад 500 млн. чоловік.

Медична та соціальна проблематика гепатиту С зумовлена не тільки його широким розповсюдженням, але й вкрай згубними наслідками, до яких може призвести це захворювання. Гострий ГС у більшості випадків перебігає з мінімальною клінічною симптоматикою. Жовтяниця та інші клінічні прояви інфекції відмічаються приблизно лише у 20 % хворих, тоді як у 50-85 % інфікованих вірусом ГС (ВГС) розвивається хронічний гепатит, який і є основною клінічною формою цього захворювання. Багаторічна персистенція вірусу при хронічному ГС може викликати розвиток цирозу печінки з наступним високим ризиком виникнення гепатоцелюлярної карциноми. Згідно з матеріалами Європейської асоціації по вивченню печінки (EALS), ГС – це причина 40 % випадків цирозу печінки та 60% випадків гепатоцелюлярної карциноми і найпоширенішим показанням до пересадки печінки. За прогнозами ВООЗ, протягом наступних 10-20 років хронічний ГС стане основною проблемою національних органів охорони здоров'я, бо кількість хворих на цироз печінки може збільшитися на 60%, пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою – на 68 %, хворих з декомпенсацією печінки – на 280 %; смертність від захворювань печінки може зрости вдвічі.

Не зважаючи на інтенсивне вивчення гепатиту С і досягнутий при цьому суттєвий прогрес, поточний стан розробки проблем епідеміології, діагностики, клініки, лікування та профілактики все ще не дозволяє успішно вирішувати проблеми, що пов'язані з обмеженням поширення збудника, зниженням захворюваності на ГС та профілактикою розвитку хронічних уражень печінки. Один з важливіших напрямків боротьби з ГС – своєчасне виявлення заражених осіб, призначення в разі необхідності специфічної терапії та перевірка її ефективності.

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.
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 1, January 2001 / WHO/BCT/BST/01.2.

11. Майер К.-П. Естественное течение и диагностика вирусного гепатита С // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – № 4. – С. 21-32.
12. Мариевский В.Ф., Гураль А.Л., Шагинян В.Р. Сероэпидемиологическое изучение гепатита С как внутрибольничной инфекции // Проблемы медицинской науки та освіти. – 2000. – № 2. – С. 23-27.
13. Михайлов М.И. Лабораторная диагностика гепатита С (серологические маркеры и методы их выявления) // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2001. – № 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. – № 2. – С. 11-16.
18. Шахильдян И.В. Характеристика групп высокого риска инфицирования вирусом гепатита С // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2000. – № 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. Мухина. – 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. // "Экспериментальная і клінічна медицина. – 2001. – № 2. – С. 74-77.
21. Является ли репликация вируса гепатита С маркером степени активности инфекционного процесса? По данным полимеразной цепной реакции и морфологического анализа биопсий печени / Непомнящих Г.И., Толоконская Н.П., Айдагулова С.В. и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 3. С. 343-348.

## Етіологія

ВГС – це перший вірус, ідентифікований шляхом молекулярного клонування без застосування прямих біологічних або біофізичних методів, при відносній відсутності відомостей про природу цього інфекційного агенту. ВГС належить до родини Флавівірусів (Flaviviridae) окремого роду Гепативірусів (Hepacivirus). Це дрібний вірус діаметром до 30-60 нм, вкритий білково-ліпідною оболонкою (рис. 1).

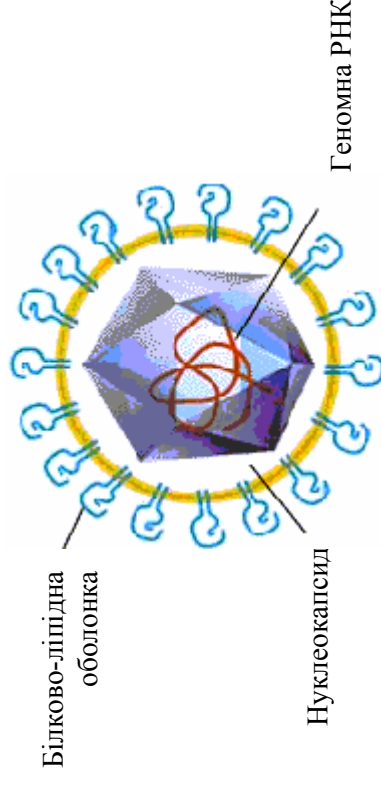


Рис. 1 Схема будови вірусу гепатиту С

ВГС стійкий проти нагрівання до 50 °С; при температурі 60 °С він інактивується протягом 30 хв, при 100 °С – за 2 хв. Вірус можна знешкодити формаліном у розведенні 1:1.000 протягом 96 годин при температурі 37 °С; він чутливий до ультрафіолетового опромінення, дії хлороформу. Термін напівжиття віріону ВГС у сироватці крові складає менш як 3 години; мінімальний рівень продукції/кліренсу ВГС становить 10<sup>12</sup> синтезованих віріонів на добу.

Геном ВГС представлений одноланцюговою лінійною молекулою РНК, що складається з 9.400-9.500 нуклеотидів, має відкрити рамку зчитування, де закладено інформацію про вірусоспецифічний поліпептид (біля 3.000 амінокислотних залишків). У ньому виділяють регіони 5' та 3', що, відповідно, кодують структурні та неструктурні білки (рис. 2). Розрізняють 3

структурних<sup>1</sup> білки: нуклеокапсидний «серцевинний» білок С (core protein, p19) і 2 білки зовнішньої оболонки (envelope proteins), кодовані зонами E1 (p18 і gp33) та E2/NS1 (p38 і gp72); ці глікозилізовані білки відіграють роль у прикріпленні і проникненні вірусу в клітину. До неструктурних належать білки, кодовані ділянками генома NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b. Зазначені білки виконують функції протеази, хелікази, РНК-залежної РНК-полімерази і необхідні для репродукції вірусу.

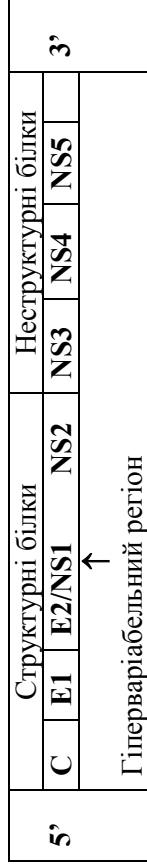


Рис. 2 Схеми організації генома ВГС

ВГС належить до збудників із надзвичайно високою гетерогенністю генома, переважно в ділянках РНК, що кодують вірусні оболонкові білки. Виявлено дві гіперваріабельних ділянки (hypervariable regions, HVR) генома, HVR1 і HVR2, розташованих в N-кінцевій частині E2, із високою частотою заміни амінокислотних залишків. Найбільш консервативними вважають ділянки генома, відповідальні за С-білок та білки NS5. Аналіз нуклеотидних послідовностей РНК в ізолятах з різних регіонів світу дозволяє, в залежності від міри подібності геномів, виділити, за різними класифікаціями, 6 або 11 основних генотипів і понад 100 субтипів. У генотипах ступінь гомології нуклеотидних послідовностей складає менш як 72 %, у субтипах – 72-86 %. У хворих, інфікованих ВГС, можуть циркулювати численні варіанти вірусу із змінами, але близькосторідними геномами (відмінними один від одного на 1-2 %); такі варіанти називають квазівидами ("quasispecies"). Значна генетична варіабельність РНК ВГС призводить до утворення мутантних штамів та допомагає вірусові "ухилятися" від імунного нагляду організму; цим саме можна пояснити тривале (іноді довгіше)

<sup>1</sup> Вважають, що в 5' зоні геному ВГС кодується синтез ще одного білка (p29) з поки що не встановленими функціями.

## Література

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. // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. - 2001. - N 3 (13). - С.
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: проблемы эпидемиологии // В кн.: "Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи возбудителей и их исходы. - К., 2001. - С. 21-25.
7. Діагностическа значимість 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.
10. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита: Практическое руководство; пер. с нем. / Под ред. А.А.Шептулина. М.: Гэотар Медицина, 1999. - 432 с.

• набір Т6-стрип – 2 стрипових планшети, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 6 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 4 стрипи (32 лунки).

Набір розрахований на проведення 24 аналізів (включаючи контроль).

#### **Умови зберігання та транспортування**

Набір зберігають та транспортують при температурі 2-8°C. Заморожувати набір не дозволяється.

Термін зберігання набору – 6 місяців.

#### **Основні властивості і переваги імуноферментних тест-систем виробництва НВК „Діапроф-Мед”**

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високо специфічних рекомбінантних поліпептидів в складі імуносорбенту та моноклональних антитіл в імуноферментному кон'югаті.
- Відкрита система, яка легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування
- Візуальний контроль внесення зразків сироватки або плазми в лунки планшета за рахунок зміни кольору розчину для розведення сироваток.
- Загальноприйнята стандартизація обліку результатів.
- Тривалість аналізу 2,5 години.
- Один набір розраховано на 192 аналізів.

Різні варіанти комплектації наборів по вибору споживача: стриповий або монолітний планшет, хромоген ТМБ або ОФД.

носієство вірусу, розвиток переважно хронічних форм інфекційного процесу, труднощі в лікуванні, у створенні дієвих вакцинних препаратів.

Дослідженнями встановлено, що найпоширеніші генотипи ВГС – 1a, 1b, 2a, 2b, 2c і 3a, на доло яких припадає понад 90 % усіх ізолятів вірусу, виділених від пацієнтів у Північній і Південній Америці, Європі, Росії, Китаї, Японії, Австралії, Новій Зеландії. У європейських країнах у 50-91 % хворих на ГС виявляють генотип 1b, а у 40 % інфікованих осіб – генотип 1a. У США переважають генотипи 1a і 1b, що реєструються, відповідно, у 37 % і 30 % інфікованих. У більшості країн Східної і Південно-Східної Азії, в Японії, Китаї, Сінгапурі, Індонезії, Південній Корей до 58 % ізолятів ВГС представляє генотип 1b. Генотипи 2a і 2b менш поширені в світі та частіше зустрічаються в країнах Сходу. У Таїланді, Північній Європі і Австралії переважно визначається генотип 3a. Генотипи 4, 5a і 6 реєструються, відповідно, в Центральній і Південній Африці, Південно-Східній Азії. У Росії й країнах СНД переважає генотип 1b (не менш як 68,9 %).

Встановлено деякі розходження щодо частоти виявлення того або іншого генотипу ВГС у залежності від шляху передачі. Так, в європейських країнах генотип 1b частіше виявляють при інфікуванні після переливання контамінованої крові та її продуктів (зокрема, плазми), генотипи 1a і 3a – у ін'єкційних наркоманів, а генотипи 2 і 3 асоціюються із зараженням у відділеннях і центрах гемодіалізу. Вважається, що у хворих, інфікованих ВГС генотипу 1b, хвороба перебігає тяжче; у них високий вміст вірусної РНК у сироватці крові, гірша відповідь на лікування препаратами інтерферону та вища ймовірність розвитку рецидивів.

#### **Патогенез**

На сьогодні патогенез ГС остаточно не вивчений. Проникнення ВГС з крові до печінки та до інших органів і тканин, де розмножується вірус, призводить до запуску каскаду метаболічних та імунних реакцій, розвитку деструктивних та захисних, репараційних процесів. Інформація про точні

механізми репродукції ВГС досі обмежена, проте відомо, що вона відбувається через синтез комплементарних проміжних форм – ланцюгів РНК з негативною полярністю (утворюється «мінус»-ланцюг РНК – реплікативна форма РНК ВГС). Доведено лімфотропність ВГС: у більшості досліджень «мінус»-ланцюг РНК виявлено в мононуклеарних клітинах крові – моноцитах/макрофагах, В-лімфоцитах та поліморфноядерних лейкоцитах.

У патогенезі захворювання різні автори виділяють:

- 1) пряму цитопатогенну дію вірусу та пов'язані з цим імунні порушення;
- 2) наслідки розмноження вірусу як у печінці, так і поза її межами;
- 3) роль гетерогенності генотипів ВГС та мутацій вірусного генома.

У процесах пошкодження органів та систем, викликаних інфекцією ВГС, перш за все розглядають взаємозв'язок організму людини та вірусу. Генетичні фактори макроорганізму, початковий стан протівірусного імунітету визначають первинну реакцію на інфікування та впливають на характер наступної імунної відповіді. Основні вірусні чинники, що обумовлюють характер та розвиток інфекційного процесу – це кількість інфекційних часточок, занесених при зараженні, набір інфікованих клітин, активність розмноження, здатність збудника до мутацій, ступінь вираженості прямої цитопатичної дії.

Питання про механізм ушкодження гепатоцитів при ГС все ще дискутується. Одне з припущень – безпосередня цитопатогенна дія вірусу: білки ВГС викликають апоптоз уражених клітин. Пряму цитотоксичну дію вірусу на гепатоцит пов'язують з активацією рецепторів особливого роду – Аро-І/Іас-рецепторів, експресія яких на гепатоцитах хворих на хронічний ГС зростає більш як у 3-5 разів. Рецептори АРО-І/Іас стимулюються лігандною матричною мРНК, якої не виявляють у здоровій печінці, проте при гепатоцелюлярних ушкодженнях її багато. При захворюваннях печінки вірусної природи експресія такої лігандної мРНК здійснюється в цитотоксичних Т-лімфоцитах (на відміну від уражень печінки невірусної природи,

- Не більше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину в лунках у двохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

*Оптичну густину можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку при аналізі.*

### Облік та інтерпретація результатів аналізу

- Проведення аналізу вважають коректним, якщо значення оптичної густини (ОГ) в лунках з негативним контролем для кожного антигену (ОГ К-) не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), а значення ОГ позитивного контролю (ОГ К+) для кожного антигену не нижче 0,6 ОО.
- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ аналізу для кожного антигену розраховують окремо, додаючи константну величину **0,12** до значення ОГ К- відповідного антигену.
- Якщо ОГ зразка в лунці з певним антигеном перебільшує ГЗ, вважають, що зразок містить антитіла до відповідного антигену.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше рівнів ГЗ для усіх досліджуваних антигенів.
- Результати аналізу вважаються **невизначеними**, якщо ОГ зразка більше ГЗ лише для одного досліджуваного антигену.
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ більш ніж для одного антигену.

Форма випуску набору

- **набір ГЗ-стрип** – 1 стриповий планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 3 постановки імуноферментного аналізу: 1 постановка – 4 стрипи (32 лунки).



• В лунки А1, А2, А3 і А4 вносять по 20 мкл позитивного контролю, а в лунки В1, В2, В3 і В4 – по 20 мкл негативного контролю.

*При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш.* (Під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках).

• В решту лунок стрипів вносять по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток. Антигени соге, NS3, NS4 і NS5 сорбовані на окремих стрипах. При проведенні аналізу кожний досліджуваний зразок вносять в чотири лунки з різними антигенами.

• Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хвилин.

• По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

• Готують розчин кон'югату згідно з п. 1.2.

• В лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату.

• Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 30 хвилин.

• По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки вісім разів розчином для промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

• Готують розчин ТМБ-субстрата згідно з п. 1.3.

• Вносять в лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ-субстрата.

• Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 18-25 °С в темному місці протягом 30 хвилин.

• Зупиняють кольорову реакцію внесенням в лунки по 100 мкл стоп-реагенту.

коли мРНК експресується безпосередньо гепатоцитами); це свідчить про важливу роль імунної системи в патогенезі ГС.

Високий ступінь генетичної мінливості ВГС та його здатність до розмноження в імунокомпетентних клітинах (моноцитах/макрофагах, В-лімфоцитах), на думку ряду фахівців, забезпечують розповсюдження та тривале виживання ВГС в організмі людини; саме ця обставина обумовлює патогенетичні особливості інфекції при ГС. Одна з таких особливостей полягає у тому, що в організмі зараженої людини з'являється значна кількість ауоантигенів та ауоантигенів, відбувається хронічна стимуляція лімфоцитарної ланки імунної відповіді. Це й призводить до численних позапечічкових проявів ГС (змішана кріоглобулінемія, мембранопроліферативний гломерулонефрит, аутоімунний тиреоїдит тощо). Реплікація ВГС поза тканинами печінки призводить, крім того, до порушень функцій імунного контролю інфікованих лімфоцитів та моноцитів/макрофагів. Ця обставина має важливе значення не тільки в подальшому пошкодженні багатьох органів та систем. Вона також допомагає ВГС «уникнути» удару з боку імунної відповіді (мононуклеарні клітини крові, клітини кісткового мозку та деякі інші вважаються зонами, недоступними для впливу імунної системи – immune-free zones). Вважають також, що спроможність ВГС персистувати в клітинах крові відіграє певну роль у порушеннях регуляції кровотворення; до них належать: пошкодження фізіологічних функцій моноцитів/макрофагів; дисбаланс синтезу цитокінів; гальмування або стимуляція гемопоєзу; розвиток цитопенічних чи проліферативних гематологічних синдромів. Такі пошкодження можуть стати причиною виникнення імунних цитопеній, лейкомії, лімфосарком, лімфогранулематозу.

Первинна імунна відповідь на інфекцію характеризується мобілізацією неспецифічного імунного захисту (синтезом інтерферонів, появою природних кілерних клітин). Але вже через декілька днів розвивається специфічна імунна відповідь, спрямована на видалення вільних часточок вірусу та захист від повторного інфікування (за рахунок гуморальної ланки), а також на знищення вірусу, що проник у клітини, шляхом лізису інфікованих клітин та гальмування репродукції вірусу цитокінами без лізису клітин (клітинна ланка імунної відповіді).

Активация Т-лімфоцитів викликає пошкодження гепатоцитів після розпізнавання антигенів на їхніх поверхнях; при цьому об'єктом цитотоксичності стає серцевинний (core) білок ВГС. Оскільки збудник ГС – внутрішньоклітинний паразит, то клітина імунна відповідь має найбільше значення для специфічного захисту організму.

Специфічна гуморальна імунна відповідь полягає у синтезі антитіл до структурних та неструктурних білків ВГС. Збудник ГС має слабку імуногенність, тому антитіла синтезуються пізно, практично не здатні нейтралізувати вірус, не заважають персистенції збудника, не гарантують забезпечення надійного імунітету при реінфекції, не відіграють вирішальної ролі у видаленні ВГС. Деяка противірусна дія притаманна противірусним антитілам до продуктів гена E2/NS1, проте вона проявляється лише на ранніх стадіях хвороби. Мішенню для антитіл, які нейтралізують вірус, стають білки гіперваріабельного регіону HVR1 ВГС. Гетерогенність цих білків серед різних ізолятів ВГС дуже висока; крім того, спостерігається надзвичайно висока мінливість цих білків протягом інфекції у одного хворого. Все це обумовлює неефективність гуморальної імунної відповіді (так само, як і труднощі у створенні вакцин), оскільки захисна дія утворених антитіл триває лише протягом дуже короткого часу.

Неспецифічна гуморальна імунна відповідь характеризується зростанням рівня сироваткових імуноглобулінів, появою протиядерних антитіл, антитіл до гладенької мускулатури, антиендотеліальних антитіл, до ревматоїдного фактору, а в ряді випадків – так званих антитіл І типу проти мікросом нирки/печінки (їх розцінюють як маркери аутоімунного хронічного активного гепатиту ІІ типу), а також антитіл до тиреоглобуліну, надниркових залоз та β-клітин підшлункової залози.

Реакції, опосередковані Т-клітинами, обумовлюють появу в органах і тканинах лімфодіних інфільтратів, грануломатозу; поєднання реакцій гіперчутливості уповільненого типу з імунокомпетентними реакціями визначає розвиток у таких хворих васкулітів, артритів, міокардитів.

## 1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 4 мл розчину для розведення кон'югату (№ 4) та додають 80 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

## 1.3 Приготування ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 2 мл хромогену ТМБ і додають 2 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно застерігати від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

## 2 Проведення аналізу

- Рекомбінантні білки - аналоги антигенів вірусу гепатиту С сорбовані у вертикальних рядах планшета наступним чином:

core-стрипи №1, 5, 9 – позначені буквою «С».

NS3 –стрипи №2, 6, 10 – позначені цифрою «3».

NS4 –стрипи №3, 7, 11 – позначені цифрою «4».

NS5 –стрипи №4, 8, 12 – позначені цифрою «5».

- Перед проведенням аналізу звільняють від упаковок необхідну кількість стрипів, вставляють їх в рамку. Стрипи, які не використовуються в даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8°C протягом 1 місяця.

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.

- Промивають лунки планшета розчином для промивання (350 мкл розчину на лунку) один раз за допомогою промивача або 8-канальної піпетки, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

- В кожну лунку стрипів вносять по 80 мкл розчину для розведення сироваток (№ 3).

### Склад набору

До складу набору входять:

N	Назва компоненту	Кількість
1	Концентрат розчину для промивання планшетів (№1)	2 фл. × 25 мл
2	Імуносорбент	1 планшет
3	Розчин для розведення сироваток (№3)	1 фл. × 15 мл
4	Розчин для розведення кон'югату (№ 4)	1 фл. × 15 мл
5	Субстратний буфер	1 фл. × 7 мл
6	Хромоген ТМБ	1 фл. × 7 мл
7	Концентрат кон'югату (50X)	1 амп. × 0,3 мл
8	Негативний контроль	1 амп. × 0,3 мл
9	Позитивний контроль	1 амп. × 0,3 мл
10	Стоп-реагент	1 фл. × 15 мл
11	Клейка плівка	3 шт.

### **Проведення аналізу**

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 32 лунки)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°C протягом 30 хвилин.

#### *1.1 Приготування розчину для промивання*

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання (№ 1) інтенсивно потрушують. Відбирають 12 мл розчину і розводять в 540 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 10 діб

Окремо обговорюється роль інтерферону в патогенезі ГС як відповіді організму на інфекцію, а також клітинної імунної відповіді на інтерферон, яка може бути змінена в інфікованої особи. Є точка зору, згідно з якою ВГС при певній генетично обумовленій схильності організму (первинний генетичний дефект протівірусного імунітету) індукує синтез «аномальних» інтерферонів; це в свою чергу призводить до формування складних імунних порушень, які проявляються у вигляді аутоімунних реакцій, неконтрольованій проліферації, розвитку пухлин.

Показана можливість повторного інфікування як іншими, так і гомологічними штамами ВГС.

### **Епідеміологія**

За експертними оцінками ВООЗ, у світі інфіковано ВГС понад 500 млн. осіб. У США щорічно первинно інфікуються 150 тис. осіб, а число заражених досягає 4 млн. осіб (1,8 % населення). У цій країні від хронічних хвороб печінки, пов'язаних з ГС, щороку вмирає 8-10 тис. осіб, а однієї тисячі пацієнтів проводять трансплантацію печінки. У Європі зареєстровано понад 10 млн. хворих із хронічною інфекцією ГС. Частота вперше виявлених випадків ГС у розвинених країнах складає 1-5 на 100 тис. населення; при цьому вважають, що дійсні цифри перевищують зазначені показники у 5-8 разів. Неблагополучна епідемічна ситуація спостерігається і в країнах колишнього СРСР. У Російській Федерації у 1994 р. офіційний показник захворюваності склав 3,2, а в 2000 р. – вже 20,7 на 100 тис. населення. За даними М.С.Балаєва та М.І.Михайлова (2000) загальна кількість інфікованих у Росії наближається до 5 млн. осіб, а частота нововиявлених випадків ГС становить 60-80 на 100 тис. населення. Результати спостережень в Україні також свідчать про актуальність проблеми і зростання захворюваності. За статистичними даними (реєстрацію ГС як самостійної нозологічної одиниці в нашій країні розпочато у 2003 р.), за рік, що минув від початку реєстрації ГС, в Україні задокументовано 1.327 випадків захворювання – 2,8 на 100 тис. населення. Проте дійсний рівень захворюваності значно

## МЕТОДИКА РОБОТИ З ІМУНОФЕРМЕНТНОЮ ТЕСТ-СИСТЕМОЮ "DIA-C-HCV"

«DIA-C-HCV» – тест-система імуноферментна для виявлення антитіл до окремих білків вірусу гепатиту С.

Призначення набору

Набір призначений для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність антитіл до окремих білків вірусу гепатиту С методом імуноферментного аналізу.

### Принцип аналізу

Основні компоненти набору – імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент – полістироловий планшет, в лунках якого окремо сорбовані рекомбінантні антигени – аналоги антигенів core, NS3, NS4 і NS5 вірусу гепатиту С (кожний антиген сорбований на трьох окремих стрипах). Кон'югат – моноклональні антитіла проти імуноглобулінів класу IgG людини, кон'юговані з пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток антитіла, специфічні до окремих білків вірусу гепатиту С, зв'язуються з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного пероксидазного кон'югату моноклональних антитіл до імуноглобулінів класу IgG. Після відмивання нез'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника – субстрату пероксидази (перекиси водню) та хромогену (3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках, яка при довжині хвилі 450/620 нм. Позитивні результати в певних лунках свідчать про наявність у зразку антитіл до відповідного антигену вірусу гепатиту С.

перевищує цей показник, оскільки до офіційної статистики потрапляють лише випадки гострого ГС, а хворі з хронічними формами інфекційного процесу, кількість яких значно перевищує число пацієнтів з гострими формами, все ще не потрапляють до державної реєстрації.

Частота виявлення актуальних маркерів інфікування дозволяє оцінити поширеність та розповсюдження тієї чи іншої інфекції. Такий маркер при ГС – протівірусні антитіла (анти-ВГС). Показники частоти виявлення анти-ВГС серед здорового населення (насамперед донорів крові) у різних країнах коливаються від 0,14 до 6 % і вище. У США цей показник складає 0,5-1,5 %; у країнах Європейського союзу середня поширеність анти-ВГС серед донорів крові становить 1 %, від 0,04 % на півночі до 2 % на півдні. У Східній Європі та Азії показники коливаються від 1,5 до 4 %, у деяких регіонах Африканського континенту, Близького та Середнього Сходу – від 4 до 10 %, а в ряді країн Центральної Африки перевищують 10 %. При цьому результати обстеження представників дорослої неорганізованої популяції свідчать про те, що серед них показники інфікованості ВГС більш як вдвічі перевищують показники частоти виявлення анти-ВГС у донорів. Частота виявлення анти-ВГС серед добровільних безоплатних донорів крові в Україні становить 1,3 %, у вагітних – 2,0 %. Відповідно до чинних критеріїв, такі показники характерні для регіонів з досить високим рівнем інфікованості населення ВГС.

ГС – антропоноз, що належить до кров'яних інфекцій з парентеральним механізмом передачі збудника; цей механізм може спрацювати як у природних, так і в штучних умовах (завдяки природним та штучним шляхам передачі). Джерелом інфекції бувають хворі на всі форми гострого і хронічного ГС, вірусоносії. Найнебезпечніші, з епідеміологічної точки зору, хворі з такими формами ГС, які протікають приховано (безжовтяничні, субклінічні, латентні), та вірусоносії, виявити яких дуже важко. За оцінками фахівців, на одного хворого на гострій ГС із жовтяницею припадає 5-6 випадків безжовтяничного гепатиту; за літературними даними, частота безжовтяничних форм ГС може сягати навіть 95 %. Головна форма інфекційного процесу при ГС представлена хронічним

Таблиця 5. Визначення чутливості тест-системи «DIA-HCV» на панелях анти-ВГС низькотитражних сироваток

Панель	Кількість анти-ВГС позитивних зразків із загальної кількості зразків у панелі	Кількість позитивних результатів у тест-системі «DIA-HCV»
RHV105	14 з 15	14
ДІСК	16 з 24	16

При дослідженні 347 зразків сироваток від хворих хронічним гепатитом С хибнонегативних результатів не було.

### Специфічність

Визначення специфічності тест-системи проводили з використанням рандомізованої виборки зразків сироваток донорів крові, а також сироваток, отриманих від вагітних жінок і хворих різними інфекційними захворюваннями (ЦМВ-інфекція, герпетична інфекція, туберкульоз, червоничка (краснуха), сифіліс і гепатити іншої етіології).

За результатами досліджень 8869 зразків сироваток донорів крові специфічність тест-системи «DIA-HCV» становила 99,3 %. Тестування сироваток від пацієнтів з різними інфекційними захворюваннями та вагітних жінок не виявило значної перехресної реактивності (не більше 1,2 % хибнопозитивних результатів).

гепатитом, і його клінічний перебіг тривалий час має безсимптомний характер; при цьому хворий є джерелом інфекції протягом одного або декількох тижнів до початку хвороби, протягом всього гострого періоду та тривалий час при формуванні хронічного гепатиту С (ХГС) і стану вірусоносійства. Є підстави вважати, що пацієнти з різними варіантами ХГС позитивно залишаються джерелом інфекції. Лише 15-18 % інфікованих осіб можуть самостійно звільнитися від вірусу.

Щоб відбулося зараження ВГС, він повинен потрапити у кров'яне русло людини. ВГС виявляється в крові і практично в усіх біологічних рідинах організму. У контрольованих дослідженнях геном вірусу було виявлено у сечі, жовчі, слині, грудному молоці, спермі, вагінальних секретах, асцитній та інших біологічних рідинах організму. Але найнебезпечніший фактор передачі інфекції – це кров та її компоненти. У крові людей, заражених ВГС, в одному мілілітрі крові в середньому міститься  $10^3$ - $10^4$  вірусних часточок, але кількість їх може зростати навіть до  $10^6$ /мл. При цьому доза вірусу, достатня для зараження, може знаходитись у 0,01-0,001 мл крові.

До природних шляхів передачі ВГС, які забезпечують зберігання вірусу в природі як біологічного виду, належать статевий, вертикальний (від матері дитині) і горизонтальний (зараження в результаті так званих побутових гемоперкутанних контактів). Штучне інфікування ВГС здійснюється при проведенні медичних і немедичних парентеральних маніпуляцій.

Зараз один з основних факторів ризику інфікування ВГС – введення у вену наркотичних речовин забрудненими шприцами. Дані світової літератури свідчать, що у 65-90 % інфекційних наркоманів виявляються антитіла до ВГС. Показник частоти виявлення цього маркеру інфікування прямо залежить від тривалості застосування наркотиків і частоти ін'єкцій. Споживання наркотиків впливає на клінічний перебіг та лабораторні показники при ГС. Широке розповсюдження ГС у середовищі наркоманів визначає високу інтенсивність епідемічного процесу, зростання показників захворюваності, зміну вікового складу хворих (переважне зараження підлітків 15-17 років і молодих дорослих осіб у віці 18-29 років).

Ще один важливий шлях поширення ВГС – інфікування при переливанні крові, її продуктів та препаратів. У попередні роки у 60-90 % хворих на післятрансфузійні гепатити (ПТГ) інфекцію викликав ВГС. Після розробки специфічних тест-систем для виявлення анти-ВГС і запровадження на початку 1990-х років обов'язкової перевірки кожної порції донорської крові безпелека зараження при переливанні крові істотно знизилася. У сучасних умовах в розвинених країнах частота виникнення ПТГ не перевищує 1 %, а при використанні для контролю донорської крові молекулярно-біологічних та генетичних методів досліджень ця частота стає ще нижчою. Проте і зараз існує ризик зараження ВГС у хворих на гемофілію, таласемію, хворобу Віллебранда та інші недуги, пов'язані з порушеннями системи згортання крові, лікування яких передбачає численні переливання крові, її компонентів та препаратів.

Передача ВГС може відбуватися і при трансплантації органів. Є дані, відповідно до яких показники інфікування ВГС після пересадки печінки можуть складати 15-25 %. Описано випадки зараження і після пересадки серця, нирок.

Ризик зараження ВГС досить високий для хворих з хронічною нирковою недостатністю, які перебувають на лікуванні у відділеннях і центрах гемодіалізу. У таких хворих анти-ВГС виявляють у 15-20 разів частіше, ніж у донорів крові. Показник частоти виявлення специфічних антитіл серед хворих, які проходили лікування гемодіалізом, коливається від 20 % до 30 %, проте може перевищувати 50-70 %. Рівень інфікованості ВГС серед таких хворих безпосередньо залежить від тривалості замісної терапії. Фактори, що сприяють зараженню пацієнтів, – це не тільки власне гемотрансфузія, але й порушення правил асептики при проведенні гемодіалізу через складність дезінфекції і неможливість повної ефективної стерилізації гемодіалізних апаратів. Інтенсивний характер роботи у відділеннях і центрах гемодіалізу, численні оперативні та інші парентеральні втручання визначають постійний і тривалий контакт медичного персоналу з кров'ю донорів і хворих, іншими біологічними рідинами; все це створює умови для зараження ВГС медичних працівників. За аналогією з гепатитом В, багато

## Умови зберігання та транспортування

Набір зберігають і транспортують при температурі 2 – 8° С. Заморожувати набір не дозволяється.

Термін зберігання набору - 1 рік.

## Характеристика показників якості

### Чутливість

Визначення чутливості тест-системи «DIA-HCV» проводили на зразках сироваток від хворих хронічним гепатитом С, а також на панелях охарактеризованих сироваток крові, виробництва Boston Biomedica Inc. (BBI, США), Bio Clinical Partners Inc. (BCPI, США), Державного інституту стандартизації та контролю якості медичних біологічних препаратів ім. Л.О.Тарасевича (ДІСК, Росія)

Таблиця 4. Характеристика панелей сироваток

Панель	Характеристика зразків панелі
6212 (BCPI)	Анти-HCV сероконверсійні (9)
RHV105 (BBI)	Анти-HCV низькотитражні (14), негативні (1)
ДІСК	Анти-HCV низькотитражні (16), негативні (8)

На сероконверсійній панелі 6212 (BCPI) тест-набір «DIA-HCV» виявляє інфікування ВГС з 26 дня з моменту визначення ВГС-РНК методом полімеразної ланцюгової реакції, що відповідає показникам чутливості імуноферментних тест-систем третього покоління. Результати визначення чутливості «DIA-HCV» на вищезгаданих панелях анти-HCV низькотитражних сироваток подані в таблиці 5

фахівців розглядають ГС як професійне захворювання медичних працівників.

В останні роки з'явилися повідомлення про можливість внутрішньолікарняного інфікування ВГС хворих і медичних працівників не тільки у відділеннях гематології і переливання крові, відділеннях і центрах гемодіалізу, але і в інших лікувальних закладах. В ЛПЗ різного (неінфекційного) профілю можуть перебувати хворі з недіагностованими формами гострого і хронічного ГС, вірусоносії, які часто не знають про свою інфікованість. При цьому хворих, що перебувають у стаціонарах для лікування неінфекційних хвороб, звичайно не обстежують на маркери вірусних гепатитів. При порушеннях санітарно-епідемічного режиму в умовах ЛПЗ при наявності невиявлених джерел інфекції створюються всі передумови для прихованої парентеральної передачі збудника. Найважливіші фактори, що сприяють за таких умов розповсюдженню ГС серед хворих, – це тривалі й інтенсивні курси ін'єкційної терапії, часті гемотрансфузії та введення препаратів крові, взяття проб крові, біопсій, зондові процедури, ендоскопії, оперативні втручання, інші лікувально-діагностичні інвазивні маніпуляції. Відзначено безпосередній взаємозв'язок між інтенсивністю медичних парентеральних втручань і частотою виявлення серологічних маркерів інфікування ВГС.

До шляхів, які підтримують природну циркуляцію ВГС, належить передача цього збудника від матері до немовляти. За даними літератури, ризик вертикальної передачі ВГС коливається від 0 % до 5-12 %, однак може досягати 33 % і навіть 50 % при високому рівні віремії в інфікованої матері (більше  $10^6$ - $10^7$  копій РНК ВГС/мл крові). Серед факторів, що згубно впливають на передачу збудника ГС від матері до дитини, виділяють ко- або суперінфікування вірусом гепатиту В та ВІЛ, ін'єкційну наркоманію, хронічні хвороби печінки тощо. При цьому найбільший ризик зараження для новонароджених буває тоді, коли зараження матері відбувається в третьому триместрі вагітності. Передача ВГС відбувається, головним чином, під час пологів при контакті слизових оболонок і поверхні тіла дитини з кров'ю, навколоплідними водами, вагінальним секретом матері. Водночас є дані, отримані при

• Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше нижнього рівня ОГ “сірої зони”.

• Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.

• Зразки, які мають значення ОГ в межах “сірої зони”, вважаються **невизначеними**.

• Зразки, що дали позитивний або невизначений результат, необхідно досліджувати повторно не менш ніж в двох лунках тест-системи:

- зразки позитивні в одній або більше лунках слід вважати **позитивними**;

- зразки негативні в двох або більше лунках слід вважати **негативними**.

#### **Форма випуску наборів**

• набір Ф2-моноліт – монолітний планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на проведення 2 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

• набір Ф6-стрип – стриповий планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на 6 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 2 стрипи (32 лунки);

• набір Ф12-стрип – стриповий планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на 12 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок);

• набір Т2-моноліт – монолітний планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на проведення 2 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

• набір Т12-стрип – стриповий планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 12 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 стрип (16 лунок).

Набір розраховано на проведення 192 аналізів (включаючи контроль).

визначенні РНК ВГС у крові породіль і в пуловинній крові, що свідчать також і про можливість трансплацентарного зараження. Зв'язку між вигодовуванням грудним молоком та передачею ВГС від матері до дитини поки що не доведено.

Про можливість статевої передачі ВГС свідчить виявлення маркерів інфікування в секретах статевих органів чоловіків і жінок, підвищений рівень захворюваності в родинних осередках інфекції, серед сексуальних партнерів безсимптомних носіїв збудника та партнерів хворих на гострий та хронічний ГС. Показано підвищену частоту випадків гострого та хронічного ГС, а також високий рівень виявлення маркерів інфікування в «традиційних» групах підвищеного ризику зараження «класичними» інфекціями, що передаються статевим шляхом (ПСП): серед чоловіків, які мають секс з чоловіками, працівників комерційного сексу, осіб, з безладним статевим життям тощо. Інфікованість ВГС серед зазначених осіб коливається від 3-6 % до 10 %, але може перевищувати 16-17 % і залежить від кількості статевих партнерів, ступеню «захищеності» сексуальних стосунків, травматичності сексу, наявності супутніх ПСП, коінфікування іншими збудниками, вживання наркотиків. Існують докази статевої передачі ВГС і серед подружніх пар в родинних вогнищах інфекції. Ризик інфікування при цьому становить 0,5-5 % на рік. Частота виявлення анти-ВГС вища в статевих партнерів осіб, хворих на ХГС.

Горизонтальна передача ВГС може відбуватися в організованих колективах, сімейних та інших вогнищах інфекції, коли складаються умови для прихованого парентерального інфікування завдяки так званому побутовим гемоперкутанним контактам з хворими на ГС та з вірусоносіями. Передачі ВГС за таких умов можуть сприяти мікроτραвми, садна, подряпини, у більшості випадків ледь помітні, а то й зовсім непомітні. Підвищення ризику інфікування ВГС горизонтальним шляхом корелює зі ступенем вираженості патології печінки в інфікованій особі, з кількістю заражених членів родини або колективу тощо.

Результати численних сероепідеміологічних досліджень свідчать про широке, але нерівномірне розповсюдження ГС

- В лунки стрипів вносять по 100 мкл розчину кон'югату.
- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 37 °С у термостаті протягом 30 хвилин.

- По закінченні інкубації видаляють розчин кон'югату з лунки за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки шість разів розчином № 1, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

- Готують розчин проявника згідно з п. 1.3.

- Вносять в лунки стрипів по 100 мкл розчину проявника.

- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при 18-22 °С в темному місці протягом 30 хвилин.

- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунки по 100 мкл стоп-реагенту.

- Не більше як через 1 хвилину після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину в лунках у двохвольовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

*Як виняток, ОГ можна визначати в однохвольовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку при аналізі. При роботі в однохвольовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.*

#### **Облік результатів аналізу**

- Розраховують середнє значення оптичної густини (ОГ) для лунки негативного контролю (ОГсер К<sup>-</sup>) і для позитивного контролю (ОГсер К<sup>+</sup>).

Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГсер К<sup>-</sup> не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), а ОГсер К<sup>+</sup> не нижче 0,6 ОО.

Якщо одне з трьох значень ОГ К<sup>-</sup> більше 0,1 ОО або більше ніж в два рази перевищує ОГсер К<sup>-</sup>, його відкидають та ОГсер К<sup>-</sup> розраховують за рештою значень ОГ К<sup>-</sup>.

- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину 0,12 до значення ОГсер К<sup>-</sup>.

- “Сіра зона” - зона значень ОГ, яка простягається від ГЗ до значень менших ГЗ на 10%.



В чистий флакон відбирають 1 мл хромогену ТМБ і додають 1 мл розчину № 5Т для приготування проявника, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин проявника необхідно застерігати від попадання світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин проявника повинен бути безбарвним.

## 2 Проведення аналізу

- Перед проведенням аналізу звільняють від упаковок необхідну кількість стрипів, вставляють їх в рамку. Стрипи, які не використовуються в даній постановці, зберігають у щільно закритому пакеті при температурі 2-8°C протягом 1 місяця.

- Готують розчин №1 згідно з п. 1.1.

- Вносять в усі лунки по 350 мкл розчину № 1, витримують стрипи залитими протягом 30-40 секунд та видаляють розчин за допомогою промивача або 8-канальної піпетки, після чого позбавляються зайвої вологи (постуковуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

- В кожну лунку стрипів вносять по 80 мкл розчину №3 для розведення сироваток.

- В лунки стрипів вносять по 20 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).

- В дві лунки (A1, B1) вносять по 20 мкл позитивного контролю (K<sup>+</sup>), а в три інші (C1- E1) - по 20 мкл негативного контролю (K<sup>-</sup>). *При внесенні контрольних та досліджуваних зразків необхідно обережно піпетувати суміш.* (Під час піпетування відбувається зміна кольору розчину в лунках).

- Накривають стрипи клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 60 хвилин.

- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки чотири рази розчином №1, після чого позбавляються зайвої вологи (постуковуючи планшетом по фільтрувальному паперу).

- Готують розчин кон'югату згідно з п. 1.2.

серед різних груп населення. Серед основних груп підвищеного ризику інфікування ВГС можна виділити:

- Ін'єкційних споживачів наркотичних речовин, ВІЛ-інфікованих;
- Осіб з ППШ, пацієнтів шкірно-венерологічних диспансерів;
- Хворих на геморфілію та інші гематологічні захворювання, онкогематологічних хворих, пацієнтів, яким багаторазово переливають кров, її продукти та препарати;
- Осіб з хронічною нирковою недостатністю, лікування яких передбачає гемодіаліз;
- Пацієнтів з хронічними захворюваннями печінки та жовчовідвідних шляхів;
- Хворих у ЛПЗ, які підлягають тривалим та/або інтенсивним курсам ін'єкційної терапії, ендоскопічним втручанням тощо;
- Медичних працівників, перш за все тих, які мають професійний контакт з кров'ю та її препаратами, іншими біологічними рідинами хворих;
- Дітей, які народилися від матерів з активним інфекційним процесом ГС;
- Осіб, які сплукуються з хворими на гострий або хронічний ГС, вірусоносіями в родинних та інших осередках інфекції;
- Працівників комерційного сексу; осіб, які ведуть непорядковане статеве життя тощо.

## Лабораторна діагностика

При діагностиці ГС слід враховувати цілий комплекс факторів, в тому числі дані епідеміологічного анамнезу, результати лабораторних та інструментальних досліджень та ін. Одне з чільних місць належить методам специфічної діагностики, спрямованим на виявлення діагностичних маркерів інфікування: антигенів, антитіл, генів, нуклеїнових кислот вірусу та відповідних білкових продуктів за допомогою сучасних серологічних та молекулярно-генетичних методів дослідження.

### Серологічні дослідження.

Серологічні дослідження спрямовані на виявлення специфічних антигенів та антитіл до вірусу. Серед них розрізняють первинні скринінгові тести, що здійснюються, головним чином, методом імуноферментного аналізу (ІФА); додаткові аналітичні тести, де використовують методологію імуноного блотингу (ІБ); визначення серотипу вірусу – так зване «серотипування» ВГС.

Матеріалом для виявлення серологічних маркерів можуть бути всі біологічні рідини організму, в яких містяться антиген або антитіла до вірусу. Сьогодні найбільш поширене й відпрацьоване в серологічній діагностиці ГС виявлення специфічних антитіл у сироватці і/або плазмі крові обстежуваної особи методом ІФА.

Не дивлячись на те, що гуморальна імунна відповідь при ГС виражена слабо, до кожного з структурних та неструктурних білків ВГС виробляються специфічні антитіла, за присутністю яких в периферійній крові і визначають серопозитивність у відношенні вірусу ГС; вона свідчить про наявну або пережиту інфекцію. При гострому ГС у 50-70 % хворих анти-ВГС можна виявити вже на початку симптоматичної фази інфекції. В середньому ж сероконверсія відбувається через 3-6 тижнів від моменту інфікування, проте цей проміжок може коливатися від 5 до 50 тижнів і залежить від способу зараження вірусом, а також від чутливості діагностикумів. Проміжок часу, що передре сероконверсії, коли зараження ВГС відбулося, а проте специфічні антитіла в сироватці крові ще відсутні або кількість їх така незначна, що вони не визначаються сучасними тест-системами ІФА, називають періодом «вікна» (серонегативне, латентне, інфекційне, діагностичне «вікно»). Описано також випадки відсутності анти-ВГС, що циркулюють в крові, при розвитку клітинної імунної відповіді у пацієнтів з прихованою інфекцією, яка завершується без лікарського втручання.

Для визначення специфічних антитіл до ВГС застосовують тест-системи, в більшості з яких використано принцип класичного твердофазного непрямого ІФА (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Основні компоненти тест-систем – імуносорбент та кон'югат, який містить фермент. Імуносорбент

До складу набору входять:

N	Назва компоненту	Кількість
1	Концентрат розчину № 1 для промивання планшету	3 фл. по 25 мл
2	Імуносорбент	2 планшети
3	Розчин № 3 для розведення сироваток	1 фл., 20 мл
4	Розчин № 4 для розведення кон'югату	1 фл., 26 мл
5	Розчин № 5 Г для приготування проявника	1 фл., 14 мл
6	Кон'югат імуноферментний	1 ампл., 0,75 мл
7	Хромоген ТМБ	1 фл., 14 мл
8	Позитивний контроль (K <sup>+</sup> )	1 ампл., 0,6 мл
9	Негативний контроль (K <sup>-</sup> )	1 ампл., 0,9 мл
10	Стоп-реагент	1 фл., 25 мл
11	Клейка плівка	6 шт.

### **Підготовка до аналізу**

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 16 лунок)  
Витримують компоненти набору при температурі 18-22°C протягом 30 хвилин.

*1.1 Приготування розчину № 1 для промивання планшета*

Вміст одного флакону концентрату розчину № 1 інтенсивно потрушують. Відбирають 6 мл розчину і розводять в 270 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 5 діб.

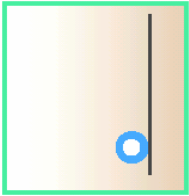
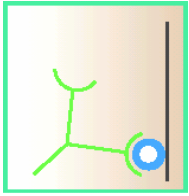
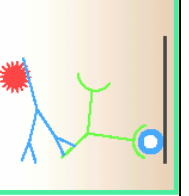
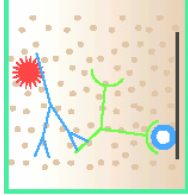
*1.2 Приготування розчину кон'югату*

В чистий флакон відбирають 2 мл розчину № 4 для розведення кон'югату та додають 80 мкл кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

*1.3 Приготування розчину проявника*

### Схема проведення ІФА

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibilізовані рекомбінантними білками	
Внесення в лунки стрипів розчину для розведення зразків і по 20 мкл зразків контролів та сироваток Інкубація 60 хв при 37 °С – формування комплексу АГ-АТ Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
Внесення в лунки розчину кон'югату Інкубація 30 хв при 37°С (формування комплексу з кон'югатом) Промивання лунок буферним розчином (6 разів)	
Внесення в лунки розчину проявника Інкубація 30 хв (забарвлення) Зупинення реакції Ресстрація оптичної густини	

– полістироловий або поліхлорвініловий планшет, лунки якого сенсibilізовані антигенами. Кон'югат представлений антилідами до глобулінів людини, синтетичними або рекомбінантними пептидами, кон'югованими з ферментом. При наявності анти-ВГС у досліджуваному зразку антигела зв'язуються з антигеном на твердій фазі з наступним утворенням комплексу антиген-антигелу. Індикатором для виявлення комплексу слугить хромоген-субстратний розчин. Після приєднання кон'югату до комплексу антиген-антигелу розвивається забарвлення реакційної суміші, інтенсивність якого визначають фотометрично за величиною оптичної густини (ОГ), що лінійно залежить від наявності та концентрації анти-ВГС у досліджуваному зразку сироватки (плазми) крові: що вища концентрація, то інтенсивніше забарвлення і, відповідно, вище значення ОГ.

Сучасні діагностикуми ІФА представлені тест-системами 4-х поколінь (ІФА-1, ІФА-2, ІФА-3, ІФА-4). Першу комерційну тест-систему для виявлення анти-ВГС було створено у 1990 р. групою дослідників "Chiron Corporation". Основою цієї тест-системи стали імунореактивні олігопептиди, що взаємодіють з сироватками хворих на гепатит "ні А, ні В". У тест-системах 1-го покоління як антиген застосовували рекомбінантні білки-аналоги неструктурних білків вірусу – NS3 та NS4. Поява на ринку перших тест-систем дуже сприяла підвищенню якості діагностики гепатиту "ні А, ні В" і, в першу чергу, – зменшенню кількості ППГ. Однак, при використанні ІФА-1 реєструвався значний відсоток хибно-позитивних результатів, що спричиняло, зокрема, необгрунтовану вибірково великої кількості донорської крові. Крім того, ці діагностикуми були недостатньо чутливі та визначали анти-ВГС у середньому через 30-90 днів від появи ознак гострого гепатиту (від моменту появи жовтяниці, якщо вона була присутня) і, за підрахунками, виявляли лише 70-80 % осіб, інфікованих ВГС. Якщо зараження трапилося внаслідок гемотрансфузії, тобто «найефективнішим» чином, то тест-системи 1-го покоління визначали сероконверсію приблизно на 16-у тижні після зараження, а чутливість діагностикумів складала в середньому 64 %.

Поряд з накопиченням нових знань про структуру ВГС вдосконалювалися й серологічні тести для визначення специфічних маркерів інфікування. Успіхи в галузі молекулярного клонування генома ВГС сприяли створенню рекомбінантних антигенів, відбору оптимальних імунодомінантних епітопів, що, в свою чергу, дало змогу створити на основі ІФА чутливі та специфічні тест-системи наступних генерацій (табл. 1). Тест-системи 2-го (з 1991 року) та 3-го (з 1993 року) покоління, дозволяють, завдяки присутності додаткових рекомбінантних пептидів у складі імуносорбенту, визначати анти-ВГС, відповідно, починаючи з 20-25 і 7-10 днів від моменту появи жовтяниці; отже можна виявляти, відповідно, 92-95 % та 97 % осіб, інфікованих ВГС. Середній період від зараження при переливанні крові до сероконверсії, після якого ІФА-2 та ІФА-3 дають змогу виявити присутність інфекції, становить, відповідно, 10 та 7-8 тижнів. Діагностикуми 4-го покоління відрізняються від попередніх тим, що при створенні їх використано рекомбінантні і синтетичні пептиди, що дозволяє додатково підвищити специфічність досліджень.

Таблиця 1 Імуноферментні тест-системи для виявлення антигел до ВГС

Використаний імуносорбент	Покоління тест-систем		
	I	II	III
Пептиди	5-1-1 C100-3	C22-3 c200 C33c C100-3	C22-3 c200 C33c пептид
Зони генома ВГС, в яких кодовані пептиди	NS3 NS4	Core NS3 і NS4 NS3 NS4	Core NS3 і NS4 NS3 NS5

Сьогодні найширше використовують тест-системи 3-го покоління, за допомогою яких можна визначати анти-ВГС до структурних (core) та неструктурних (NS3, NS4, NS5) білків ВГС. Порівняно з ІФА-2, вони мають вищі показники чутливості

## МЕТОДИКА РОБОТИ З ІМУНОФЕРМЕНТНОЮ ТЕСТ-СИСТЕМОЮ "DIA-НСV"

"DIA-НСV" тест-система імуноферментна для виявлення антигел до вірусу гепатиту С.

Набір призначений для аналізу сироватки та плазми крові людини на наявність антигел до вірусу гепатиту С методом імуноферментного аналізу.

### Принцип аналізу

Головні компоненти набору - імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент - полістироловий планшет, лунки якого сенсibiliзовані рекомбінантними поліпептидами - аналогами антигенів NS3, NS4 і Core вірусу гепатиту С. Кон'югат - моноклональні антигел проти імуноглобулінів класу IgG людини, кон'югованих з пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток антигел, специфічні до вірусу гепатиту С, зв'язуються з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антигел. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного імуноферментного кон'югату. Після відмивання нез'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника - субстрату пероксидази (перекис водню) та хромогену (3,3',5,5'-тетраметилбензидин - ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину (ОГ) суміші у лунках, яка при довжині хвилі 450 нм пропорційна концентрації специфічних антигел у зразках сироваток або плазми крові.

- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганій роботі можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

### **Підготовка зразків**

Зразки сироваток чи плазми зберігають при температурі 2-8°C не більше ніж протягом 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°C) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом нагрію, гемолізом, гіперліплідемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

*Науково-виробнича компанія „Діарф-Мед” серійно виробляє наступну продукцію для діагностики гепатиту С:*

“DIA-HCV” – високо ефективна імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до вірусу гепатиту С. Відноситься до третього покоління ІФА тест-систем і дозволяє визначати антитіла до структурного білку нуклеокапсида (core) і неструктурних білків ВГС (NS3, NS4, NS5);

“DIA-C-HCV” – імуноферментна тест-система для підтвердження наявності антитіл до вірусу гепатиту С. Метод підтвердження засновано на виявленні антитіл до окремих вірусних білків (NS3, NS4, NS5, core) ВГС.

(завдяки NS5 у складі імуносорбенту). Чутливість сучасних тест-систем 3-го покоління в середньому 96 %. Цей показник обумовлений рівнем поширення інфекції в обстежуваній популяції та залежить від контингентів обстежуваних осіб. Так, при тестуванні зразків сироваток крові осіб з популяції з високим рівнем розповсюдження інфекції обчислена чутливість ІФА-3 лежить у межах від 98,8 до 100 %. При обстеженні пацієнтів, які знаходяться на гемодіалізі, осіб із скомпromетованою імунною системою (реципієнти органів, кісткового мозку, ВІЛ-інфіковані) та при деяких патологічних станах чутливість досліджень нижча – 50-95 %. Щодо специфічності ІФА-3, то в середньому вона не менша за 98 %, проте цей показник залежить від ряду факторів. Хибно-позитивні результати тестування можна отримати, перш за все, при скринінгу у популяції з низьким рівнем розповсюдження ВГС, наприклад, серед донорів крові. Хибно-позитивні результати дослідження можуть бути також обумовлені неспецифічним зв'язуванням імуноглобулінів сироватки (плазми) крові з компонентами імуносорбенту, наприклад, при підвищеному рівні гамаглобулінів (у хворих на ревматизм, при деяких новоутвореннях тощо), при наявності у обстежуваної особи аутоімунних захворювань, хвороб сполучної тканини, при деяких інфекціях (гепатит В, туберкульоз), після введення деяких імунобіологічних препаратів (наприклад, вакцинація проти ГВ), у вагітних та в ряді інших випадків, не пов'язаних з діагностичними характеристиками тест-систем.

Сьогодні не існує методу виявлення антитіл, який завжди гарантував би 100 % точність результатів тесту, однак показники, отримані при тестуванні зразків сироваток стандартних панелей за допомогою сучасних тест-систем ІФА, дорівнюють або максимально наближаються до 100 %. Це справедливо і щодо виявлення анти-ВГС: при обстеженні різних груп осіб можуть реєструватися хибно-позитивні та хибно-негативні результати, навіть при використанні сучасних діагностикумів відмінної якості з високими показниками чутливості та специфічності.

Для максимального виключення можливих хибно-позитивних реакцій всі позитивні результати первинного

дослідження необхідно перевіряти за допомогою підтверджувальних та/або додаткових тестів. З цією метою застосовують метод нейтралізації антигенів високоочищеними антигенами, метод імуноного блогу, визначення антигенів до окремих структурних і неструктурних білків ВГС, молекулярно-біологічні методи. Всі перелічені методичні підходи використано в різних конфірматорних тест-системах. Підтвердити наявність анти-ВГС можна за допомогою альтернативних тест-систем на основі ІФА, тобто вдавшись до додаткових тестів. Під словом «альтернативний» мається на увазі, що діагностикум, який застосовують для підтверджувальних досліджень, повинен відрізнятися від попереднього або поклінням, або форматом (плашечний, кульковий), або принципом дії (прямий, непрямий, «сандвіч», конкурентний ІФА) тощо. При цьому всі перелічені методи мають свої переваги та недоліки, і сьогодні не існує "золотого стандарту". У кожному конкретному випадку, коли виникає необхідність провести підтверджувальні дослідження, слід пам'ятати про мету тестування (обстеження за епідемічними або клінічними показаннями, перед призначенням специфічної терапії, скринінг донорської крові, встановлення фази перебігу ГС), враховувати поширеність інфекції в певній популяції, ступінь ризику інфікування обстежуваної особи, «парентеральний» анамнез тощо.

Для підтвердження результатів первинного тестування найширше застосовують метод рекомбінантного імуноблоту – RIBA; тест-системи для нього створювалися та вдосконалювалися паралельно з діагностикумами на основі ІФА. Сьогодні найкращі діагностичні характеристики мають RIBA 3-го покоління. Однак ряд фахівців у галузі специфічної діагностики ГС вважають, що застосування RIBA не завжди доцільне при проведенні підтверджувальних досліджень, оскільки результати цього аналізу практично не дають ніякої додаткової діагностичної інформації у порівнянні з результатами ІФА, бо в тестах RIBA представлені ті самі антигени, що й в ІФА, але у «блотовому форматі». До того ж діагностична цінність RIBA значно обмежена можливістю отримання певної кількості невизначених результатів досліджень, в першу чергу,

- контейнер для збирання твердих забруднених відходів
- контейнер для зливу відроблених забруднених рідин.
- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір.

### Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не підпувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автокладувати протягом 1 години при температурі 120°C;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

### Правила роботи з імуноферментними тест-системами:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
  - ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
  - використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
  - не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
  - перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
  - уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.
- Вимоги до промивання планшету:
- неякісне промивання планшету призводить до одержання некоректних результатів;

Антитіло – складна природна сполука (глікозилізований поліпептид), яка виникає як результат імунної відповіді організму при введенні в організм чи потраплянні в нього чужорідних речовин, а також збудників інфекційних хвороб, різноманітних паразитів тощо.

Кон'югат – штучна молекула, що складається принаймні з двох хімічно об'єднаних компонентів, часто різного походження; для проведення ІФА звичайно використовують кон'югати, які містять ферментну (чи іншу) мітку, пришити до антигену (антигенів), антитіл чи білку A Starphylouscus aureus.

Проявник – суміш ферментного субстрату з хромогеном, яка служить для виявлення (проявлення) імуноферментної реакції; в результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється.

### **Обладнання та пристрої, необхідні для роботи з ІФА тест-системами**

Лабораторії, де проводять імуноферментний аналіз, мають бути укомплектовані таким устаткуванням:

- термостатом, збереженим на підтримання температури 37 °С;
- холодильником з морозильною камерою;
- дистильатором лабораторним для отримання дистильованої води;
- промивачем для планшетів (вошером);
- спектрофотометром багатоканальним (ридером);
- центрифугою для приготування зразків;
- набором автоматичних піпеток (мікродозаторів), до якого входять одноканальні піпетки змінного об'єму, збережені на дозування 5-40, 40-200 та 200-1000 мкл рідини, а також 8-канальні піпетки змінного об'єму на 5-50 та 50-200 мкл та наконечниками для дозаторів.

#### Додаткові реактиви та матеріали

- набір мірного хімічного посуду,
- ванночки для розчинів;

при тестуванні зразків сироваток з низьким оптичним сигналом у первинному ІФА (тести RIBA мають вищий показник специфічності, ніж ІФА, проте поступаються їм за чутливістю). Але все ж таки вважається, що сьогодні не можна повністю відмовитися від тестів, базованих на ІВ, при обстеженнях на ГС. Так, наприклад, при проведенні верифікаційних досліджень на наявність анти-ВГС серед осіб, які мають низький ризик інфікування збудником, у популяції з невеликим рівнем поширення інфекції ВГС саме тест-системи RIBA виявилися найдоцільнішими як з точки зору ефективності підтверджувальних досліджень, так і з економічних міркувань.

Сьогодні у широкій лабораторній практиці у більшості випадків визначають сумарні антитіла до ВГС або антитіла, що належать до імуноглобулінів класу G. Кореляція між виявленням анти-ВГС методом ІФА та позитивними результатами визначення РНК вірусу за допомогою ІЛР складає біля 80 %; доведено, що наявність сумарних антитіл в 70-80 % випадків гострого процесу чи при загостренні ХГС свідчить про розмноження вірусу. Разом з тим ці антитіла достатньо часто оцінюють лише як «діагностичну позначку» або як рестроспективний маркер інфікування. Дійсно, визначення самих тільки сумарних анти-ВГС (так само, як і РНК вірусу) не дає змоги диференціювати гострий чи хронічний гепатит, наявну фазу захворювання. Проте виявлення сумарних анти-ВГС навіть при відсутності будь-якої симптоматики повинне насторожити лікаря, і логічно продовжувати спостереження за таким пацієнтом, вдавшись до поглибленого клініко-лабораторного обстеження з метою підтвердити чи заперечити діагноз ГС. Разом з тим на діагностичному ринку з'являються тест-системи, що дають змогу виявляти антитіла до окремих білків ВГС, розрізняти класи, до яких належать анти-ВГС (IgG, IgM). Як вже зазначали, діагностикуми, що виявляють антитіла до окремих структурних та неструктурних білків ВГС, можна застосовувати для верифікації результатів первинного тестування. До того ж ці тест-системи допомагають отримати певну діагностичну інформацію (таблиця 2).

Таблиця 2 Маркери інфікування ВГС на різних стадіях інфекційного процесу

Гепатит С	Маркери інфікування	
	Серологічні	РНК вірусу
Гостра фаза	<ul style="list-style-type: none"> <li>•спочатку в циркуляції визнаються лише анти-ВГС core IgM, анти-NS3 (можлива присутність анти-NS3, анти-NS4* та анти-NS5 одночасно);</li> <li>•поступове зростання титрів анти-ВГС core IgG.</li> </ul>	+
Одужання**	<ul style="list-style-type: none"> <li>•анти-ВГС core IgM зникають після 8-го тижня хвороби;</li> <li>•визначаються анти-ВГС IgG (роки)***</li> </ul>	Не визна-чається
Латентна фаза хронічного ГС	<ul style="list-style-type: none"> <li>•стабільний рівень анти-ВГС core IgG;</li> <li>•високий вміст анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5;</li> <li>•можливе періодичне виявлення анти-ВГС core IgM – загострення</li> </ul>	Не визна-чається або вияв-яється в низьких концентра ціях
Фаза реактивації хронічного ГС	<ul style="list-style-type: none"> <li>•виявлення анти-ВГС core IgM у високих титрах;</li> <li>•анти-ВГС core IgG, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5</li> </ul>	+

Після інфікування ВГС найпершими в сироватці з'являються специфічні антитіла класу IgM (анти-ВГС core IgM)

\* Анти-NS4 можуть виявлятися при різних формах інфекційного процесу ГС.

\*\* Критерії одужання від ГС остаточно не встановлені: всі випадки хвороби, які тривають більше 6 місяців, розцінюються як хронічна ВГС-інфекція.

\*\*\* У більшості хворих циркуляція специфічних антитіл припиняється через 18-20 років після одужання

## ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

В останні роки імуноферментний аналіз (ІФА) став одним з найпоширеніших методів дослідження. Завдяки успіхам біотехнології та генної інженерії вдається одержувати високоочищені білки-антигени, різноманітні полі- та моноклональні антитіла заданої специфічності та афінності, ферменти-маркери та кон'югати ферментів з антигенами та антитілами.

Увесь процес імуноферментного аналізу можна розділити на три основних стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло (імунохімічний процес), введення в нього (приєднання до нього) мітки та її виявлення (візуалізація).

ІФА нині найпоширеніший завдяки ряду безперечних переваг. До них відносять високу чутливість, специфічність та відтворюваність результатів, можливість використання мінімальних об'ємів досліджуваних зразків біологічних рідин, доступність та стабільність реагентів, простоту та швидкість проведення реакції, інструментальний облік кінцевих результатів та автоматизацію майже всіх етапів ІФА, можливість проведення масових аналізів і, не в останню чергу, відносно низьку вартість діагностичних наборів. Слід зазначити, що хоча існує декілька варіантів ІФА (прямий, непрямий, конкурентний, "сандвіч"), в усіх них використовують кон'югат ферменту зі специфічними або антивидовими антитілами чи антигенами та проявник (суміш субстрату з хромогеном); в результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється. Це дає змогу візуально або автоматично оцінювати наявність антигенів або антитіл в досліджуваному матеріалі.

### Термінологія

Антиген ("імуноген") – речовина, що викликає виникнення специфічної імунної відповіді та специфічно реагує з антитілами, які виникають при введенні антигену в організм.



перенесеними від матері; в такій ситуації рекомендується провести дослідження на присутність вірусної РНК.

При обстеженнях за епідемічними показаннями найбільш інформативні специфічні маркери інфікування – це сумарні антитіла проти ВГС, а також анти-ВГС core IgM. До підтверджувальних досліджень слід підходити диференційовано: якщо ризик інфікування високий, тоді доцільно проводити верифікацію з використанням додаткових тестів ІФА, а якщо низький – методом ІБ; невизначені результати серологічної діагностики потребують підтвердження із застосуванням ПЛР. Для встановлення джерела інфекції корисними будуть дослідження, що дозволяють визначати генотип вірусу.

Алгоритм первинних та підтверджувальних серологічних та молекулярно-біологічних досліджень з профілактичною метою залежить від того, до якої групи ризику належить обстежувана особа. При проведенні сероепідеміологічних досліджень достатньо провести визначення сумарних анти-ВГС антитіл.

до *core*-білку ВГС. Присутність цих антитіл, як правило, збігається з наявністю віремії і підвищеною активністю АЛАТ (інді у окремих пацієнтів активність АЛАТ не підвищується). Кореляція між виявленням РНК вірусу в сироватках крові та анти-ВГС core IgM, за різними даними, складає 77-92 %. При цьому анти-ВГС core IgM виявляють у сироватках крові 50-93 % пацієнтів з гострим ГС та у 50-70 % хворих на ХГС. Трохи пізніше визначаються анти-NS3 (можлива присутність анти-NS3, анти-NS4 та анти-NS5 водночас), а потім – анти-ВГС core IgG. Експресія NS3 збігається з посиленням розмноження ВГС, а концентрація анти-NS3 поступово знижується протягом року, після чого припиняється віремія. Білок, кодований вірусним геном NS4, вважається найбільш імуногенним; його експресія мало змінюється при різних формах ГС, і анти-NS4 можна виявити майже у 100 % осіб, заражених ВГС.

Наявність антитіл до NS4 у ряді випадків побічно підтверджує активне розмноження ВГС при ХГС, а виявлення їх у хворих на гострий ГС може свідчити про початок хронізації гепатиту. Щодо значення анти-NS5 єдиної думки немає. Як вважає ряд дослідників, практично немає хворих, у сироватках крові яких є окремі антитіла до білків, кодованих NS5. Разом з тим доведено, що в сироватках біля 5 % інфікованих осіб присутні антитіла тільки до цього антигену. В цілому, виявлення антитіл до білків ВГС, кодованих NS5, корелює з наявністю вірусної РНК при нормальних біохімічних показниках крові. В усякому разі, цей білок – необхідний компонент імуносорбенту при створенні тест-систем для знаходження антитіл до ВГС на основі ІФА.

Слід пам'ятати, що виявлення антитіл до різних білків ВГС за допомогою ІФА інформативне лише в тому разі, коли серологічні дослідження проводяться систематично в динаміці інфекційного процесу, з урахуванням того, що постійно буде визначатися певний спектр антитіл при застосуванні тих самих діагностичних препаратів (результати тестування значною мірою залежать від спектру антигенів ВГС у складі імуносорбенту тест-системи). Щодо одноразового виявлення антитіл до окремих білків ВГС, то інтерпретація результатів такого аналізу може бути неоднозначною (таблиця 3).

Таблиця 3. Варіанти інтерпретації результатів виявлення антитіл проти ВГС

Маркери інфікування	Тракування результтів дослідження
Анти-ВГС (сумарні)	Гострий ГС
Анти-ВГС core IgM + анти-ВГС core IgG	Хронічний ГС
Анти-ВГС core IgG + антитіла проти неструктурних білків вірусу	Ретроспективний маркер паст-інфекції
Анти-ВГС core IgM + анти-ВГС core IgG + анти-ВГС проти неструктурних білків	Гострий ГС
	Паст-інфекція
	Перехід в латентну фазу хронічного ГС
	Початок видужування
	Латентна фаза хронічного ГС
	Гострий ГС
	Загострення в латентну фазу хронічного ГС
	Фаза реактивації ХГС

#### Молекулярно-біологічні методи

Останнім часом у діагностику все більше впроваджуються молекулярно-біологічні методи виявлення РНК ВГС, засновані на ампліфікації нуклеїнових кислот (Nucleic Acid Amplification Technologies, NAT). Ці методи призначені для визначення генетичного матеріалу, кількісного виявлення РНК ВГС, характеристики вірусного генома, вивчення мутацій тощо. За допомогою цих методів можливо виявити РНК ВГС, вбудовану в геном заражених клітин при відсутності в сироватці крові вірусспецифічних антитіл або при їх кількості, недостатній для виявлення наявними серологічними методами. РНК ВГС можна визначити вже на 7-21 день після інфікування, тобто на декілька тижнів раніше, ніж антитіла до ВГС. Як матеріал для дослідження можна використати зразки, виділені не тільки зі

щойно отриманих біосубстратів, але і з заморожених, висушених або фіксованих проб, що містять частково зруйновані нуклеїнові кислоти.

Серед методів виявлення РНК ВГС розрізняють: метод гібридизації, метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), лігазну ланцюгову реакцію, метод NASBA (nucleic acids sequence amplification), транскрипційно опосередковану ампліфікацію (TMA, transcription-mediated amplification), метод гібридизації з використанням розгалужених зондів (branched DNA assay, bDNA), ПЛР у реальному часі (RT PCR, real-time PCR). У практиці найчастіше застосовують методи гібридизації in situ та ПЛР.

НВК „Діапроф-Мед” в даний час починає випуск тест-наборів „DIA-Amplisens HCV-Monitor” для кількісного виявлення РНК вірусу гепатиту С методом зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції.

Виявлення комплексу специфічних діагностичних маркерів ВГС повинно здійснюватися в залежності від мети і завдань дослідження, що і обґрунтовує певний спектр необхідних методологічних підходів та відповідних тестів.

Якщо обстеження проводиться з діагностичною метою, то на першому етапі необхідно проводити тестування на сумарні анти-ВГС антитіла методом ІФА. При отриманні позитивного результату первинного аналізу доцільно використовувати для підтвердження ту саму тест-систему на основі ІФА або альтернативний додатковий діагностикум на основі ІФА для аналізу повторно взятої сироватки крові. Позитивний результат повторного тестування диктує необхідність поглибленого клініко-лабораторного обстеження, щоб встановити стадію інфекційного процесу, міру пошкодження печінки, призначити та коригувати противірусну терапію. Якщо передбачається специфічне лікування, то спектр лабораторних тестів повинен включати встановлення генотипу вірусу, якісні та кількісні молекулярно-генетичні дослідження, або, як альтернативу останнім – визначення анти-ВГС core IgM та антитіл до окремих білків вірусу. Якщо обстежують дитину у віці 6-15 місяців, народжену ВГС-інфікованою матір'ю, не треба визначати антитіл проти збудника, бо вони можуть бути пасивно