

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

## СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГЕПАТИТУ В

Практичний посібник

Київ-2004

УДК 616.36-002.2-078

СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГЕПАТИТУ В:

Практичний посібник

Під редакцією доктора медичних наук,

професора Гураля А.Л.

Автори:

А.Л.Гураль, В.Р.Шагінян, Т.А.Сергєєва, Н.В.Іванська,

Є.С.Донська, Г.Є.Раєвська, В.О.Шеховцов

Для лікарів-лаборантів, епідеміологів вірусологів, лікарів-інфекціоністів та лікарів загальноотерапевтичного профілю, біологів, студентів вищих навчальних закладів та аспірантів

Київ, „Діапроф-Мед”

ЗМІСТ

Скорочення використані в тексті посібника	3
Вступ	4
Етіологія	4
Патогенез	7
Епідеміологія	8
Специфічна діагностика ГВ	12
Профілактика гепатиту В	17
Імуноферментний аналіз	18
Термінологія	18
Обладнання, необхідне для роботи з імуноферментними тест-системами	19
Необхідні застереження	20
Правила роботи з імуноферментними тест-системами	21
Підготовка зразків	21
Тест-система імуноферментна “DIA-HBV”	22
Характеристика показників якості	24
Тест-система імуноферментна “DIA-C-HBV”	27
Тест-система імуноферментна “DIA-HVscore”	30
Характеристика показників якості	32
Література	34

### ЛІТЕРАТУРА

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

### Скорочення, використані в тексті посібника:

- АГ – антиген;  
 АТ – антитіло;  
 АЛАТ – аланін амінотрансфераза;  
 ВГВ – вірус гепатиту В;  
 ГВ – гепатит В;  
 ГГВ – гострий гепатит В;  
 ГЗ – граничне значення (показника оптичної густини);  
 ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;  
 ІФА – імуноферментний аналіз;  
 К<sup>+</sup> – позитивна контрольна проба;  
 К<sup>-</sup> – негативна контрольна проба;  
 ОГ – оптична густина;  
 ОФД – ортофенілдендіамін (о-фенілдендіамін);  
 РНК – рибонуклеїнова кислота;  
 ТМБ – 3,3',5,5' -тетраметилбензидин;  
 ХГВ – хронічний гепатит В;  
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередження захворювань;  
 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз, ТФА;  
 HBsAg (core antigen of the hepatitis B virus) – серцевинний ("коровий") антиген вірусу гепатиту В;  
 HBsAg (surface antigen of the hepatitis B virus) – поверхневий антиген вірусу гепатиту В;  
 HBxAg – х-антиген вірусу гепатиту В;  
 USA FDA (USA Food and Drug Administration) – Федеральна Агенція США з питань продовольства та медикаментів.

## ВСТУП

Гепатит В (ГВ) залишається однією з найпоширеніших інфекційних хвороб і важливою проблемою охорони здоров'я багатьох країн світу. За оцінками експертів ВООЗ, у світі інфіковано вірусом ГВ (ВГВ) понад 2 млрд. людей. Щороку первинно заражаються ВГВ більш як 50 млн. чоловік і від 1,5 до 2,0 млн. помирають від захворювань печінки, викликаних цією інфекцією.

ГВ характеризується не тільки широким розповсюдженням, високим рівнем захворюваності, нерідко важким перебігом, але й схильністю до формування хронічних уражень печінки. У 5-10 % і навіть у 15 % хворих на ГВ, незалежно від форми інфекційного процесу, гострий гепатит трансформується в хронічний. Більш того, у дітей, які народилися від інфікованих матерів, в тому числі хворих на гострий ГВ (ГГВ) і жінок з персистентною HBs-антигеномією, ризик розвитку хронічної інфекції може досягати 90 %. Труднощі в боротьбі з ГВ значною мірою визначаються існуванням при цій інфекції хронічних вірусносіїв, число яких у світі досягає 350 млн. чоловік. При цьому поглиблене обстеження таких осіб доводить, що у більшості з них присутні ознаки хронічного ГВ (ХГВ). В свою чергу, ХГВ може мати прогностично несприятливий перебіг і приводити у 1/3-1/4 інфікованих до розвитку цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми. Приблизно 80 % первинних ракових захворювань печінки пов'язують з ВГВ.

## Етіологія

Перші відомості про збудник гепатиту В отримав у 1965 р. B.S. Blumberg. У 1970 р. D. Dane і співавт. вперше описали повні віріони ВГВ, названі часточками Дейна, а в 1971 р. J. Almeida та співавт. встановили структуру вірусу. Вірус ГВ належить до родини *Hepadnaviridae*, тобто печінкових вірусів, які містять ДНК. ДНК ВГВ являє собою кільцеву молекулу, що складається з двох ланцюгів, одна з яких – плюс-ланцюг, коротша за іншу (мінус-ланцюг). Плюс-ланцюг постійно

## Специфічність

При визначенні специфічності тест-системи «DIA-NVscore» було проаналізовано 26097 рандомізованих зразків від донорів крові, з них було визначено позитивними 2236 проб, після повторного тестування осталося позитивними 2089 зразків. Хибно-позитивними оказались 167 зразків сироваток. Специфічність тест-системи становила 99,4 %. В зразках донорів виявлена незначна неспецифічна реактивність – 0,6 %.

## Основні властивості і переваги

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високоспецифічного рекомбінантного НVscore-білка в складі імуносорбенту.
- Візуальний контроль внесення зразків сироватки або плазми в лунки планшета за рахунок зміни кольору розчину.
- Відкрита система, яка легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- 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 ГМБ або ОФД.
- Термін придатності 12 місяців.

### 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.

### Характеристика показників якості

#### Чутливість

Визначення чутливості тест-системи «DIA-HBcore» проводили на 72 зразках стандартної панелі сироваток від хворих з гепатитом В, які містять антитіла проти корового антигену вірусу гепатиту В, представленої лабораторією гепатитів та ВІЛ-інфекції Інституту епідеміології та інфекційних хвороб АМНУ. Всі зразки були визначені як позитивні.

добувається за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Добудовані віріони містять повноцінну ДНК, що обумовлює здатність ВГВ до реплікації і, відповідно, їхню інфекційність. Недобудовані віріони дефектні і нездатні до розмноження. Особливості репродукції ВГВ, обумовлюють ймовірність помилки синтезу, багатоваріантність і гетерогенність вірусу. Різні штами вірусу можна виділити як від одного, так і від різних хворих.

Діаметр віріона – 42-45 нм. Схематичну структуру вірусу подано на рисунку 1.

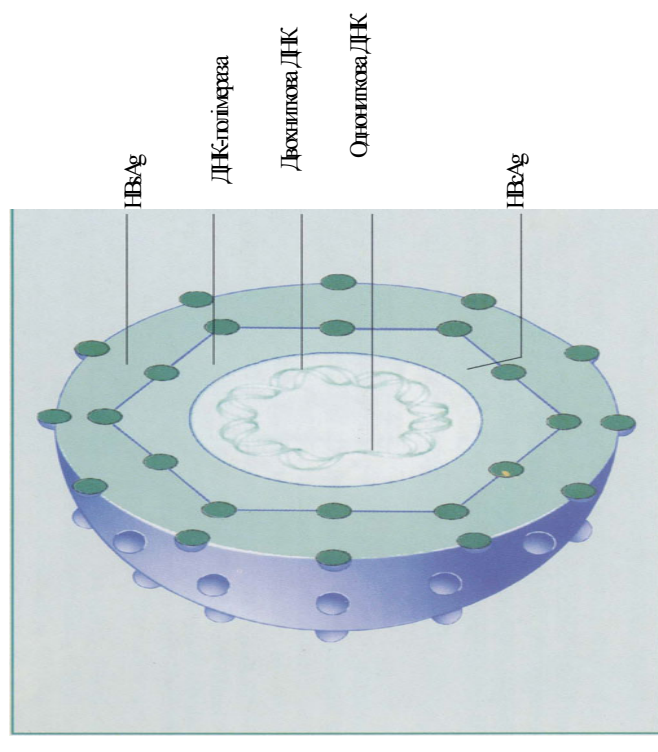


Рис. 1 Структура вірусу гепатиту В

У серцевині (core) вірусу розташовані вірусні білки, важливі для розмноження ВГВ. Це внутрішній, або серцевинний антиген - HBcAg, і близький до нього HBeAg. У серцевині

вірусу є ще один антиген, названий НВхAg. Зовнішню оболонку вірусу утворює поверхневий антиген - НВsAg, спочатку названий австралійським, тому що вперше був виділений із крові аборигенів Австралії. Зміст у крові НВsAg варіює в широких межах – від концентрацій, що виявляються тільки дуже чутливими методами індикації (0,05-1 нг/мл) до концентрацій порядку 500 мкг/мл, що наближаються до концентрацій власних сироваткових білків хворого. При хронічних формах ГВ, що супроводжуються інтеграцією ВГВ у геном гепатоцитів, можливий надлишковий синтез НВsAg. На основі антигенних характеристик виділяють 4 основних субтипи НВsAg: adw, adf, auw, аут.

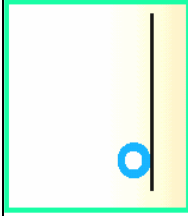
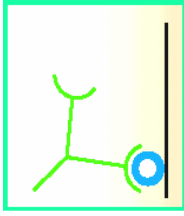
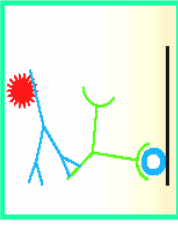
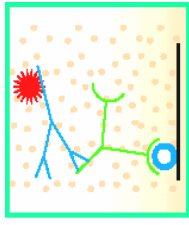
Додаткові поверхневі антигени, важливі для взаємодії вірусу з печінковими клітинами, – це білки rge-S<sub>1</sub> і rge-S<sub>2</sub>. Вірус гепатиту В високостійкий проти дії високих температур, хімічних і фізичних впливів (таблиця 1).

Таблиця 1 Вплив фізико-хімічних факторів на інфекційну активність ВГВ

Фактори	Інфекційна активність
Температура 30-32 °С	Зберігається протягом 6 місяців
Висушування при 25 °С	Зберігається протягом 1 тижня
Прогрівання при 60 °С	Повна інактивація через 10 год.н
Температура 98 °С	Часткова інактивація через 1 хв. Повна інактивація через 20 хв.
Температура 160 °С (сухий жар)	Повна інактивація через 1 год.
Автоклавування (121 °С, 1 атм.)	Повна інактивація протягом 30 хв.
Значення рН 2,4	Інфекційність втрачається протягом 6 год.
Хлорамін (3-5 %)	Повна інактивація через 2 год.
Формалін (0,1 %)	Повна інактивація
Рентгенівське опромінення (5 МР)	Повна інактивація
УФО + бета-пропіолактон	Зменшення інфекційності в 10 млн. разів

### Схема 3 Проведення ІФА на тест-системі “DIA-НВscore”

#### Етапи аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові планшети, сенсйбілізовані рекомбінантними білками аналогами НВscore	
Внесення в лунки стрипів розчину для розведення зразків і по 20 мкл зразків контролів та досліджуваних 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	

### Методика роботи з тест-системою імуноферментною "DIA-HBscore"

"DIA-HBscore" - тест-система імуноферментна для виявлення IgG та IgM-антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В.

Набір призначений для первинного аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В методом імуноферментного аналізу.

#### Принцип аналізу

Головні компоненти набору - імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент - полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовані рекомбінантними поліпептидами - аналогами корового антигену вірусу гепатиту В. Кон'югат - суміш моноклональних антитіл проти імуноглобулінів класів G та M людини, кон'югованих з пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток, IgG та IgM антитіла, специфічні до HBscore антигену, зв'язуються з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. 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 (2M розчин сірчаної кислоти), і вимірюють оптичну густину (ОГ) суміші у лунках, яка при довжині хвилі 450 нм пропорційна концентрації специфічних антитіл у зразках сироваток або плазми крові.

### Патогенез

Парентеральний механізм передачі ВГВ забезпечує первинне проникнення збудника в кров. Вірус переноситься інфікованими лімфоцитами і мононуклеарами. Основні клітинні мішені при ГВ - гепатоцити. Руйнівна дія ВГВ на гепатоцити опосередкована імуною системою. Складна взаємодія інфекційного процесу і відповідної імунної реакції пояснює різноманіття клінічного плину ГВ – від безсимптомного носійства до найтяжких фульмінантних форм. В основі патоморфологічних змін, що розвиваються в печінці при ГВ, як і при інших вірусних гепатитах, лежить цитоліз гепатоцитів, обумовлений безпосередньо дією вірусу, імунний цитоліз як результат руйнування клітин, що містять HBcAg і HBsAg, та залежне від антитіл руйнування клітин печінки, які несуть на своїй поверхні комплекси антиген-антитіло. Під впливом T-лімфоцитів,

Відмінна риса інфекційного процесу при ГВ – широкі коливання реплікативної активності вірусу, що свідчить про генетичну неоднорідність ВГВ. Мутації ВГВ відбуваються в зоні pre-S-S гена ВГВ і в області pre-Cog/Сог. Мутантний штам Pre-S ВГВ із зміненою структурою оболонкових антигенів недоступний для антитіл проти HBsAg, що утворюються в результаті вакцинації. При зараженні цим вірусом рееструються переважно хронічні форми ГВ. Мутації в області pre-Cog/Сог призводять до припинення синтезу HBeAg. При цьому в сироватці крові виявляються антитіла до HBeAg і вірусна ДНК; це свідчить про активну реплікацію вірусу і велику небезпеку хворого для оточення.

При тривалому перебуванні вірусу в гепатоцитах відбувається інтеграція його генетичного апарату в геном клітини. Вірус стає недоступний для імунного контролю; це основний механізм становлення хронічної інфекції, викликаной ВГВ. Розрізняють три фази цього хронічного процесу:

1. Становлення імунної толерантності – відбувається активне розмноження вірусу та синтез його антигенів. У

тканині печінки можна бачити картину неактивного (персистентного) ВГВ.

2. Імунна елімінація, або сероконверсія – відбувається зникнення HBeAg, наростання активності амінотрансфераз, у печінці – наявність активного процесу запалення.

3. Інтеграція – віремія зменшується, у сироватці крові визначаються антитіла проти HBeAg, відбувається інтеграція ДНК вірусу в геном гепатоцитів. Гепатоцити, що містять інтегровану ДНК ВГВ, продукують HBeAg.

Наведені три фази розвиваються тільки в хворих, інфікованих "диким" штамом вірусу. При інфікуванні мутантним HBeAg-негативним штамом може розвинути 4-а фаза – поновлення реплікації ВГВ та імунологічно опосередковане враження печінки. Ця фаза характеризується наростанням рівня ДНК ВГВ, активності АлАТ, високими титрами антитіл проти HBeAg.

### Епідеміологія

Гепатит В – кров'яна інфекція з парентеральним механізмом передачі збудника.

*Основні джерела інфекції*, що визначають її широке розповсюдження, – хворі з хронічними формами ГВ. Важлива роль належить носіям HBeAg. Спроможність ВГВ привалити час, а то й довічно персистувати в організмі людини, - це екологічно зумовлена форма його існування.

При ГГВ хворий заразний, починаючи з останніх тижнів інкубації і до повної санатції організму в періоді реконвалесценції. При хронічних формах тривалість епідемічно небезпечного періоду необмежена.

Потенційні джерела та водночас групи ризику при ВГВ-інфекції – це:

- Донори і реципієнти крові, її препаратів, сперми, органів.
- Наркомани, які практикують внутрішньовенне введення наркотиків.
- Медичні працівники, які мають професійні контакти з

### Форма випуску наборів



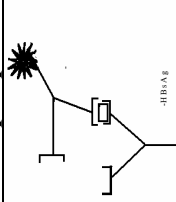
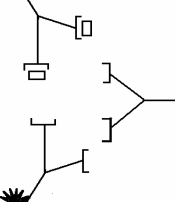
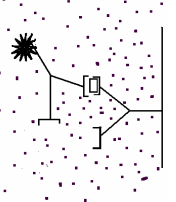
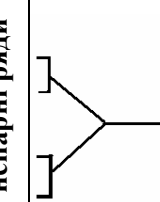
- набір Фб-стрип – стриповий планшет, хромоген – таблетки ОФД; тест-система розрахована на 6 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 2 стрипи (32 лунки);
  - набір Гб-стрип – стриповий планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на 6 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 2 стрипи (32 лунки).
- Набір розраховано на проведення 96 аналізів.

### Основні властивості і переваги

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високоафінних і специфічних моноклональних антитіл в складі імуносорбенту, нейтралізуючого компонента та імуноферментного кон'югату.
- Одночасна інкубація сироваток і кон'югату.
- Відкрита система, яка легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- Загальноприйнята стандартизація обліку результатів.
- Тривалість аналізу 2,5 години.
- Один набір розраховано на 96 аналізів.
- Різні варіанти комплектації наборів по вибору споживача: стриповий або монолітний планшет, хромоген ТМБ або ОФД.
- Термін придатності 12 місяців.



Схема 2 Проведення ІФА на тест-системі “DIA-C-НСУ”

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані рекомбінантними антигенами.	
Внесення в лунки по 100 мкл контролів і зразків сироваток.	
Внесення в лунки по 50 мкл розчину кон'югату.	<b>парні ряди</b>
Інкубація протягом 120 хв. при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ з кон'югатом).	
Внесення в лунки по 50 мкл розчину кон'югату з НК.	<b>непарні ряди</b>
Інкубація протягом 120 хв. при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ з НК в розчині).	
Промивання лунки 6 разів буфером	<b>парні ряди</b>
Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника. Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення).	
Зупинення реакції стоп-реагентом	<b>непарні ряди</b>
Ресстрація оптичної густини	

кров'ю та іншими біосубстратами хворих.

- Персонал і пацієнти відділень гемодіалізу, гематології, реанімації, онкологічних і туберкульозних стаціонарів.
- Персонал і пацієнти відділень хірургічного профілю.
- Хворі на хронічні захворювання печінки і жовчопровідних шляхів.
- Пацієнти, які проходять тривалі і/або часті курси ін'єкційної терапії.
- Гомосексуалісти.
- Особи, які часто міняють статевих партнерів при незахищених сексуальних контактах.
- Діти, народжені від інфікованих матерів.
- Хворі та персонал установ для розумово відсталих, будинків дитини.
- ВІЛ-інфіковані.
- Особи, які приїхали з регіонів, ендемічних з гепатиту В.

*Основний фактор передачі при ГВ - кров. Вірус можна виявити і в інших біологічних рідинах: спермі, піхвовому секреті, асцитній рідині, зрідка в слині і грудному молоці, однак у більш низьких, ніж у крові, концентраціях. Зараження ГВ можливе при інокуляції дуже малих об'ємів крові - 0,0005 мл. Доза крові, необхідна для інфікування ВГВ, у 100 разів менша, ніж, наприклад, при ВІЛ-інфекції. Тривале зберігання вірусу на об'єктах зовнішнього середовища розширює спектр можливих факторів передачі збудника. До них належать: інструменти для гоління та манікюру, гребінці, зубні щітки, ножиці, мочалки та інші предмети спільного користування.*

*Шляхи передачі. Реалізація парентерального механізму передачі ВГВ відбувається в природних і штучних умовах. Природні шляхи передачі - статевий, перинатальний і горизонтальний (у результаті побутових гемоперкутанних контактів). До штучних шляхів зараження відносять парентеральні медичні і немедичні втручання: лікувально-діагностичні, профілактичні й оперативні маніпуляції, внутрішньовенне введення наркотичних речовин.*

Найповніше вивчено штучні шляхи передачі в результаті медичних парентеральних маніпуляцій. За даними І.А.Храпунової і співавт. (2003 р.), найважливіші чинники інфікування парентеральними вірусними гепатитами в стаціонарах це: ін'єкції (27,2 %), оперативні втручання (23,7 %), взяття крові з вени (26,1 %). Ризик інфікування при переливаннях крові складає 5,3-7,7 %. Впровадження та реалізація комплексу заходів, спрямованих на запобігання штучного парентерального інфікування при медичних маніпуляціях, призвело до зменшення ролі медичних втручань в інфікуванні ВГВ. Проте, останнім часом зростає епідемічна значимість передачі збудника при ін'єкційному введенні наркотиків та статевим шляхом. Частота перинатальної передачі ВГВ коливається від 10 до 90 % та залежить від активності інфекційного процесу у матері.

*Поширеність* ВГВ-інфекції у світі нерівномірна, що дозволяє виділяти регіони з високою, проміжною і низькою ендемічністю. Частота виявлення серологічних маркерів ГВ складає в регіонах з високою ендемічністю 70-95% (8-20 % вірусоносіїв), з проміжною – 20-55 % (2-7 % вірусоносіїв), з низькою – 4-6 % (2 % вірусоносіїв). Значимість тих або інших шляхів передачі також змінюється в залежності від регіону. У регіонах із високою ендемічністю переважають перинатальна та горизонтальна передача ВГВ, тоді як у регіонах із низьким рівнем ендемічності основний шлях передачі – статевий.

Україна належить до регіонів із проміжною ендемічністю ГВ. Показники захворюваності на ГВ в Україні з 1970 р. (початок офіційної реєстрації) до 1989 р. зросли у 4,6 разів – з 6,8 до 31,5 на 100 тис. населення. Вирішальним фактором, який сприяв зростанню захворюваності на ГВ у цей період, був штучний парентеральний шлях передачі збудника при проведенні медичних маніпуляцій. У 1990 р. захворюваність на ГВ залишалась високою (29,6 на 100 тис. населення), а в наступні 6 років (1991-1996) її рівень декілька знизився і складав в середньому 24,6 на 100 тис. населення. У 1997-2003 рр. знов намітилась тенденція до зниження захворюваності,

### Методика роботи з тест-системою імуноферментною "DIA-C-HBV"

"DIA-C-HBV" - тест-система імуноферментна для підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в зразках сироваток та плазми крові людини після первинного скринінгу методом імуноферментного аналізу

#### Принцип аналізу

Головні компоненти набору - імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент - полістироловий планшет, лунки якого сенсифілізовані моноклональними антитілами (МКА) до HBsAg. Імуноферментний кон'югат - моноклональні антитіла до HBsAg, кон'юговані з пероксидазою хрому. НК - моноклональні антитіла до HBsAg.

При внесенні в лунки планшету зразків сироваток інфікованої крові HBsAg зв'язується зі специфічними антитілами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного до HBsAg імуноферментного кон'югату. Після відмивання нез'язаних неспецифічних антитіл 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 антитіл у зразках сироваток або плазми крові.

Метод підтвердження результатів скринінгового аналізу на наявність HBsAg базується на принципі блокування поверхневого антигену вірусу гепатиту В у зразках сироваток моноклональними антитілами проти HBsAg (нейтралізуючим компонентом - НК). При внесенні в реакційне середовище НК відбувається інгібування утворення комплексу АГ-АТ на твердій фазі через зв'язування антигенних детермінант HBsAg МКА нейтралізуючого комплексу, що призводить до зниження оптичної густини забарвленого розчину в лунках (схема 2).

### Основні властивості і переваги

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високоафінних і специфічних моноклональних антитіл в складі імуносорбенту та імуноферментного кон'югату.
- Відкрита система, яка легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- 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.
- Термін придатності 12 місяців.

проге її рівень залишався достатньо високим (середньорічний показник 18,5 на 100 тис. населення), це свідчить, що епідемічне неблагополуччя по ГВ в країні триває. Територіальну розповсюдженість ГВ в Україні показано на рисунку 2.

Відбулися зміни в структурі шляхів передачі вірусу ГВ. У Києві, наприклад, питома вага хворих, інфікованих при проведенні медичних парентеральних маніпуляцій, знизилась з 52,1 % у 1989 р. та 27,3 % у 1995 р. до 11,2 % у 2002 р. Разом з тим зросла кількість хворих, які заразилися статевим шляхом (з 13,3 % у 1995 р. до 36,2 % у 2002 р.) та при ін'єкційному введенні наркотичних речовин (з 11,6 % у 1993 р. до 33,2 % - у 2000 р., 28,7 % - у 2002 р.). В останні роки (1996-2002) серед хворих на ГВ переважають особи у віці 15-29 років (їх понад 70 %).

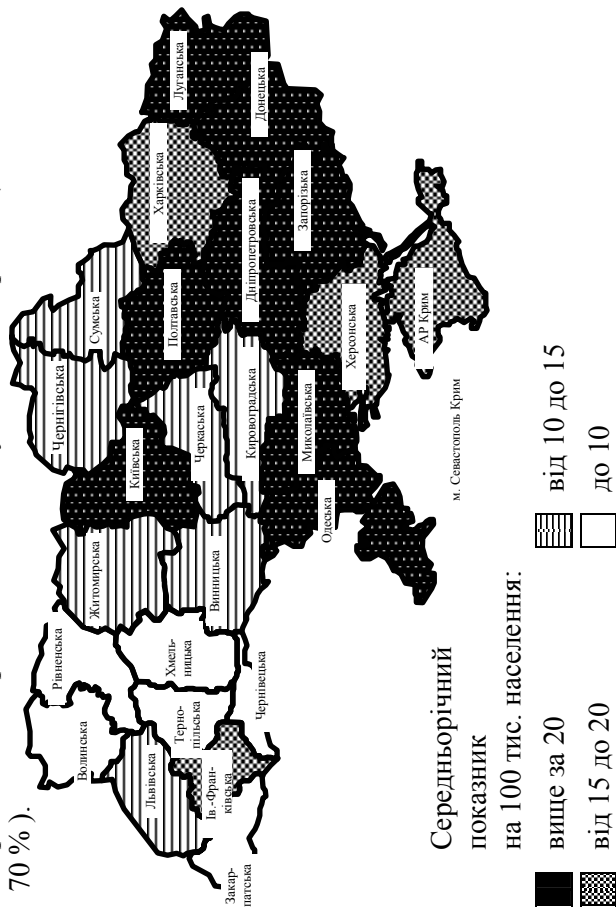


Рис. 2. Захворюваність на гепатит В (середньорічні показники за 2000 - 2002 р.р.)

За сучасними уявленнями, результати сероепідеміологічних досліджень, спрямованих на виявлення специфічних маркерів інфікування в зразках крові можуть розглядатися як критерій розповсюдження інфекції серед окремих груп населення, на певній території, у популяції в цілому. Дослідження, проведені в Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського АМН України, дозволили встановити, що найвищі показники частоти виявлення актуальних маркерів інфікування ВГВ (HBsAg та антигін проти HBsAg) відмічені при обстеженні ін'єкційних наркоманів (відповідно 15,0 % та 55,9 %), ВІЛ-інфікованих (10,2 % та 49,5 %), пацієнтів шкірно-венерологічного диспансеру (ШВД) (6,5 % та 36,8 %). Дотепер залишається достатньо високою ймовірність внутрішньолікарняного інфікування. Серологічні маркери інфікування (HBsAg, антигін проти HBsAg), що дозволяють об'єктивно оцінити інтенсивність епідемічного процесу, виявлені відповідно у 4,2 % та 24,4 % пацієнтів спеціалізованих відділень лікувальних закладів (з ШВД включно) та у 5,4 % і 26,8 % медичних працівників. В той же час в сироватках крові безоцлатних донорів крові, які служили групою порівняння, HBsAg виявлено у 1,4%, а антигін проти HBsAg – у 13,9 % випадків.

Аналіз захворюваності на ГВ в Україні та результатів сероепідеміологічних досліджень свідчить, що основний чинник, який сприяє поширенню цієї інфекції за сучасних умов – це внутрішньовенне введення наркотичних речовин. Досі актуальна можливість внутрішньолікарняного розповсюдження ГВ серед пацієнтів і персоналу лікувальних закладів різного профілю. Зростає значення природних шляхів інфікування вірусом ГВ – перинатального, статевого та у сімейних осередках інфекції.

### Специфічна діагностика ГВ

Специфічна діагностика ГВ базується на виявленні антигенів вірусу або відповідних антигін, що виробляються у

Таблиця 4 Визначення чутливості тест-системи «DIA-HBV» на панелях сироваток і стандартних зразках HBsAg

Панель або стандарт	Чувствительність «DIA-HBV»	
	хромоген ОФД	хромоген ТМБ
AFSSAPS, панель зразків HBsAg, субтипи adw2 і ауw3	0,3 нг/мл	0,2 нг/мл
РНА 806 (ВВІ), панель зразків HBsAg, субтип ad	0,3 нг/мл	0,2 нг/мл
РНА 806 (ВВІ), панель зразків HBsAg, субтип ау	0,3 нг/мл	0,2 нг/мл

Згідно з отриманими результатами чутливості тест-набору «DIA-HBV» знаходиться в межах 0,2-0,3 нг/мл при використанні різних стандартів HBsAg субтипів ad і ау. При дослідженні 212 зразків сироваток від хворих на хронічний гепатит В не було виявлено хибно-негативних результатів.

### Специфічність

Визначення специфічності тест-системи «DIA-HBV» проводили з використанням рандомізованої вибірки зразків донорської крові, а також на зразках сироваток, отриманих від вагітних жінок і хворих пацієнтів з різними інфекційними захворюваннями (ЦМВ-інфекція, герпетична інфекція, туберкульоз, червоничка (краснуха), сифіліс і гепатити іншої етіології).

Специфічність «DIA-HBV» при аналізі 8869 рандомізованих зразків донорів крові становила 99,2 %. Дослідження зразків сироваток крові від інших вищевказаних груп пацієнтів не виявили значної перехресної реактивності (не більше 1,3 % хибно-позитивних результатів).

### 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 І2-моноліт – монолітний планшет, хромоген – розчин ТМБ; тест-система розрахована на проведення 2 постановок імуноферментного аналізу: 1 постановка – 1 планшет (96 лунок);

Набір І12-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 контролю).

### Характеристика показників якості

#### Чутливість

Визначення чутливості тест-системи «DIA-HBV» проводили шляхом тестування зразків сироваток хворих хронічним гепатитом В, а також на панелях і стандартах з визначеною концентрацією HBsAg.

Межу чутливості визначали з використанням панелей і стандартних зразків HBsAg виробництва Boston Biomedica Inc. (США), Агенції з контролю безпеки лікарських засобів (AFSSAPS, Франція).

інфікованому організмі. Кожен маркер окремо або в сполученні з іншими маркерами ВГВ-інфекції може бути важливим діагностичним і прогностичним критерієм, свідчити про ефективність проведеної терапії, бути індикатором перенесеної інфекції або формування імунної відповіді.

*HBsAg* при гострому ГВ може бути виявлений у сироватці крові в останні 1-2 тижні інкубації і протягом 4-6 тижнів клінічного періоду. Пізніше в більшості хворих HBsAg зв'язується з відповідними антитілами і утворює імунні комплекси, а тому не виявляється у вільному стані. Знаходження HBsAg у сироватці крові більш як через 6 місяців після початку хвороби – це прогностично несприятлива ознака, що вказує на можливість хронізації процесу. Кількісне або напівкількісне визначення концентрації HBsAg у сироватці крові в динаміці захворювання може допомогти у прогнозуванні перебігу ГГВ. Низькі концентрації HBsAg у початковому періоді захворювання – це сприятлива прогностична ознака. Високий вміст HBsAg при гострому ГВ вказує на активну реплікацію вірусу. В той же час при хронічному ГВ висока концентрація HBsAg може свідчити лише про активну його продукцію в гепатоцитах, коли сам вірус не розмножується. Відсутність HBsAg у сироватці крові не обов'язково свідчить про елімінацію вірусу і повне видужання. При прогресивному перебігу ВГВ-інфекції можливе зменшення концентрації HBsAg до показників, які не можна визначити навіть найчутливішими методами. При цьому в хворих може виявитися вірусна ДНК.

*HBcAg*, білок з дуже високою імуногенністю, можна виявити тільки в біоптатах печінки в ядрах гепатоцитів, у крові нез'язаний HBcAg не виявляється.

*HBeAg* при гострому ГВ виявляється у крові на ранніх етапах інфекційного процесу і, як правило, він зникає ще при наявності HBsAg у крові. HBeAg – це маркер активної репродукції вірусу; він має клінічне й епідеміологічне значення.

Небезпека зараження кров'ю, що містить HBeAg, на багато порядків (у  $10^6$  разів) перевищує небезпеку зараження кров'ю після сероконверсії HBeAg → анти-HBe. При циклічному перебігу ГТВ сероконверсія HBeAg → анти-HBe відбувається протягом 6-8 тижнів. Виявлення HBeAg протягом більш як 6 тижнів розцінюють як несприятливий прогноз. Варто пам'ятати, що HBeAg має тільки так званий «дикий» штам вірусу ГВ. Його мутантна форма характеризується відсутністю HBeAg у сироватці крові при високій вірусній реплікації й активному інфекційному процесі в хворого.

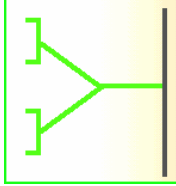
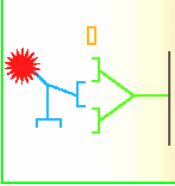
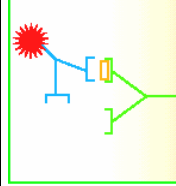
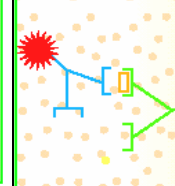
*Анти-HBs* у хворих на гострий ГВ виявляються в крові через тривалий час після зникнення HBsAg. Період «вікна» коливається від 3 місяців до року. При хронічному перебігу ГВ у частини хворих антитіла проти HBsAg можуть виявлятися одночасно з цим антигеном. Вони важливі для оцінки клінічного перебігу інфекційного процесу при ГВ. Виявлення цих антитіл, особливо при наявності також антитіл проти HBeAg – це надійний критерій розвитку постінфекційного імунітету. Визначення титру антитіл проти HBsAg служить найбільш інформативним тестом для оцінки ефективності вакцинації проти ГВ.

*Анти-HBc* – це найбільш ранній антигінгільний маркер ВГВ-інфекції, що може бути виявлений в інкубаційному періоді, ще до підвищення активності АлАТ. Анти-HBc класу IgM мають важливе діагностичне значення і вказують на активність інфекційного процесу. У фазу так званого «вікна» – після зникнення HBsAg і до появи антитіл проти нього – антитіла проти HBsAg стають єдиним маркером ВГВ-інфекції. АнтиHBc класу IgM циркулюють у крові протягом 4-8 тижнів, а потім, після завершення інфекційного процесу, зникають. Надалі (практично довічно) у всіх осіб, інфікованих ВГВ, у крові можна виявити антитіла проти HBsAg класу IgG. Осіб, у яких виявляються тільки анти-HBc, можна розглядати як потенційні

відмивання нез'язаних компонентів в 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 HBsAg у зразках сироваток або плазми крові.

### Схема 1 Проведення ІФА на тест-системі «DIA-HBV»

Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсйбілізовані моноклональними антитілами до HBsAg	
Внесення в лунки по 100 мкл зразків контролів і сироваток Внесення в лунки по 50 мкл розчину кон'югату	
Інкубація протягом 120 хв при 37 °С (формування комплексу АГ-АТ з кон'югатом) Промивання 6 раз буферним розчином	
Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену) Інкубація 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) Зупинення реакції додаванням стоп-реагенту. Ресстрація оптичної густини	

## Методика роботи з тест-системою імуноферментною "DIA-HBV"

### Загальна характеристика

Тест-система "DIA-HBV" являє собою набір, що включає наступні компоненти: імуносорбент – полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовані моноклональними антитілами до HBsAg; кон'югат – моноклональні антитіла до HBsAg, кон'юговані з пероксидазою хрому; позитивний контроль – інактивована сироватка крові людини, містить HBsAg вірусу гепатиту В; негативний контроль – сироватка крові людини, яка не містить поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та антитіла до ВЛГ, вірусу гепатиту С, збудника сифілісу Тетрапета ралідум; хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин); концентрат фосфатного буферу для промивання планшетів; розчин для розведення кон'югату; розчин для приготування проявника та стоп-реагент.

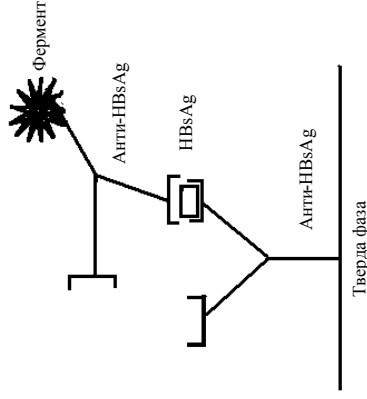


Рис. 5 Принцип імуноферментного аналізу

При внесенні в лунки планшету зразків сироваток інфікованої крові HBsAg зв'язується зі специфічними антитілами на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою специфічного до HBsAg імуноферментного кон'югату. Після

джерела інфекції: у 4-40 % із них у сироватці крові виявляється ДНК ВГВ. Антитіла проти HBsAg, виявлені при відсутності інших серологічних маркерів ГВ, називають «ізолітованими анти-НВс». Вони часто виявляються у ВЛГ-інфікованих (у 33,1 %), осіб з антитілами проти ВГС (9,3 %), при ко-інфекції ГС+ВЛГ-інфекція (5,3 %). Можливе пояснення даного явища – пригнічення експресії HBsAg іншими вірусами або результат мутації в «а»-детермінанті ВГВ, яка відповідає за репродукцію HBsAg. У таблиці 2 наводяться дані щодо клінічної інтерпретації результатів серологічного обстеження на маркери ГВ.

Таблиця 2 Інтерпретація результатів виявлення серологічних маркерів при різних формах вірусного гепатиту В

Серологічні маркери						Інтерпретація результатів	
HBs Ag	HBe Ag	анти HBc-IgM	анти HBc-IgG	анти-HBe	анти-HBs		
<b>Гострий ГВ</b>							
+	+	+	-	-	-	Кінець інкубаційного періоду, початок захворювання	
+/-	+/-	+	+	-	-	Розпал захворювання	
-/+	-/+	+	+	+/-	-	Розпал захворювання, початок одужання	
-	-	-/+	+	+	+/-	Одужання	
<b>Хронічний ГВ</b>							
+/-	-	-	+	-/+	-	Інтегративна фаза	
+	+	-/+	+	-	-	Репліквативна фаза	
-	-	-	+	-	+/-	Інфекція, що перенесена в минулому (роки)	
-	-	-	-	-	+	Післявакцинальний імунітет	

На рисунках 3 та 4 представлено основні серологічні профілі (динаміку виявлення серологічних маркерів) у хворих на гострий та хронічний ГВ.

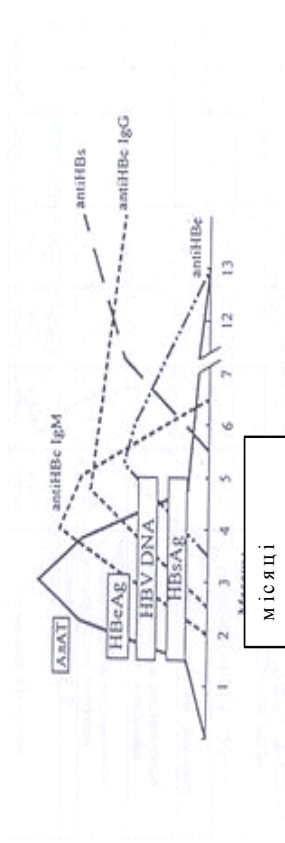


Рис. 3 Приблизний серологічний профіль, характерний для гострого гепатиту В

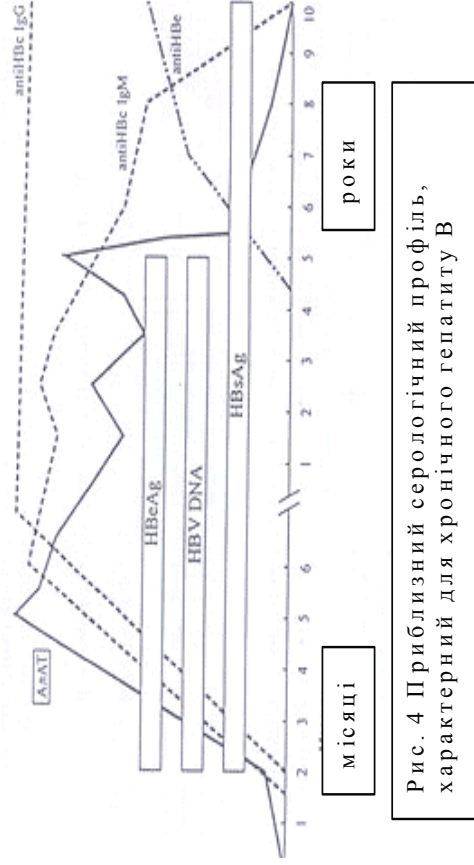


Рис. 4 Приблизний серологічний профіль, характерний для хронічного гепатиту В

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;  
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи 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, гіперліпемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.



### Додаткові реактиви та матеріали

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

### **Необхідні застереження**

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати 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

### **Профілактика гепатиту В**

Найбільш перспективна та соціально виправдана стратегія боротьби з ВГВ – це впровадження програм вакцинопрофілактики. Застосування вакцин призводить до виникнення захисного імунітету у 90-98 % щеплених. З метою визначення наявності післявакцинального імунітету та при необхідності проведення бустер-імунізації рекомендується визначати кількісний рівень антитіл проти HBsAg у сироватці крові (таблиця 3).

Таблиця 3 Післявакцинальний скринінг при гепатиті В

Титр антитіл проти HBsAg (МО/л)	Показання до бустер-вакцинації
< 10	Відсутність імунітету. Необхідна вакцинація.
10 – 100	Необхідна імунізація протягом року
> 1.000	Імунізація через 2 – 3 роки.
> 10.000	Імунізація через 3 – 6 років.

*Науково-виробнича компанія „Діапроф-Мед” серійно випускає наступні тест-системи для діагностики гепатиту В:*

"DIA-HBV" – тест-система імуноферментна для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в сироватках або плазмі крові людини;

"DIA-C-HBV" - тест-система імуноферментна для підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в зразках сироваток та плазми крові людини після первинного скринінгу методом імуноферментного аналізу

"DIA-HBscore" - тест-система імуноферментна для виявлення IgG та IgM-антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В.

## 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 антигенними 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.

Антитіло – складна природна сполука (глікозильований поліпептид), яка виникає як результат імунної відповіді організму при введенні в організм чи потрапленні 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 Starphylococcus aureus.

Проявник – суміш ферментного субстрату з хромогеном, що 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, розрахованим 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, розраховані 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;