

УДК 616.36-002:616-097

**ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ГЕПАТИТ С- ВИРУСНОЙ (HCV-) ИНФЕКЦИИ**

**В. М. Мицюра, О. В. Пантелейева, С. В. Жаворонок, Е. Л. Красавцев,
И.Л. Павлович, А.В. Воропаева, Аль-Ханса Аль-Шаби**

**Гомельский государственный медицинский университет
Гомельская областная инфекционная клиническая больница**

С целью оценки значения иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики HCV-инфекции, обследовано 500 больных с острыми и хроническими формами HCV-инфекции. В сыворотках крови этих больных определялись РНК HCV с помощью ПЦР и антитела к HCV (анти-HCV tot и у 35 больных анти-HCV IgM). Положительные результаты ПЦР наблюдались у 83% больных и чаще соответствовали повышенным значениям АЛТ ($\chi^2 = 25,01$; $p = 0,0001$). Положительные результаты ПЦР и ИФА наблюдались в 81,8% случаев, отрицательные результаты ПЦР и ИФА наблюдались в 0,4% случаев. В 17,8% случаев результаты ПЦР и ИФА не совпадали. В группе больных с выявленными анти-HCV IgM, РНК HCV выявлялась достоверно чаще ($p = 0,009$), чем при их отсутствии. Чувствительность теста анти-HCV IgM по сравнению с ПЦР 51,9%, специфичность — 100%. Определение антител к HCV класса IgM может применяться для оценки повышенной репликативной активности HCV. Совместное использование методов ПЦР и ИФА позволяет усовершенствовать лабораторную диагностику HCV-инфекции.

Ключевые слова: хронический гепатит С, РНК HCV, ПЦР, ИФА, антитела к HCV общий и класса IgM.

**THE USE OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
AND POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSTICS
OF HEPATITIS C VIRUS (HCV-) INFECTION**

**V. M. Mitsura, O. V. Panteleeva, S. V. Zhavoronok, E. L. Krasavtsev,
I. L. Pavlovich, A. V. Voropaeva, Al-Khansa Al-Shabi A.**

**Gomel State Medical University
Gomel Regional Infectious Clinical Hospital**

The aim of this study was to evaluate the significance of enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) and polymerase chain reaction (PCR) in diagnostics of hepatitis C virus (HCV-) infection. The sera samples from 500 of patients with acute and chronic forms of HCV-infection were tested by means of PCR and EIA (anti-HCV total and IgM in 35 of patients). PCR positive results were seen in 83% of patients and more often revealed in those patients with elevated ALT levels ($\chi^2 = 25.01$; $p = 0.0001$). Both PCR and EIA positive results were in 81.8% of patients, both negative — in 0.4%. In 17.8% of cases results of PCR and EIA didn't agree. In patients with anti-HCV IgM positive, HCV RNA were revealed more often than in those anti-HCV IgM negative ($p = 0.009$). Sensitivity of the anti-HCV IgM test in comparison with PCR was evaluated 51.9%, specificity — 100%. Detection of antibodies to HCV class IgM can be applied for an estimation of increased replicative activity of HCV. The use of both methods (EIA and PCR) allows improving HCV-infection diagnostics.

Key words: chronic hepatitis C, HCV RNA, PCR, EIA, antibodies to HCV total and IgM.

Введение

Актуальность инфекции вирусом гепатита С (HCV-инфекции) в настоящее время не вызывает сомнений. Так, в Республике Бела-

русь насчитывается около 100 000 лиц, инфицированных HCV, что составляет 1% населения страны, из которых 10% имеют манифестирующие формы инфекции [1]. Для HCV-

инфекции характерно длительное бессимптомное течение с отсутствием характерных клинических симптомов. При этом заболевание чаще всего выявляется на стадии хронического гепатита или даже цирроза печени. Поэтому лабораторная диагностика HCV-инфекции имеет очень большое значение [2, 3].

За последние годы лабораторная диагностика HCV-инфекции значительно улучшилась. Для скрининга HCV-инфекции применяется, в основном, иммуноферментный анализ (ИФА). На смену иммуноферментным тест-системам 1-го и 2-го поколений в практику пришли тест-системы 3-го поколения, позволяющие выявить 97% инфицированных HCV [3,4,5]. Однако антитела реже выявляются у больных с иммунодефицитами, включая ВИЧ-инфекцию, — лишь у 50–95% [4]. Антитела класса IgM могут выявляться не только при остром вирусном гепатите С (ОВГС), но и при хроническом гепатите С (ХГС) в период обострения заболевания и свидетельствуют об активной репликации вируса [6].

Выявление РНК HCV в сыворотке крови с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) характеризует вирусемию, свидетельствующую о продолжающейся активной репликации HCV. Метод ПЦР имеет высокую специфичность и чувствительность, с его помощью можно также определять концентрацию вируса в исследуемом материале. Также ПЦР используется для мониторинга терапии, поскольку исчезновение вирусемии — один из критериев эффективности терапии. Однако полностью не исключается возможность получения как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов [4]. Уровень виремии, выявляемый с помощью ПЦР, не всегда коррелирует с активностью процесса и значениями аланинаминотрансферазы (АЛТ) [7].

Цель исследования: оценить значение иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики HCV-инфекции.

Материалы и методы

Обследовано 500 больных с острыми и хроническими формами HCV-инфекции, находившихся на лечении и консультации в Гомельской областной инфекционной клинической больнице в 2003–2005 годах. Среди обследованных 500 больных — 180

(36%) женщин и 320 (64%) мужчин, средний возраст — $35,4 \pm 1,8$ лет. В возрасте до 20 лет было 73 больных (14,6%), 21–40 лет — 262 (52,4%), старше 40 лет — 165 (33%).

Из 500 обследованных у 15 человек (3,0%) был выставлен клинический диагноз «Острый вирусный гепатит С». У 485 из 500 человек (97%) диагностированы хронические формы HCV-инфекции: ХГС — у 373 больных (76,9%), ХГС в стадии цирроза печени — у 112 человек (23,1%).

Биохимическая активность ХГС (оценивалась у 470 чел.) на момент обследования в стационаре отсутствовала у 97 больных (20,6%), была минимальной (повышение АЛТ от 1 до 3 норм) — у 179 (37,7%), умеренной (повышение АЛТ от 3 до 10 норм) — у 154 (33,2%), высокой (АЛТ выше 10 норм) — у 40 человек (8,5%).

Сыворотки крови этих больных исследовались методом ИФА на обнаружение общих (total, IgM+IgG) антител к HCV (анти-HCV tot) с использованием тест-систем фирмы НПО «Диагностические системы» (Н.Новгород). Общие антитела к HCV определялись у 494 человек (98,8%). Сыворотки крови 35 пациентов тестировались на обнаружение антител к HCV класса IgM (анти-HCV IgM) с помощью тест-систем фирмы «ИмБио» (Н.Новгород). Из них у 14 (40,0%) выявлялись анти-HCV IgM. Сыворотки крови данных больных одновременно исследовались методом ПЦР на наличие РНК HCV с использованием тест-систем фирмы «АмплиСенс» (Россия). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы «STATISTICA v.6.0». Оценка значимости различия частот наблюдений в четырехпольных таблицах проводилась с помощью χ^2 -критерия Пирсона и точного критерия Фишера. Статистически значимой считалась 95% вероятность различий ($\alpha = 0,05$).

Результаты и обсуждение

Из 500 обследованных больных положительные результаты ПЦР наблюдались у 415 (83%), отрицательные — у 85 (17%).

Проведено сравнение частоты выявления РНК HCV в зависимости от биохимической активности: у больных с нормальными значениями АЛТ (до 0,20 мккат/л) и повышенным уровнем АЛТ (более 0,20 мккат/л) (табл. 1).

Таблица 1

Результаты ПЦР-анализа в зависимости от биохимической активности HCV-инфекции

Биохимическая активность	РНК+	РНК-
Вне активности (n=97)	64 (66%)	33 (34%)
Повышенная (n=373)	326 (87,4%)	47 (12,6%)
$\chi^2 = 25,01$; $p = 0,0001$		

В группе больных с повышенной биохимической активностью (АЛТ более 0,20 мккат/л) РНК HCV выявлялась достоверно чаще (по критерию χ^2 $p = 0,0001$), чем при нормальной активности. Однако повышенная биохимическая активность не всегда соответствует вирусологической репликации. Поэтому для более точной оценки активности процесса при HCV-инфекции необходимо использовать совместно определение АЛТ и ПЦР на обнаружение РНК HCV в сыворотке крови.

Сопоставлены результаты, полученные с помощью методов ИФА (анти-HCV tot) и ПЦР (РНК HCV) у 484 больных. Положительные результаты ПЦР и ИФА наблюдались в 396 случаях (81,8%), отрицательные результаты ПЦР и ИФА наблюдались в 2 случаях (0,4%). В 86 (17,8%) случаев результаты ПЦР и ИФА не совпадают.

Отрицательные результаты ПЦР и положительные результаты ИФА наблюдались в 83 случаях (17,2%). Такая картина характерна для ОВГС после прекращения вирусемии (8 случаев), после перенесенного ОВГС (1 случай), после успешной интерферонотерапии ХГС (18 случаев). В остальных 56 случаях из 83 (67,5%) такое сочетание отмечалось у больных латентными формами ХГС и у пациентов в стадии цир-

роза печени, когда репликация HCV невысока и концентрации РНК вируса в крови ниже порога определения ПЦР. При этом в 38 случаях отсутствие РНК HCV сочеталось с наличием повышенного уровня АЛТ. Повышение АЛТ, по нашему мнению, могло не являться следствием активации HCV, а возникать в результате потребления алкоголя, обострения сопутствующих хронических заболеваний (холецистит, панкреатит, и др.).

Положительные результаты ПЦР и отрицательные результаты ИФА встречались в 3 случаях (0,6%). Эти эпизоды расценивались как серонегативный период ОВГС (2 случая), а при ХГС (в 1 случае) также, возможно, говорит о слабом антителенном ответе вследствие иммунодефицита либо индивидуальных особенностей антителообразования.

Следует учитывать, что несоответствие результатов ИФА и ПЦР могут быть также следствием ложной негативности или ложной позитивности этих лабораторных тестов.

Известно, что обнаружение анти-HCV IgM, как и РНК HCV, свидетельствует об активной репликации вируса. Проведено сравнение частоты выявления РНК HCV в зависимости от наличия анти-HCV IgM у больных ХГС (табл. 2).

Таблица 2

Выявление РНК HCV в зависимости от наличия анти-HCV IgM

Выявление анти-HCV IgM	РНК+	РНК-
Анти-HCV IgM+ (n=14)	14 (100%)	0
Анти-HCV IgM- (n=21)	13 (62%)	8 (38%)
$p = 0,009$ (по точному критерию Фишера)		

В группе больных с выявленными анти-HCV IgM, РНК HCV выявлялась достоверно чаще ($p = 0,009$), чем при их от-

сутствии. Выявление анти-HCV IgM в 100% случаев соответствует вирусемии. В то же время анти-HCV IgM не выявлялись

при обнаружении РНК вируса в крови в 62% случаев, что отражает более высокую чувствительность метода ПЦР по сравнению с обнаружением а-НСВ IgM. В 8 случаях отсутствие анти-НСВ IgM наблюдалось при отсутствии РНК в крови, что говорит о ремиссии заболевания.

Оценена чувствительность теста на анти-НСВ IgM в сравнении с ПЦР. Истинно положительных результатов (ИП) — 14, ложно отрицательных (ЛО) — 13. По формуле [5] чувствительность теста = $(ИП/(ИП+ЛО)) \times 100\% = 51,9\%$. Специфичность теста на анти-НСВ IgM в сравнении с ПЦР также оценивалась по формуле [5]. Истинно отрицательных (ИО) результатов — 8, ложно положительных (ЛП) — 0. Специфичность теста = $(ИО/(ИО+ЛП)) \times 100\% = 100\%$. Таким образом, при отсутствии возможности выполнения ПЦР-анализа, определение антител к НСВ класса IgM может применяться для оценки повышенной репликативной активности НСВ.

Выводы:

1. У больных с повышенной биохимической активностью (АЛТ более 0,20 мккат/л) РНК НСВ выявлялась (87,4%) достоверно чаще, чем у больных с нормальными значениями АЛТ (до 0,20 мккат/л) (66,0%; $p = 0,0001$).

2. Результаты методов ИФА (анти-НСВ tot) и ПЦР (РНК НСВ) совпадают у 82,2% больных, в 17,8% случаев результаты ПЦР и ИФА не совпадают. Отсутствие РНК НСВ на фоне позитивного теста на анти-НСВ tot в 67,5% случаев наблюдается при текущей хронической НСВ-инфекции и зачастую сочетается с повышением АЛТ.

3. Тест на анти-НСВ IgM позволяет оценить вирусную репликацию НСВ. Обнаружено, что в группе больных с выявленными анти-НСВ IgM в 100% выявлялась РНК НСВ, что достоверно чаще ($p = 0,009$),

чем при отсутствии анти-НСВ IgM (62%).

4. Чувствительность теста на анти-НСВ IgM по сравнению с ПЦР составляет 51,9%, специфичность — 100%, что позволяет рекомендовать определение анти-НСВ IgM для оценки повышенной репликативной активности НСВ при невозможности определения РНК НСВ методом ПЦР.

5. Совместное использование методов ПЦР и ИФА позволяет усовершенствовать лабораторную диагностику НСВ-инфекции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Жаворонок, С. В. Система диагностики диффузных паренхиматозных поражений печени у различных групп населения с повышенным риском инфицирования вирусными гепатитами В, С, D, G: Метод. реком. / С. В. Жаворонок [и др.]. — Мн., 1998. — 52 с.
2. Соринсон, С. Н. Вирусные гепатиты / С. Н. Соринсон. — Спб.: ТЕЗА, 1998. — 325 с.
3. Балаян, М. С. Энциклопедический словарь — вирусные гепатиты. / М. С. Балаян, М. И. Михайлов. — Изд. 2-е, перераб. и дополн. — М.: Ампресс, 1999. — 304 с.
4. Шахгильдян, И. В. Парентеральные вирусные гепатиты (этиология, диагностика, профилактика) / И. В. Шахгильдян, М. И. Михайлов, Г. Г. Онищенко. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. — 384 с.
5. Залеских, Н. В. Система внешнего и внутреннего контроля качества в иммуноферментном анализе: Информ. материалы / Н. В. Залеских, М. Н. Кокорева, Т.В. Сивилева. — Н. Новгород: Диагностические системы, 2003. — 42 с.
6. Радченко, В. Г. Хронические заболевания печени (этиология, клиника, диагностика, лечение, эпидемиология и профилактика) / В. Г. Радченко, А. В. Шабров, В. В. Нечаев. — СПб.: Лань, 2000. — 192 с.
7. Является ли репликация вируса гепатита С маркером степени активности инфекционного процесса? По данным полимеразной цепной реакции и морфологического анализа биопсий печени / Г.И. Непомнящих [и др.] // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 2003. — Т. 135. № 3. — С. 343–348.

Поступила 4.12.2006

УДК 616.15:616.61-008.64]-053.2

ИНФОРМАЦИОННАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Л. Л. Миронов

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск

Острая почечная недостаточность (ОПН) вовлекает в патологический процесс многие органы и системы больного, нарушая многочисленные физиологические контакты организма. Это требует тщательного мониторинга системы гомеостаза для получения своевременной информации о неблагоприятных отклонениях в организме и принятия соответствующих мер по их устранению. Однако при этом число исследований крови у детей с