

Гудков В. Г., Карамышева Ю. С., Еремин В. Ф., Виринская А. С.

НАБОР СТАНДАРТНЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ HBs-АНТИГЕНА

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

Гепатит В является значимой социально-экономической проблемой во всем мире [1]. По данным ВОЗ в мире в среднем за год возникает более 5 миллионов новых случаев острого гепатита В [2-4]. Лабораторная диагностика этой инфекции включает ряд тестов, однако наиболее распространенным и эффективным является обнаружение методом иммуноферментного анализа (ИФА) HBs-антигена в крови. Очевидно, что эффективность исследований по выявлению HBs-антигена в большой степени зависит от качества используемых диагностических препаратов, прежде всего, уровня их специфичности и чувствительности [5, 6]. С целью контроля качества используемых диагностических наборов разработаны международный (МСО) и государственные (ГСО) стандарты (стандартные образцы), а также наборы (панели) контрольных образцов (НКО) HBs-антигена, которые используются в экономически развитых странах для оценки качества диагностических наборов и эффективности работы лабораторий.

Повышению эффективности и стандартизации массовых исследований по выявлению HBs-антигена в нашей республике, несомненно, будет способствовать разработка и повсеместное использование стандартных и контрольных образцов HBs-антигена.

Цель работы: разработка и организация производства ГСО HBs-антигена и НКО HBs-антигена.

В работе использовались следующие материалы:

- плазма крови человека, содержащая HBs-антиген в концентрации более 10 МЕ/мл, – в качестве источника HBs-антигена;
- плазма крови человека, содержащая мутантные формы HBs-антигена (P127T, A128V, M133T) – в качестве источника мутантных форм HBs-антигена;
- плазма крови человека, не содержащая HBs-антиген, – в качестве матрикса для разведения HBs-антигена;
- третий международный стандарт HBs-антигена с содержанием 47,3 МЕ во флаконе (Third International Standard for HBsAg (HBV genotype B4, subtypes ayw1/adw2) «NIBSC», United Kingdom, cod number 12/226- 47,3 IU/vial) – в качестве средства измерения содержания (концентрации) HBs-антигена;
- диагностические наборы для определения маркеров вирусных гепатитов В, С и ВИЧ-инфекции методом ИФА, зарегистрированные в Республике Беларусь;
- диагностические наборы для определения маркеров вирусных гепатитов В, С и ВИЧ-инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), зарегистрированные в Республике Беларусь.

Определение генотипа вируса гепатита В и мутантных форм HBs-антигена осуществлялось методом секвенирования.

Инактивация образцов плазмы крови, содержащих HBs-антиген, проводилась путем нагревания при температуре 103°C в течение 90 с с последующей процедурой пастеризации при температуре 65°C в течение 10 ч. Оценка полноты инактивации осуществлялась методом ПЦР в режиме реального времени согласно инструкции по применению наборов реагентов для ПЦР диагностики. Выделение ДНК проводилось из 1 мл растворенного (восстановленного) образца ГСО (при выделении из 100 мкл образца не гарантировано выявление ДНК вируса гепатита В в концентрации менее 50 МЕ/мл).

Все использованные образцы плазмы крови человека контролировались на отсутствие антител к HBs-антигену, ВИЧ-1, 2, вирусу гепатита С методом ИФА, а также РНК вируса гепатита С, ВИЧ-1, 2 и ДНК вируса гепатита В методом ПЦР.

Количественное содержание HBs-антигена в разрабатываемых образцах устанавливалось в серии сравнительных исследований с МСО HBs-антигена методом ИФА таким образом, чтобы калибровочные кривые значений оптической плотности ГСО HBs-антигена соответствовали таковым для МСО HBs-антигена. При построении калибровочных кривых использовались четыре разведения ГСО и МСО HBs-антигена в матриксе: 0,5 МЕ/мл, 0,25 МЕ/мл, 0,125 МЕ/мл, 0,0625 МЕ/мл.

Лиофилизация образцов проводилась в вакуум-сушильном аппарате, конструкция и режим работы которого обеспечивает получение препарата требуемого качества, после предварительного закаливания образцов в течение 18-24 ч при минус 50°C. Режим лиофилизации был подобран экспериментально.

Оценка результатов проводилась методом ИФА на тест-системах различных производителей.

ГСО HBs-антигена разрабатывался как национальный аналитический стандарт этого маркера, один экземпляр (флакон) которого содержит 1 МЕ HBs-антигена доминирующего в республике генотипа вируса.

В составе НКО HBs-антигена предусматривалось наличие как не содержащих HBs-антиген (отрицательных) образцов, так и последовательно разведенных в матриксе аналогов ГСО HBs-антигена (положительных образцов) с концентрациями 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,08 МЕ/мл), а также положительных образцов с мутантными формами HBs-антигена.

Необходимым этапом работы являлся подбор образцов плазмы крови, используемых в качестве источников HBs-антигена, в качестве матрикса для получения требуемых концентраций этого маркера и в качестве различных категорий отрицательных проб.

В результате тестирования был подобран матрикс для разведения HBs-антигена – пул образцов плазмы крови здоровых доноров, не содержащий HBs-антигена, антител к нему, ВИЧ-1, 2; вирусу гепатита С, РНК ВИЧ-1, 2, РНК вируса гепатита С и ДНК вируса гепатита В. Коэффициент подавления аналитического сигнала при определении в пуле внесенного HBs-антигена не превышал 3%.

Протестирован, определен и инактивирован источник HBs-антигена для изготовления ГСО – образец плазмы крови с высоким содержанием HBs-антигена доминирующего (82,6%) в республике генотипа D вируса [8] и не содержащей антител к HBs-антигену; вирусу гепатита С, РНК ВИЧ-1,2, РНК вируса гепатита С и ДНК вируса гепатита В.

В таблице приведены данные контроля полноты инактивации указанного образца плазмы крови.

Результаты контроля полноты инактивации вируса гепатита В

№ образца плазмы крови	Исследование до инактивации		Исследование после инактивации				
	ИФА	ПЦР	Кол-во	Прозрачность	Осадок	ИФА	ПЦР
2441346	3,2635	Полож.	10 мл	Прозрачная	Гелеобразный	6,24	Отриц.

Из приведенных в таблице данных видно, что использованный режим инактивации вируса гепатита В эффективен и может быть использован при производстве набора.

Количественная оценка содержания HBs-антигена проводилась методом ИФА путем ряда параллельных измерений экземпляров ГСО с экземпляром МСО с определением наличия линейности и параллельности. На основании полученных результатов строилось уравнение зависимости логарифмов ОП ср. от логарифмов соответствующих концентраций HBs-антигена.

При построении калибровочных кривых использовались четыре разведения ГСО и МСО в матриксе: 0,5 МЕ/мл, 0,25 МЕ/мл, 0,125 МЕ/мл, 0,0625 МЕ/мл. Определялась среднестатистическая кривая для образца ГСО и точная исходная концентрация HBs-антигена в ГСО. Как видно из приведенных на рисунке данных показана прямая линейная зависимость между логарифмами концентраций HBs-антигена и показателей ОП исследованных концентраций маркера, содержащегося в обоих образцах. Коэффициент вариации между показателями ОП соответствующих концентраций HBs-антигена в ГСО и МСО составляет не более 4,2%. В результате проведенных сравнительных исследований ГСО и МСО

установлено, что содержание HBs-антигена в экземпляре (флаконе) ГСО составляет 1 МЕ (величина расширенной неопределенности, рассчитанная в соответствии с действующим СТБ ISO [7] составляет $\pm 0,065$ МЕ/мл). НКО HBs-антигена разрабатывался с использованием полученного нами ГСО, а также предварительно протестированных и отобранных образцов плазмы крови, содержащих и не содержащих HBs-антиген. Результаты тестирования показали, что все образцы НКО соответствуют заявленным характеристикам.

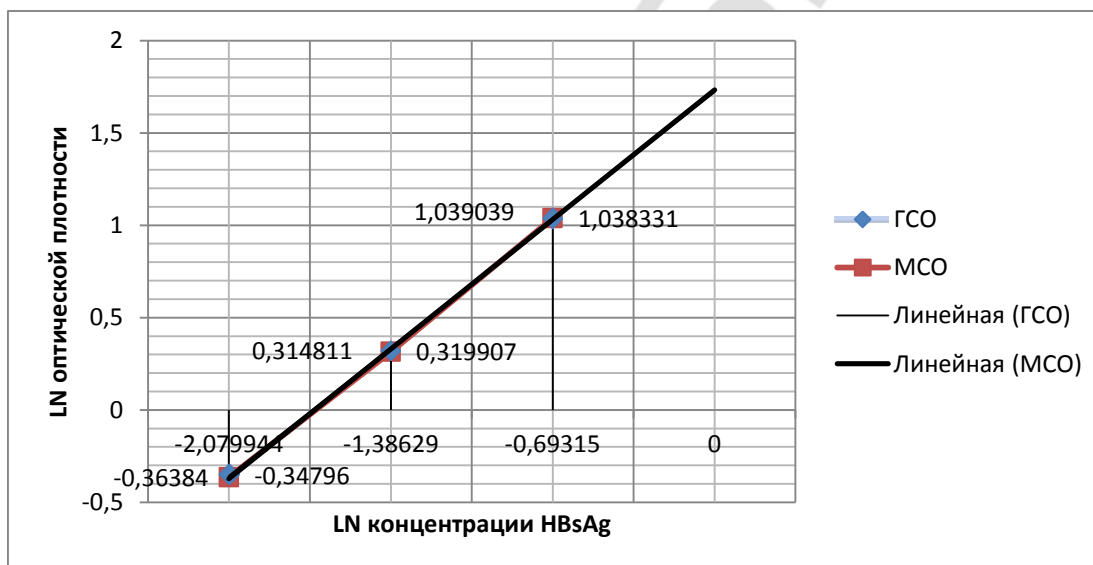


Рис. График зависимости логарифмов ОПср. от логарифмов соответствующих концентраций HBs-антигена (среднестатистическая кривая титрования)

Таким образом, разработан набор стандартных и контрольных образцов HBs-антигена, состоящий из двух видов наборов: государственного стандартного образца состава поверхностного антигена вируса гепатита В, генотип D, 1 МЕ во флаконе (ГСО HBs-антигена) и набора контрольных образцов поверхностного антигена вируса гепатита В (НКО HBs-антигена).

ГСО HBs-антигена предназначен для измерения содержания (специфической активности) HBs-антигена методом иммуноферментного анализа и использования в качестве сертифицированного контроля аналитической чувствительности диагностических наборов. Он представляет собой плазменный HBs-антиген, инактивированный и суспендированный в пуле нормальной плазмы крови человека (матриксе) с добавлением 0,05% мертиолята натрия в качестве консерванта.

При восстановлении лиофилизата ГСО HBs-антигена в 1,0 мл дистиллированной воды концентрация маркера составляет 1 МЕ HBs-антигена /мл. Количество исследований с использованием набора ГСО HBs-антигена зависит от используемых разведений.

НКО HBs-антигена предназначен для оценки чувствительности и специфичности диагностических наборов для определения HBs-антигена методом иммуноферментного анализа и контроля качества работы диагностических лабораторий.

НКО включает 3 группы контрольных образцов:
отрицательные образцы нескольких категорий (19 флаконов) – для оценки специфичности диагностических наборов.

положительные количественные образцы (6 флаконов) – для оценки чувствительности диагностических наборов. Они являются последовательно разведенными аналогами ГСО HBs-антигена с концентрациями 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,08 МЕ/мл.

положительные образцы, содержащие мутантные формы маркера (6 флаконов) – для оценки способности диагностических наборов выявлять наиболее распространенные мутантные варианты HB-антигена (P127T, A128V, M133T).

Область применения набора: лабораторная диагностика вирусного гепатита В.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Амосов, А. Д.* Гепатит В / А. Д. Амосов. Новосибирск, 2006. 132 с.
2. *CE Marked Material British Working Standard for HBsAg 0.2 IU/ml.* NIBSC code: 07/288 : instructions for use. Version 1.0. Dated 27.05.2008.
3. *Preparation of the national referens panel for hepatitis B surface antigen / X. Wu [et al.] // Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2008. Vol. 22, N 4. P. 311-313.
4. *WHO International Standard. Third International Standard for HBsAg (HBV genotype B4, subtypes ayw1/adw2) 47,3 IU/vial, «NIBSC», United Kingdom, cod number 12/226: instructions for use.* Version 2.0. Dated 26.02.2008.
5. *Бангхем, Д. Р.* Стандартные препараты и эффекты матрикса / Д. Р. Бангхем // Новые методы иммуноанализа / М. Тертон [и др.]. М., 1991. С. 25-36.
6. *Оценка чувствительности коммерческих тест-систем для иммунодетекции HBsAg по их способности выявлять HBsAg-мутанты вируса гепатита В / А. И. Баженов [и др.] // Журн. микробиол.* 2008. № 3. С. 48-53.
7. *Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации: СТБ ИСО* Руководство 35-2007.
8. *HBV and HCV genotypes distribution on the territory of Belarus / E. L. Gasich [et al.] // Abstr. 17th Int. Symp. HIV and Emerg. Infect. Dis. (ISHEID), Marseille, France. May 23-25, 2012. Retrovirology.* 2012. Vol. 9, suppl. 1. P. 57.