

Преимущества метода ПЦР в сравнении с обнаружением антител к вирусу гепатита С при лабораторной диагностике вирусного гепатита С

3-я кафедра внутренних болезней БГМУ, кафедра инфекционных болезней ГГМУ

Среди лабораторных методов диагностики вирусной инфекции в практической ревматологии наибольшее распространение получили серологические тесты, позволяющие выявить в сыворотке крови повышенный уровень специфических антител и, что более важно, нарастание их титра в динамике.

На сегодняшний день широко используемым методом этиологической диагностики вируса гепатита С является обнаружение антител к вирусу (anti-HCV) методом иммуноферментного анализа (пФА) [1, 2]. Все использующиеся в настоящее время тест-системы изготовлены на основе рекомбинантных или синтетических полипептидов, несущих антигенные детерминанты белка нуклеокапсида (С-ген), и/или неструктурных белков NS3, NS4 [3], (таблица 1).

Таблица 1. Диагностические пФА-системы для выявления антител к ВГС

Тест-система	Шифр фрагментов	Белок, содержащий данный фрагмент
1 поколение	с 100-3, 5-1-1	NS4
2 поколение	с 100-3, с 22-3, с 33 с	NS4, кор, NS3
3 поколение	с 100-3, с 22-3, с 33 с, NS5	NS4, кор, NS3, NS5
4 поколение	с 100-3, с 22-3, с 33 с, NS5, e1, e2	NS4, кор, NS3, NS5, E1, E2

Однако в некоторых случаях антитела к вирусу могут не обнаруживаться, например, при запаздывании иммунного ответа и при применении иммуносупрессивной терапии. Кроме того, возможны ложноположительные результаты. Для их исключения сомнительные сыворотки анализируют в реакции иммуноблоттинга (Рп-БА) или проводят определение ПЦР на наличие РНК HCV [4].

Наличие anti-HCV не позволяет дифференцировать настоящую инфекцию от предыдущей. Часто определяются общие антитела к HCV, по которым нельзя сказать острый или хронический гепатит мы наблюдаем в настоящее время. В латентную фазу и фазу клинической активности спектр антител идентичен. Антитела к структурному антигену Anti-core-IgM наиболее информативны и служат критерием инфекционности носителя. Титр их максимален в острую фазу и в период реактивации инфекции. Антитела к неструктурным белкам, например HCV NS-4, нарастают постепенно от момента заражения к моменту реактивации гепатита С. В дебюте заболевания антител к этим белкам нет.

Преодолеть существующие диагностические трудности позволяют методы молекулярной биологии для выявления нуклеиновых кислот вирусов, которые наиболее адекватно отражают активность вирусной репликации. Все генотипы ВГС имеют консервативный участок РНК в 5'-нетранслируемой области. Для этого участка разработаны специфические праймеры, что позволяет выявлять РНК ВГС различных генотипов с помощью ПЦР.

ПЦР-диагностика ХГС очень чувствительна – до 50 МЕ в мл плазмы крови, однако определение РНК ВГС методом ПЦР не должно использоваться в качестве

единственного теста для постановки диагноза. Тем не менее этот анализ достаточно информативен для подтверждения диагноза при сомнительных данных иммунологических тестов, при контроле эффективности специфической противовирусной терапии. Существует определенная динамика антител, отраженная в таблице 2, позволяющая определить стадию HCV-инфекции.

В 1983 году исследователь из Cetus Corporation (США) К. Mullis открыл принцип *in vitro*-амплификации специфических нуклеотидных последовательностей при помощи реакции, названной им полимеразной цепной (ПЦР), за что в 1993 году был удостоен Нобелевской премии. С 1984 года используется метод ПЦР, позволяющий за несколько часов получить миллионы копий фрагмента. Этот метод обеспечил достижение больших успехов в области генетического картирования, изучении генетического полиморфизма, обнаружении мутаций, в молекулярной вирусологии, в изучении генетических механизмов молекулярной иммунологии, диагностике инфекционных и наследственных заболеваний, судебной медицине [5].

Таблица 2. Клиническая интерпретация серологических данных при HCV-инфекции

Клиническая интерпретация	Анти-HCV	РНК-HCV
Ранний период ОГС	–	+
ОГС, ХГС с активной репликацией вируса	+	+
Стадия реконвалесценции ОГС и серологический статус после выздоровления	+	–

Принцип метода основан на обнаружении в исследуемом материале специфичных фрагментов ДНК (РНК) различных биологических объектов, их избирательном синтезе и дальнейшей детекции продуктов реакции амплификации. Для ПЦР характерны такие уникальные свойства, как высокая специфичность, чувствительность, универсальность и короткое время исследования. Для амплификации специфического ДНК-фрагмента методом ПЦР не нужно знать последовательность нуклеотидов этого фрагмента, а достаточно знать нуклеотидную последовательность двух коротких участков, окаймляющих фрагмент-мишень. Это необходимо для синтеза двух олигонуклеотидных праймеров – затравок ДНК-полимеразы. Длина праймеров и их последовательность должны быть уникальны и не встречаться в других участках ДНК, присутствующих в реакционной смеси. В качестве праймеров используются гексамеры, олиго-dt-праймеры или праймеры, комплементарные интересующему участку искомого генетического фрагмента.

Методика ПЦР-анализа биологических образцов состоит из нескольких этапов [6]:

- 1) выделение нуклеиновой кислоты из пробы;
- 2) реакция обратной транскрипции для РНК-ВГС;
- 3) собственно ПЦР-реакция и детекция ее продуктов.

В настоящее время для выделения нуклеиновой кислоты применяют метод сорбции на частицы силикагеля после денатурации образца гуанидинизотиоцианатом. Для проведения реакции обратной транскрипции часто используют рекомбинантную модифицированную РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса лейкемии мышей, очищенную до электрофоретической гомогенности методом металл-хелатной хроматографии, в буфере для хранения. Оптимальный

температурный режим работы фермента 37° С – 45° С. После осуществления обратной транскрипции ПЦР проводится по обычной схеме.

исследователи из Roche Molecular Systems (США) разработали комбинированный метод РНК-ПЦР с использованием фермента Tth-полимеразы (выделенного из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*), который, наряду с полимеразной активностью, обладает менее выраженной ревертазной активностью, что позволяет проводить реакцию обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке с участием одного фермента. Однако, в данном случае чувствительность анализа может быть ниже, чем при использовании традиционных ферментов [7].

Наряду с общепринятой одностадийной ПЦР, применяется ряд ее модификаций, например Touchdown ПЦР, направленных на повышение чувствительности реакции. Так широко используется двухстадийная ПЦР с внутренней парой праймеров (nested-PCR), что резко увеличивает чувствительность реакции. Hot-старт ПЦР, технологическая или химическая модификация, позволяющая избежать во время подготовки ПЦР-образца (до начала стадии денатурации) образования неспецифичных димеров праймер-матрицы и их амплификация.

На сегодняшний день наиболее совершенным методом ПЦР-диагностики является REAL-TIME ПЦР, исключающая контаминацию образцов и дающую заключение о наличии и количестве РНК ВГС через 5-7 дней после предполагаемого инфицирования и генотип вируса с вирусной нагрузкой за одно исследование [8].

Основным достоинством метода ПЦР является чрезвычайно высокая чувствительность анализа – до 1 копии геномной ДНК возбудителя инфекции в исследуемой пробе в nested-варианте ПЦР (с внутренней и внешней парами олигонуклеотидов-праймеров).

Возможности, заложенные в методе ПЦР, позволяют, с одной стороны, достигать максимальной специфичности анализа, т. е. отсутствия перекрестных реакций и способности выявлять ДНК конкретного инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и ДНК организма-хозяина, а также проводить генотипирование. С другой стороны, соответствующий выбор олигонуклеотидов-праймеров, в основном определяющих специфичность анализа, позволяет одновременно выявлять ДНК близкородственных микроорганизмов.

Другим достоинством метода является то, что для ПЦР-диагностики практически всех инфекционных заболеваний может быть использован один набор оборудования, универсальные процедуры подготовки пробы и постановки анализа, а также незначительно отличающиеся наборы реактивов [9].

В целом последовательность применения тест-систем для идентификации вируса гепатита С приведена в таблице 3.

Таблица 3. Последовательность использования тест-систем при верификации HCV-инфекции

Тест-система	Показания к применению
ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	Назначается при подозрении на HCV-инфекцию. При отрицательном результате HCV сомнителен. При положительном - проводится RIBA или сразу RT/PCR.
RT/PCR (reverse transcriptase/po-	Положительные значения подтверждают гепатит С.

polymerase chain reaction)	<p>При отрицательном результате повторно тестируют 3 раза в течении 6 – 12 месяцев.</p> <p>При сохранении отрицательных результатов исключают HCV-инфекцию.</p>
----------------------------	---

Вместе с тем рекомбинации РНК и изменение нуклеотидной последовательности могут происходить даже у одного пациента и с этим связаны трудности диагностики ХГС [10, 11]. Остается актуальным вопрос о применении различных методов верификации вирусоносительства, в том числе с использованием аппаратуры, основанной на измерении электрофизиологических свойств крови, а также необходимость идентификации вируса гепатита С в различных биологических средах, в том числе в ткани печени.

Методика ПЦР-анализа биологических образцов

Вирусную РНК в сыворотке крови больных ХГС определяли с помощью ПЦР, («Hoffman-la-Roche» и «Ампли Сенс»). Выделение вирусной РНК осуществляли методом адсорбции ее на частицы селикагеля после денатурации образца гуанидин тиоционатом [12].

Для детекции наличия в биологическом материале ВГС использовали мутационно устойчивые праймеры на высококонсервативные области генома (5'-нетранслируемую область). В работе частично проводилось генотипирование ВГС посредством использования типоспецифических праймеров.

Продукт амплификации выявляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле. Для электрофореза использовали горизонтальную камеру, стандартный трис-боратный буферный раствор. Нуклеиновые кислоты окрашивали бромистым этидием. Гели просматривали в УФ-трансиллюминаторе с длиной волны 265 нм. В пробах, содержащих РНК-ВГС, в геле обнаруживали специфические полосы, соответствующие амплифицированным фрагментам ДНК размером 260 пар нуклеотидов. В отрицательных пробах специфические полосы не выявляли.

Выделение РНК-ВГС в парафиновых срезах проводили после полного цикла депарафинизации морфологических образцов для исключения ингибирующего влияния на ферменты остатков парафина.

Литература

1. Применение иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции для диагностики гепатит С- вирусной (HCV-) инфекции / В. М. Мицура [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. 2006. № 4. С. 131–134.
2. The accuracy of SM-HCV rapid test for the detection of antibody to hepatitis C virus / M. Yuen [et al.] // Am. J. Gastroenterol. 2001. Vol. 96, № 3. P. 838–841.
3. Носик, Н. Н. Лабораторная диагностика вирусных инфекций / Н. Н. Носик, В. М. Стаханова // Клинич. микробиология и антимикроб. Химиотерапия. 2000. № 2. С. 70–78.
4. Anti-ribosomal P protein antibodies detected by immunoblotting in patients with connective tissue diseases: their specificity for SLE and association with IgG anticardiolipin antibodies / A. Ghirardello [et al.] // Ann. Rheum. Dis. 2000. Vol. 59, № 12. P. 975–981.
5. Goobar-Larsson, L. Intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA-polymerase activity / L. Goobar-Larsson, L. Wicklund, S. Schwartz // Arch. Virol. 2001. Vol. 146, № 8. P. 1553–1570.

6. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения / сост. В. В. Покровский [и др.]. М., 1995. 20 с.

7. Cuchacovich, R. Applications of polymerase chain reaction in rheumatology / R. Cuchacovich, S. Quinet, A Santos // *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 2003. Vol. 29, № 1. P. 1–20.

8. Голобородько, Н. В. Количественное определение РНК ВГС и ДНК ВГВ методом REAL-TIME ПЦР в плазме крови различных контингентов пациентов / Н. В. Голобородько [и др.] // *Медико-социальные аспекты ВПЧ-инфекции, парентеральных вирусных гепатитов и инфекций, передаваемых половым путем: материалы науч.-практ. конф.* Минск, 2006. С. 116–118.

9. Отчет о лабораторно-экспериментальном изучении тест-системы для выявления РНК вируса гепатита С методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции / Министерство здравоохранения РФ. М., 1999. 10 с.

10. Dynamic changes in HCV genotypes and sequence patterns in plasma donors exposed to reinfection / S. Zhang [et al.] // *J. Med. Virol.* 2001. Vol. 63, № 3. P. 228–236.

11. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature / C. Colin [et al.] // *J. Viral. Hepat.* 2001. Vol. 8, № 2. P. 87–95.

12. Detection of HCV-RNA in paraffin-embedded liver biopsies from patients with autoimmune hepatitis / K. Savage [et al.] // *J. Hepatol.* 1995. Vol. 22, № 1. P. 27–34