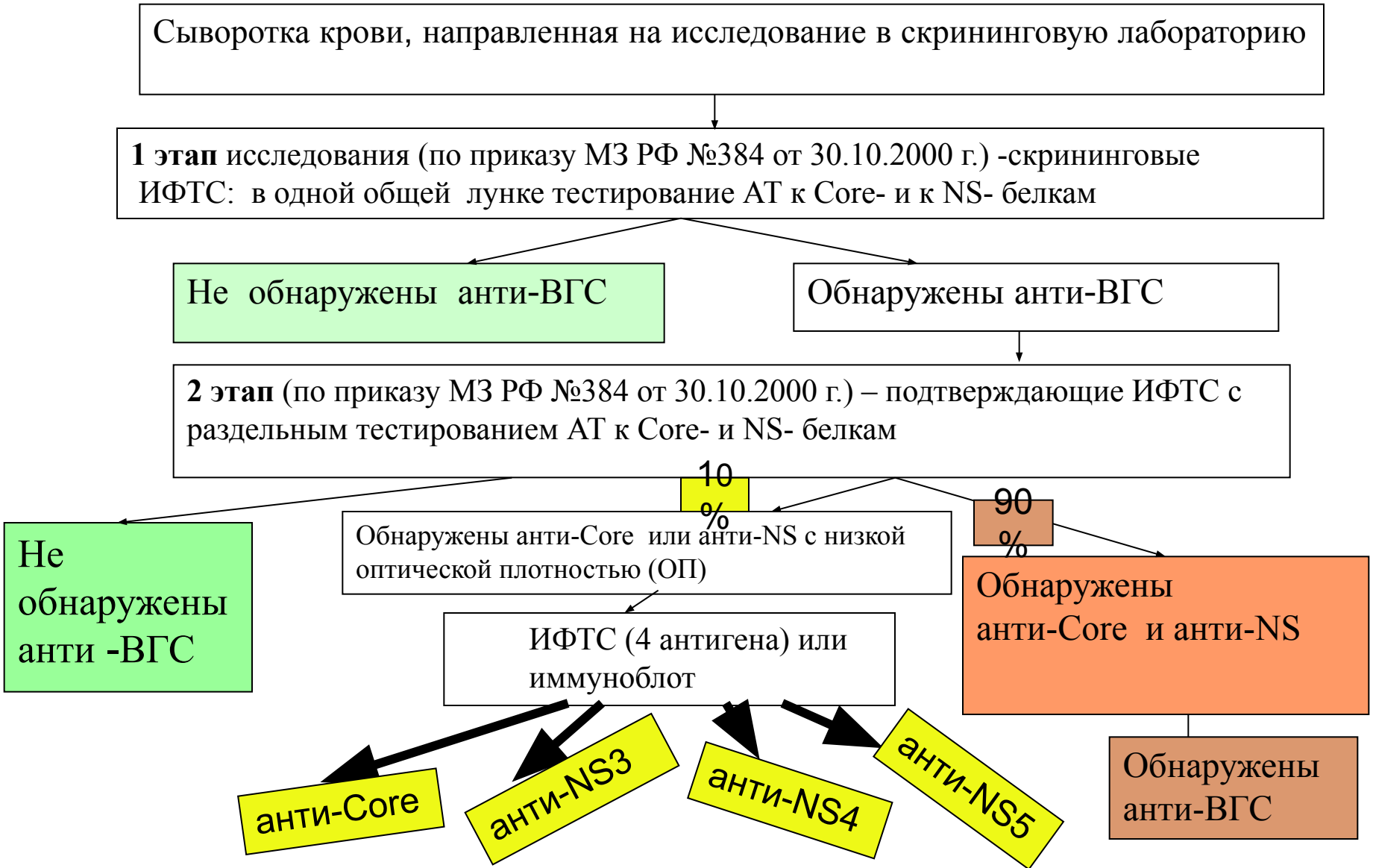
Расширение возможностей серологической диагностики инфекции, вызываемой вирусом гепатита С, с помощью иммуночипов.

А.А. Потапова, В.М. Дронова, [1]Т.А. Чеканова, [1]Г.А.Шипулин, [1]М. Л. Маркелов, [1]Е.А. Пудова, Е.А., [1]Н.П. Кирдяшкина, [2]Т.А. Туполева, [2]Ф.П. Филатов, [2]Д.С.Тихомиров, [2]Е.Н. Овчинникова, Н. Н. Потекаев

Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г.Москвы,
[1]ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,
[2]Гематологический научный цент РАМН, Москва

Рис. 1. Алгоритм исследования сыворотки крови на наличие антител к вирусу гепатита С в скрининговой лаборатории по приказу МЗ РФ



Слайд 3.

- Целью представленной работы было изучение верификационных возможностей иммуночипов при серодиагностике вирусного гепатита С в случаях выявления в иммуноферментных тест-системах с низкой позитивной оптической плотностью антител, направленных только к одному из антигенов ВГС.

Слайд 4.

Согласно ранее разработанному алгоритму*,

пробы сыворотки крови, в которых

- В первичном скрининге коэффициент позитивности** (КП) < 3,13, округленно 3 (практически совпадает с критерием российских и американских исследователей: соответственно КП <3 и < 2,7).
- В подтверждающем исследовании
- КП по АТ к Core–АГ < 2,74 (округленно 3)
- КП по АТ к NS-АГ < 6,23 (округленно 6), т.е. с КП в 2 раза больше, чем в выборе по результатам скрининга

(далее – т.н. низкопозитивные образцы)

необходимо дополнительно исследовать

в ИФТС с расширенным спектром определяемых антител к ВГС (анти-Core, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5),

в иммуноблотах «РекомБлот» (Германия, «Микроген») и «INNO-LIA HCV Ab III update» «Innogenetics», Бельгия)

*Потапова А. А., Редченко Е. Б., Науменко В.А. //«Мир вирусных гепатитов», 2008, №4, С.8-12

** коэффициент позитивности КП=ОП пробы/ОП критическая (Cut off)

Слайд 5.

По результатам исследования были выделены следующие группы образцов:

Четыре группы низкопозитивных образцов:

- **1) 16 образцов с антителами к Core АГ ВГС** (в первичной ИФТС КП=2,62 ±0,81), а в подтверждающих ИФТС обнаруживалась реактивность только к Core-антигену ($КП_{ИФА}$ =1,95±0,876);
- **2) 22 образца с антителами к NS3** (в первичной ИФТС КП анти-ВГС =2,42 ±0,66; в ИФТС с раздельным выявлением антител к 4-м антигенам ВГС КП анти- NS3 = 4,79±4,05);
- **3) 31 образец с антителами к NS4** (в первичной ИФТС КП анти-ВГС в группе составлял 3,04 ±1,89; в ИФТС с раздельным выявлением антител к 4-м антигенам ВГС КП анти- NS4 был равен 2,98±1,72);
- **4) 2 образца с с антителами к NS5** (средний КП=2,81)

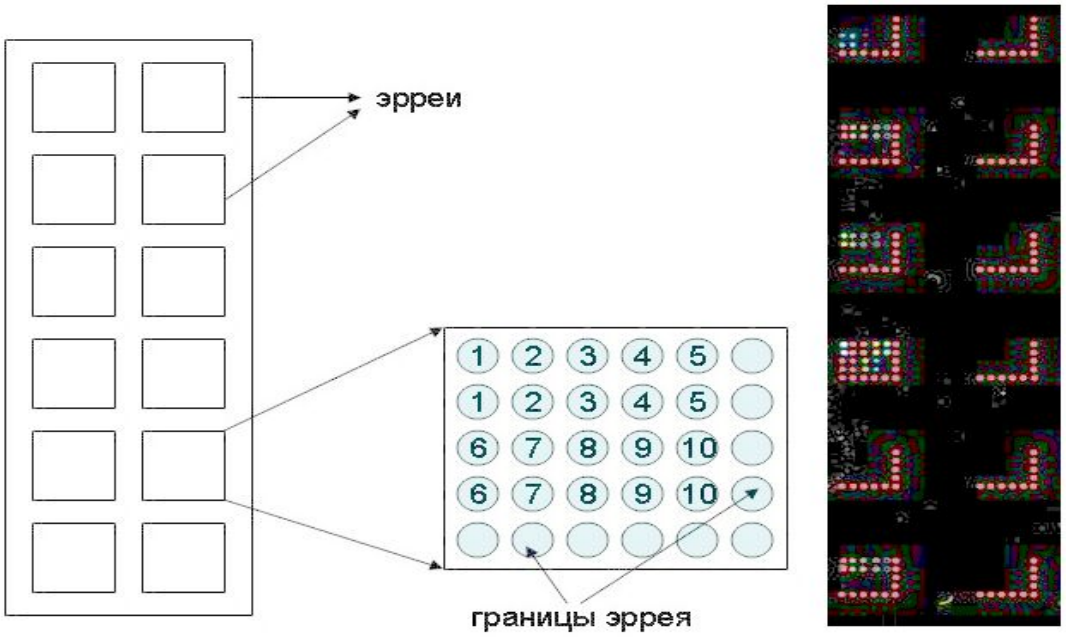
2 контрольные группы:

- **5) 9 образцов с высоким КП** в скрининге и в подтверждающих тест-системах с раздельным определением антител к Core АГ и антител к комплексу неструктурных антигенов ВГС;
- **6) 60 образцов с отрицательным результатом** тестирования антител к ВГС в ИФА.

Слайд 6.

Образцы 6 групп были протестированы в иммуночипах производства ЦНИИ эпидемиологии с раздельно иммобилизованными антигенами (Core-1b, Core-3a, NS3-1b, NS3-3a, c100p, m-51-1b, m-51-3a, NS5-1b, NS5-3a) и раздельным выявлением антител классов M и G.

Рис.2. **Схема иммуносорбента иммуночипа и пример его флуоресцентного изображения на кан**



Споты содержат соответственно антиген:

1 – NS3-3a, 2 – NS3-1b, 3 – c-100, 4 – m-5-1-3a, 5 – m-5-1-1b,

6 – NS5-3a, 7 – NS5-1b, 8 – Core-3a, 9 – Core-1b,

10 – сорбционный буфер, не содержащий антигены ВГС. Границы эррея – споты, содержащие бычий сывороточный альбумин, меченный флуорофорами Cy5 и Cy3.

Слайд 7.

Табл.1. Результат исследования в иммуночипах с раздельным выявлением IgG и IgM образцов сыворотки крови с низким коэффициентом позитивности анти-Core ВГС в иммуноферментных тест-системах планшетного формата (указаны антигены, к которым реактивна сыворотка крови).

№п/п	ИФТС (Core)	В ИБ	ИЧ: IgG	ИЧ: IgM
1	+	– (Core, слабая реакт-сть)	+ Core-3a, Core-1b, NS3-1b, m5-1-1- 1b	–
2	+	– (Core, слабая реакт-сть)	+ NS3-3a, NS5-3a, NS5-1b	–
3	+	– (Core, слабая реакт-сть)	+/– NS3-3a	+/– NS5-1b
4	+	– (Core, слабая реакт-сть)	+ Core-3a, Core-1b, NS3-3a, NS3-1b, m5-1-1- 3a, m5-1-1 -1b, NS5-1b	–
5	+	– (Core, слабая реакт-сть)	+/– m5-1-1- 1b	–
6	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+/– Core-3a, Core-1b	–
7	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, Core-1b, c-100, m5-1-1- 1b	+/– NS5-1b
8	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, Core-1b, NS3-1b, m5-1-1- 1b	+/– Core-3a, Core-1b
9	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, NS3-1b	+/– Core-3a, Core-1b
10	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ NS3-3a, NS3-1b, m5-1-1- 3a, m5-1-1 -1b	+/– NS3-1b
11	+	+ (C1, C2)	+ Core-3a , Core-1b, NS3-3a, NS3-1b, m5-1-1- 3a	–
12	+	+ (Core, NS3, NS4, геликаза)	+ Core-3a, Core-1b, NS3-1b, c-100, m5-1-1 1b, NS5-1b	+/– Core-3a, *Core-1b
13	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, Core-3b, NS3-3a, NS3-1b, m5-1-1- 3a, m5-1-1- 1b, NS5-1a, NS5-1b	–
14	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, Core-3b, NS3-1b, c-100, m5-1-1- 3a, m5-1-1-1b	+ NS3-1b, m5-1-1b
15	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, Core-1b, NS3-1b, c-100, m5-1-1- 1b	–
16	+	+/– (Core, средняя реакт-сть)	+ Core-3a, NS3-3a, NS3-1b, m5-1-1-1b	+/– m5-1-1 3a

Слайд 9. **Табл.2. Сводная таблица результатов исследований образцов с низкой позитивной оптической плотностью антител к NS3 протеину ВГС в ИФА, иммуноблотах и иммуночипах**

(результат: «+» позитивный, «–» негативнный, «+/–» неопределенный; «ни» – образец в ИБ не исследован).

№п/п	ИФТС (NS3)	Результат в ИБ	Результат в ИЧ: IgG	Результат в ИЧ: IgM
1	+/–	–	+/– Core	–
2	+/–	–	+ NS3, NS5, m5-1-1	–
3	+/–	–	+/– m5-1-1	+ Core, NS 3
4	+/–	+/– NS3, геликаза	+ NS3, m5-1-1, NS5, Core	+/– NS 5
5	+/–	+/–NS3, геликаза	+ NS3, m5-1-1, NS5, Core	–
6	+/–	– геликаза	+ NS3, m5-1-1-1b, NS5, Core	+ NS3-3a, m5-1-1, NS5
7	+/–	ни	+ NS3, m5-1-1	–
8	+/–	ни	+ NS3, m5-1-1	+/– NS5
9	+/–	– геликаза	+/– NS3	+ NS3, m5-1-1, NS5
10	+/–	+ NS3, геликаза, NS4	+ NS3, c100, m5-1-1, Core	+/– NS5
11	+/–	+/– NS3	+ NS3, m5-1- 1, Core	+/– NS5
12	+/–	ни	+ NS3, NS5, Core	+ NS3, m5-1-1, NS5
13	+/–	ни	+ NS3, m5-1-1, Core	–
14	+/–	ни	+ NS3, m5-1- 1, NS5, Core	+/– NS3
15	+/–	ни	+ NS3, c-100, m5-1- 1, NS5, Core	+ NS3, m5-1-1,NS5, Core
16	+/–	ни	+ NS3, m5-1-1	–
17	+/–	+/– NS3, геликаза	+/– NS3	–
18	+/–	+/– E2 (LIA)	+ NS3, m5-1- 1, NS5	–
19	+/–	+/– NS3	+ NS3, m5-1-1, Core	–
20	+/–	+ C1, C2, NS3 (LIA)	+ NS3, m5-1- 1, Core	–
21	+/–	ни	+ NS3, c-100, m5-1- 1, NS5, Core	+/– NS3
22	+/–	ни	+ NS3, Core	–

Слайд 10.

Результат исследования образцов с антителами к NS3 в иммуночипах:

Из **22 проб**, в которых в ИФТС обнаруживались только анти-NS3 (результат исследования в ИФА был неопределенным),

в иммуночипах **18 проб** были признаны анти-ВГС **позитивными по наличию IgG.**

Пять проб из 22 содержали **анти-ВГС класса М**.

Слайд 11.

Табл.3. **Результат исследования в иммуночипах образцов сыворотки крови, в которых в иммуноферментных тест-системах планшетного формата выявлялись только анти-NS4 ВГС**

(* - образцы в ИФТС анти-ВГС-отрицательные).

№п/п	ИФА	ИБ	ИЧ: IgG	ИЧ: IgM
1	+/–	–	+ NS3, c-100, m5-1-1, Core	–
2	+/–	– NS-5-12	+ NS3-3b, c-100, Core	+/– c-100
3	+/–	–NS-5-12	+ NS3, c-100, m5-1-1, Core	–
4	+/–	–NS-5-12	+ NS3, m5-1-1, NS5, Core	+/– Core
5*	–	+/–NS4 (1+)	+ c-100, Core	–
6*	–	+/–NS4 (2+)	+ c-100, m5-1-1, Core	–
7	+/–	+/–NS4 (2+)	+ NS3, c-100, m5-1-1, Core	–
8	+/–	+/–NS4 (2+)	+ NS3, c-100, m5-1-1	–
9	+/–	НИ	+ NS3,c-100	–
10	+/–	НИ	+ NS3, c-100, m5-1-1	–
11	+/–	НИ	+ NS3, c-100	–
12	+/–	НИ	+ NS3, c-100	–
13	+/–	НИ	+ NS3, c-100, m5-1-1	–
14	+/–	НИ	+ NS3, c-100, m5-1-1	–
15	+/–	НИ	+ NS3, c-100	–
16	+/–	НИ	+ NS3, c-100, m5-1-1, NS5, Core	–

Слайд 12.

Продолжение таблицы 3 (в ИФТС - только анти-NS4 ВГС).

№п/п	ИФА	ИБ	ИЧ: IgG	ИЧ: IgM
17	+/–	НИ	+ NS3, c-100	–
18	+/–	НИ	+/– c-100, m5-1-1	–
19	+/–	НИ	+ c-100, Core	–
20	+/–	НИ	+ NS3, c-100	–
21	+/–	НИ	+/– c-100	–
22	+/–	+/– NS4	+ NS3, c-100, NS5	–
23	+/–	+/– NS4	+/– c-100	+/–m5-1-1
24	+/–	+/– NS4	+ NS3, c-100, Core	–
25	+/–	+/– NS4	+ c-100, m5-1-1, NS5,Core	–
26	+/–	+/– NS4	+ c-100, m5-1-1, Core	–
27	+/–	+/– NS4	+ NS3, c-100,Core	–
28	+/–	+/– NS4	+/– c-100	–
29	+/–	+/– NS3, геликаза	+/– c-100	–
30	+/–	+/– NS3, NS4	+ NS3, c-100, m5-1-1, Core	+ NS3, c-100, m5-1-1, NS5
31	+/–	+/– NS3, геликаза	+ NS3, c-100, Core	+ NS3, m5-1-1, NS5

Слайд 13.

Результат исследования образцов с низкой позитивной оптической плотностью антител к NS4 в иммуночипах:

- Из 31 пробы, в которых в ИФТС обнаруживались только анти-NS4 (результат исследования неопределенный), в иммуночипах результат исследования на наличие анти-ВГС **класса G 26** образцов был **позитивным** вследствие обнаружения антител к антигенам нескольких белков ВГС, а **пяти** образцов **неопределенным** вследствие обнаружения реактивности только к антигенам белка NS4.

  В иммуночипах **две** пробы были признаны анти-ВГС позитивными по наличию **IgM.**

- Образцы 5 и 6 были отрицательными в ИФТС, однако, по сообщению врачей-инфекционистов, данные пациенты ранее были поставлены на учет как больные хроническим гепатитом С. При исследовании в ИБ результат был неопределенным, в иммуночипах – положительным.

Слайд 14.

Табл.4. **Результат исследования в иммуночипах образцов, в которых в иммуноферментных тест-системах планшетного формата выявлялись только анти-NS5 ВГС**

№п/п	**ИФА**	**ИБ**	**ИЧ: IgG**	**ИЧ: IgM**
1*	+/–	Отриц.	Отриц.	Отриц.
2	+/–	Отриц. (в ИБ Рекомблот обнаружен НС5-12, 2 балла)	+ NS5-1b, Core-3a, Core-1b	Отриц.

*Одна из двух проб была отрицательной и по IgG, IgM.

Слайд 15.

Общий результат исследования

В контрольных группах:

В отрицательных в ИФА образцах (кроме № 5 и 6, дополнительно исследованных по клиническим показаниям) анти-ВГС в иммуночипах не обнаружены.

Во всех анти-ВГС-позитивных в ИФА образцах (с выявлением анти- Core и комплекса анти- NS) наличие антител к ВГС подтверждено в иммуночипах.

Слайд 16. Сравнение результатов исследования образцов опытных групп в ИФА и в иммуночипах

Антитела к ВГС с низким КП	Результаты в ИФА	Результаты определения анти-ВГС класса G в иммуночипе		Сравнение с ИФА по позитивным результатам определения IgG	% позитивных результатов тестирования анти-ВГС класса M в иммуночипе
Анти-Core	100% - позитив.	19% - неопр.	81% - позитивные	↓	**6%**
Анти-NS3	100% - неопр.	19% - неопр.	81% - позитивные	↑	**22%**
Анти-NS4	100% - неопр.	16% - неопр.	84% - позитивные	↑	**6%**

Слайд 17. **Сравнение частоты позитивных результатов в иммуноблотах и в иммуночипах**

Антитела к ВГС с низким КП в ИФА (количество проб)	% позитивных результатов в ИБ	% позитивных результатов в иммуночипах	Достоверность различий
Анти-Core (16)	**12%**	**81%**	P<0,001
Анти-NS3 (13)	**15%**	**70%**	P<0,005
Анти-NS4 (17)	**0%**	**88%**	P<0,001

Слайд 18.

Табл. 5. **Выявление анти-ВГС в иммуночипах в сыворотке крови пациентов с различным анамнезом.**

Л. − пациент, у которого в течение 5 лет в ИФА результат неопределенный вследствие наличия только анти-NS4;
К. − пациентка, у которой в течение 5 лет периодически в ИФА обнаруживались анти-Core.

Антитела класса G										
Пациент, результат в ИФА	**NS3 3a**	**NS3 1b**	**c-100**	**m5-1-1 3a**	**m5-1-1 1b**	**NS5 3a**	**NS5 1b**	**Core 3a**	**Core 1b**	**Результат**
Ю. ИФА +/−	0.9	3.5	41.3	0.2	0.2	1.5	2.7	0.5	0.2	Положит.
К. ИФА и +, и −	2.8	7.2	5.1	0.2	10.4	2.1	2.4	0.9	2.9	Положит.
Антитела класса M										
Ю.	0.2	0.5	0.8	0.4	0.3	0.1	0.4	0.5	0.7	Отрицат.
К.	0.2	0.2	0.6	0.3	0.4	0.3	0.2	0.5	0.7	Отрицат.

Слайд 19.

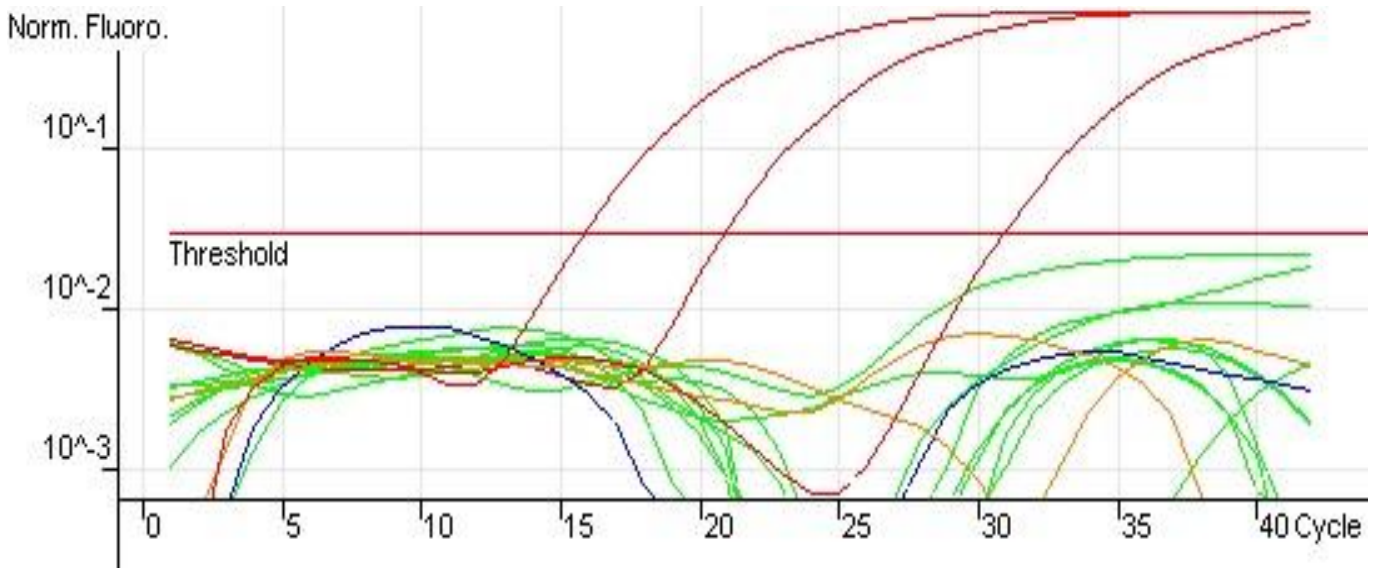
Вывод: В проведенном исследовании продемонстрирована высокая эффективность иммуночипов для верификации наличия антител к ВГС в образцах с неопределенным результатом исследования в ИФА и ИБ, что обусловлено:

- высокой чувствительностью иммуночипов (не меньшей, чем у планшетных ИФТС);
- расширением спектра выявляемых антител к ВГС по сравнению с иммуноблотом и ИФА;
- возможностью раздельного выявления в одной постановке IgG и IgM (показателей активной стадии инфекционного процесса).

- Для полного комплексного исследования необходимо небольшое количество материала (не более 30 мкл на весь анализ).

Рис. 3. Результаты выявления РНК ВГС в образцах, содержащих анти-ВГС класса М.

Использовали коммерческий набор производства ЦНИИЭ: *АмплиСенс HCV-Монитор-FRT* (количественный тест на РНК ВГС); линейный диапазон измерения - 500–50 млн МЕ/мл. Исследуемые образцы помечены зеленым цветом. Синие - отрицательные контроли, рыжие – калибраторы ВКО, красные – положительные контроли и калибраторы РНК ВГС.



- **Три образца: №14 (в ИФА - анти-Core), №20 и №23 (в ИФА – анти-NS3) имели характерные кривые накопления, но ниже порогового уровня. Поэтому они были оценены как отрицательные.**

Авторы выражают искреннюю благодарность за помощь в подборе проб и обсуждении результатов исследования сотрудникам клинико-иммунологической лаборатории по диагностике ВИЧ-инфекции Науменко В.А., Гусеву А.С., Борисовой А.М., Богалей Л.Д., Ипатову П.А., врачу-инфекционисту Борейше Л.В.