

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики  
«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Применение метода ИФА для диагностики инфекционных заболеваний»

Выполнили:

студенты 3 курса 2 группы

Медико-биологического факультета

Направления подготовки Биология

Профиль Биохимия

Гузенко Валерия Вячеславовна

Кутузов Михаил Алексеевич

Максимова Полина Валерьевна

Рябова Людмила Александровна

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной

медицины и биологии

Толкачев Борис Евгеньевич

*Хорошо (79 баллов)  
с и. замечания  
в теме работы  
Дрес (Толкачев)  
20.04.2016*

Волгоград 2016

## Содержание:

Список сокращений .....	2
Введение .....	3
1. Теоретические аспекты	
1.1 Общие сведения о гепатите С .....	4
1.2 Общие сведения о ВИЧ	
2. Скрининг и диагностирование .....	8
2.1 Диагностирование гепатита С .....	8
2.2 Диагностирование ВИЧ .....	9
3. Лабораторные показатели	
3.1 Лабораторные показатели гепатита С .....	11
3.2 Лабораторные показатели ВИЧ .....	11
3.2.1 Лабораторное подтверждение диагноза ВИЧ-инфекции .....	11
3.2.2 Неспецифические лабораторные признаки ВИЧ-инфекции .....	11
3.2.3 Использование результатов лабораторных исследований при диагностике ВИЧ-инфекции.....	12
4. Антитела	
4.1 Антитела гепатита С .....	13
4.2 Антитела ВИЧ .....	13
5. Маркеры	
5.1 Маркеры гепатита С .....	14
5.2 Маркеры ВИЧ .....	15
6. Метод ИФА	
6.1 Методы ИФА и иммуноблотинга в диагностике гепатитов .....	16
6.2 Диагностика ВИЧ при помощи метода ИФА .....	20
Вывод .....	23
Список литературы.....	25

### **Список сокращений:**

- Анти-ВГС - антитела вируса гепатита С
- ВГС, HCV - вирус гепатита С
- ВИЧ, HIV - вирус иммунодефицита человека
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИФА - иммуноферментный анализ
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РНК - рибонуклеиновая кислота
- СПИД - синдрома приобретенного иммунодефицита
- АлАТ (АЛТ) - аланинаминотрансфераза



### **Введение.**

Иммуноферментный анализ (ИФА) — высокочувствительный и высокоспецифичный метод лабораторного исследования, основанный на специфическом связывании антигенов и антител в пробе с дальнейшим выявлением их ферментной меткой.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) предназначен для детектирования и количественной оценки веществ, способных вызывать образование антител.

ИФА имеет наибольшую информативность при диагностике инфекционных заболеваний. Исследования, выполняемые для обнаружения антигенов возбудителя и специфических антител к ним при инфекциях, являются доступными методами лабораторной диагностики. ИФА применяется для диагностики вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных инфекций. Метод незаменим при диагностике вирусных заболеваний, где затруднены прямые методы детекции возбудителя. ИФА используется в двух направлениях: обнаружение с диагностической целью антител в сыворотке крови обследуемого и определение антигенов возбудителя для установления его родовой или видовой принадлежности.

ИФА на протяжении нескольких десятилетий успешно применяются в научных и диагностических целях в области медицины.



## **1. Теоретические аспекты.**

### **1.1 Общие сведения о гепатите С.**

Вирусный гепатит С - антропонозная вирусная инфекция, поражающая печень и передающаяся парэнтерально, реже половым путем. Может иметь бессимптомное, легкое или более тяжелое течение с частым переходом в хроническую форму и возможным развитием опасных для жизни осложнений - цирроза или первичного рака печени.

Гепатит С сегодня во всем мире считается одним из наиболее тяжелых инфекционных заболеваний. Вызывает его РНК-содержащий вирус, который является одной из основных причин заболевания печени. Нередко симптомы у больного человека либо не проявляются вовсе, либо проявляются, но в скрытой форме. Вылечить гепатит С окончательно практически невозможно, а потому через некоторое время после инфицирования в 80% случаев он переходит в хроническую форму. Дальнейшее развитие заболевания у каждого пятого приводит к циррозу, который, в худшем варианте, ведет к гепатоклеточной карциноме. По оценкам экспертов, по всему миру количество носителей вируса гепатита С доходит до 700 миллионов человек.

Существует множество ситуаций, в которых можно заразиться вирусом гепатита С:

1. При переливании крови и пересадке донорских органов.
2. При совместном использовании одной иглы наркоманами.
3. При использовании нестерильных инструментов.
4. При половом контакте.
5. При оказании медицинской помощи.

Гепатит С не передается через общую посуду, еду и воду, полотенца, мочалки, поцелуи и объятия. При разговоре, чихании и кашле вирус тоже не выделяется.

### Симптомы.

Инкубационный период гепатита С составляет от 2 недель до 6 месяцев. После первоначального инфицирования примерно 80% людей не имеют никаких симптомов. У лиц с острыми симптомами может наблюдаться высокая температура, усталость, снижение аппетита, тошнота, рвота, боли в области живота, потемнение мочи, кал серого цвета, боли в суставах и желтуха (пожелтение кожи и белков глаз).

### **1.2 Общие сведения о ВИЧ**

Вич-инфекция - антропонозная ретровирусная инфекция с медленным развитием, длительным течением и разнообразными клиническими проявлениями, которая завершается развитием синдрома приобретенного иммунодефицита - СПИД и гибелью больного. Международное наименование СПИД - AIDS (англ. Acquired immunodeficiency Syndrome). Возбудитель инфекции - ВИЧ или HIV (англ. Human Immunodeficiency virus) относится к семейству Retroviridae, подсемейству Lentivirinae, роду Lentivirus.

Источник и резервуар ВИЧ-инфекции - человек на всех стадиях заболевания. Наибольшая концентрация ВИЧ наблюдается в крови, сперме, секретах цервикального канала и влагалища. Именно через эти биологические жидкости происходит инфицирование. Считается, что инфицирующая доза составляет около 10 тысяч вирионов. ВИЧ обнаружен также в слезах, слюне, поте, ликворе, моче и грудном молоке, но в незначительном количестве, поэтому эти биологические субстраты не представляют опасности для заражения. Исключение составляет молоко, так как при грудном вскармливании происходит ежедневное внедрение вируса в организм ребенка в течение длительного времени. Способы передачи ВИЧ-инфекции: 1. При половых контактах - гомосексуальных и



гетеросексуальных; 2. Парентерально: через кровь при переливании крови, при введении препаратов крови, при трансплантации, через загрязненные шприцы и другие инструменты и т.п. Вертикально - от инфицированной матери - ребенку внутриутробно, во время родов, при грудном вскармливании. При всех способах передачи главную опасность представляет инфицированная кровь, в CD4+-клетках которой (в Т4-лимфоцитах и других клетках) происходит основное накопление вирусов. Наиболее распространенный способ передачи при половых контактах, поэтому ВИЧ-инфекцию относят к инфекции, передающиеся половым путем.

#### **Основные симптомы:**

- повышение температуры разной интенсивности, но чаще 37,5-38 °С, реже 39 °С, протекающей с познабливанием и потливостью;
- острый тонзиллит и фарингит (боли и першение в горле, гиперемия слизистой ротоглотки, увеличение миндалин);
- энантема и изъязвления на слизистой ротоглотки;
- характерны миалгии, артралгии, головные боли;
- полиаденопатия, особенно часто увеличиваются шейные лимфоузлы;
- увеличение печени и селезенки;
- возможны краснухо- или кореподобные высыпания на лице, туловище, конечностях (включая ладони и подошвы), иногда уртикарные, петехиальные;
- указанные признаки протекают на фоне интоксикации;
- в периферической крови: количество лейкоцитов в пределах нормы или несколько повышено, относительный лимфоцитоз, появляются молодые формы лимфоцитов, которые зачастую принимают за широкоплазменные (атипичные) мононуклеары; показатели СОЭ не повышаются.

Повышенная температура тела сохраняется от 1 до 2-3 недель; явления тонзиллита — около 2-3 недель.



К редким проявлениям острой фазы относятся респираторные расстройства (по типу гриппоподобного синдрома), напоминающие ОРВИ.

**Основные признаки:**

- часто острое начало, может быть даже внезапное;
- повышение температуры тела от субфебрильной до высоких цифр, сопровождающееся ознобом;
- выраженные симптомы интоксикации (общая слабость, головная боль, миалгии, артралгии, анорексия);
- слизистая ротоглотки умеренно гиперемирована и слегка отечна;
- гиперемия миндалин и небольшое их увеличение;
- экссудативный фарингит;
- у 1/3 больных появляется кореподобная или краснухоподобная сыпь.

Течение болезни может быть волнообразным и напоминать течение аденовирусной инфекции. Считается, что манифестация раннего гриппоподобного/моноклеозоподобного синдрома при инфекции ВИЧ является признаком вероятной быстрой прогрессии к тяжелому клиническому СПИДу. Редкими проявлениями острой фазы являются также гастроинтестинальные расстройства с признаками гастроэнтерита.

## 2. Скрининг и диагностирование.

### 2.1 Диагностирование гепатита С.

Поскольку острая инфекция ВГС обычно протекает без симптомов, инфекции ВГС редко диагностируется на раннем этапе. Перейдя в хроническую форму, инфекция ВГС может оставаться недиагностированной, часто вплоть до серьезного повреждения печени.

Инфекция ВГС диагностируется в 2 этапа:

1. С помощью серологического скрининга на антитела к ВГС выявляются лица, инфицированные этим вирусом.
2. Если тест подтверждает наличие антител к ВГС, необходимо провести тест с использованием нуклеиновых кислот на РНК ВГС для подтверждения хронической инфекции ВГС, поскольку около 15–45% лиц, зараженных ВГС, спонтанно избавляются от инфекции благодаря мощной иммунной реакции, не нуждаясь в лечении. Несмотря на прекращение инфекции, результаты их тестирования будут указывать на сохранение антител к ВГС.

При диагностировании хронической инфекции гепатита С следует оценить степень поражения печени (фиброз и цирроз). Это можно сделать с помощью биопсии печени или различных неинвазивных тестов. Кроме того, таких лиц следует подвергнуть лабораторному тесту для установления генотипа штамма гепатита С. Существует 6 генотипов ВГС, которые реагируют на лечение по-разному. Кроме того, человек может быть заражен вирусами более чем одного генотипа. Степень повреждения печени и генотип вируса учитываются в процессе принятия решения о лечении и ведения болезни.

При вирусном гепатите С методом ИФА (иммуноферментный анализ) улавливаются только антитела к различным антигенам вируса гепатита С (анти-ВГС). Антигены вируса гепатита С, если и попадают в кровь, то в количествах, которые практически не улавливаются.



Анти-ВГС в своем большинстве (за исключением антител к coreAg класса М) не свидетельствуют о продолжающейся репликации вируса, не характеризуют ее активность и даже могут соответствовать постинфекции. Также учитывается, что у реципиентов, которым была перелита инфицированная кровь, могут обнаруживаться анти-ВГС донора, при однократной индикации не обязательно свидетельствующие о посттрансфузионном заражении ВГС. У больных хроническим гепатитом С (ХГС) анти-ВГС обнаруживаются в крови не только в свободной форме, но и в составе циркулирующих иммунных комплексов. Их содержание относительно большее при развитии ВГВ/ВГС микст-гепатита.

## **2.2 Диагностирование ВИЧ.**

Диагностика ВИЧ-инфекции и СПИДа - это многоэтапный и многокомпонентный процесс. Выбор лабораторных методов зависит от задач, поставленных перед исследователем и конкретной лабораторией. Эти задачи можно подразделить на две категории: 1) Эпидемиологическая оценка и установление ВИЧ-инфекции 2) Диагностика СПИДа и мониторинг антиретровирусной терапии.

Скринирование – это выявление инфицированных лиц из большого числа людей, подозреваемых на наличие инфекции. Скринирование обычно осуществляется при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) на основе определения антител, специфичных к одному или нескольким вирусным белкам. Уточнение диагноза на основе иммуноферментного анализа путем определения антител, специфичных к вирусным антигенам, отличающимся от тех, которые применялись на этапе скринирования. Обычно скринирование и уточнение диагноза осуществляют путем использования разных тест-наборов ИФА, предназначенных для определения антител, специфичных к различным вирусным белкам. Подтверждение диагноза на



основе определения вирусных белков при помощи метода Western Blot, который иначе называют иммуноблотом. Как правило, на данном этапе диагноз считают окончательным. В целях уточнения диагноза иногда применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), которая позволяет определять вирус-ассоциированные нуклеиновые кислоты – провирусную ДНК и РНК. Многие лаборатории ограничиваются первыми двумя этапами, используя лишь ИФА для скринирования и уточнения диагноза. Это связано, прежде всего, с тем, что часто основными задачами лабораторной службы являются установление масштабов эпидемии, оценка ее географического распространения, а также разработка целевых профилактических мероприятий. В целях окончательного установления диагноза у конкретного больного, конечно же, необходимо применять иммуноблот. Выбор методов во многом зависит также и от оснащенности лабораторий. В основе диагностики ВИЧ-инфекции лежит идентификация компонентов вирусной частицы, в основном вирусных антигенов. Знание структуры вируса и его белковых компонентов имеет большое значение в выборе методов в целях постановки правильного диагноза.

*описательные  
данные на мик.исследованиях*

### **3. Лабораторные показатели.**

#### **3.1 Лабораторные показатели гепатита С.**

Антитела (анти-НСV) находят у 70% заболевших при появлении первых симптомов заболевания, и у 90% заболевших – в течение трех месяцев. Но дело в том, что симптомов часто может и не быть. РНК вируса в крови (более точный анализ методом ПЦР) выявляется в течение 1-2 недель с момента заражения.

#### **3.2 Лабораторные показатели ВИЧ.**

##### **3.2.1 Лабораторное подтверждение диагноза ВИЧ-инфекции.**

В настоящее время для лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции используются различные методы обнаружения ВИЧ, антигенов и генного материала ВИЧ, а также методы обнаружения антител к ВИЧ. Все эти методы обладают различной эффективностью, требуют различного оборудования и разного уровня подготовки персонала. Результаты этих исследований требуют грамотной интерпретации.

Наиболее изученной, удобной с практической точки зрения и наиболее экономичной в настоящее время в мире остается диагностика ВИЧ-инфекции с помощью обнаружения антител к ВИЧ. Остальные методики могут использоваться в качестве вспомогательных в индивидуальных случаях.

##### **3.2.2 Неспецифические лабораторные признаки ВИЧ-инфекции.**

При ВИЧ-инфекции могут наблюдаться такие нарушения, как снижение количества CD4-лимфоцитов, увеличение процентного содержания CD8-лимфоцитов, инверсия соотношения CD4/CD8 (если его значение меньше 1), повышение уровня бета-2-микроглобина, неоптерина, возрастание количества иммуноглобулинов и другие. Обнаружение этих признаков является дополнительным свидетельством в пользу диагноза ВИЧ-инфекции. Однако эти изменения могут отсутствовать при определенных стадиях ВИЧ-

инфекции, иметь индивидуальные колебания у разных пациентов, встречаться при других заболеваниях.

### **3.2.3 Использование результатов лабораторных исследований при диагностике ВИЧ-инфекции.**

На основании только лабораторного анализа клинический диагноз не может быть выставлен. Для вынесения окончательного диагностического заключения необходимо учитывать эпидемиологические данные и результаты клинического обследования.

Признаки инфицирования ВИЧ, обнаруженные при проведении лабораторных исследований, могут использоваться для осуществления противоэпидемических мероприятий, согласно инструкциям Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

*недостаточно  
обоснованными  
выводы*



## 4. Антитела.

### 4.1 Антитела гепатита С.

Для определения в крови вируса гепатита С необходимо сдать анализ на антитела Anti-HCV, который показывает был ли когда-либо контакт с вирусом.

Anti-HCV — отрицательный — контакта не было

Anti-HCV — положительный — контакт был

Наличие антител не означает наличие в крови вируса, и при положительном результате Anti-HCV, делается ПЦР анализ HCV-РНК, по результатам которого определяют присутствует ли в крови вирус гепатита С.

### 4.2 Антитела ВИЧ.

Обнаружение антител к ВИЧ включает 2 этапа. На первом этапе проводится выявление суммарного спектра антител против антигенов ВИЧ с использованием различных тестов: иммуноферментных, агглютинационных, комбинированных, гребеночных, мембранно-фильтрационных или мембранно-диффузных. На втором этапе методом иммунного блоттинга проводится определение антител к отдельным белкам вируса. В работе допустимо использование только тест-систем, имеющих разрешение к применению Министерства Здравоохранения Российской Федерации. Диагностические процедуры должны проводиться только в соответствии с утвержденными инструкциями по применению соответствующих тестов.

## 5. Маркеры.

### 5.1 Маркеры гепатита С.

Антитела образуются к каждому из вирусных белков, расположенных в структурной и неструктурной области ВГС. Этим определяется их неодинаковая специфичность и, соответственно, разная диагностическая информативность индикации. Для скрининговой индикации анти-ВГС используют метод ИФА, а в качестве подтверждающего референс-теста метод иммуноблота (RIBA).

В латентной фазе анти-ВГС класса IgM практически не улавливаются. Они вновь появляются во время обострений, большей частью в сочетании с повышением АЛТ.

Анализы на анти-ВГС могут (крайне редко) иметь ложноотрицательные результаты, обусловленные определенной погрешностью метода и различными внешними причинами. Отрицательные результаты тестов на антитела, естественны на протяжении всего инкубационного периода, длительность которого может составлять до 40-50 недель. Кроме того отсутствие антител может быть продиктовано наличием иммунных заболеваний, в частности, ВИЧ-инфекцией.

Было показано, что наличие в сыворотке анти HCV core является достаточно надежным маркером вирусной репликации, поскольку имеются данные о том, что их присутствие коррелирует с наличием в сыворотке специфической м РНК.

Анти NS3 могут являться самостоятельным диагностическим маркером острой HCV инфекции. Высокие титры анти NS3 при остром гепатите С свидетельствуют о значительной вирусной нагрузке, а длительное сохранение их в острой фазе связано с высоким риском хронизации инфекционного процесса.



## 5.2 Маркеры ВИЧ.

- Обязательные — определение анти-ВИЧ-антител.

- выявление методом иммуноферментного анализа антител к gp120, gp41, gp120/160 и др. Твердофазный ИФА — наиболее распространенный метод лабораторного обнаружения анти-ВИЧ-антител, чувствительность и специфичность которого достигают 99%. Ложноположительные результаты могут быть обусловлены наличием у обследуемого пациента аутоиммунной патологии, беременностью и рядом других причин.

- определение методом иммуноблота антител к двум и более антигенам ВИЧ. Иммуноблоттинг — качественный метод, позволяющий выявить антитела одновременно к ряду антигенов ВИЧ.

- Дополнительные — определение антигенов ВИЧ.

- определение ВИЧ в лимфоцитах методом ПЦР. Определение p24-антигена методом ИФА.

- выделение ВИЧ в культуре *in vitro*.

- Неспецифические лабораторные маркеры

- Уменьшение количества CD4 Т-клеток.

- Снижение иммунорегуляторного индекса (соотношение CD4+/ CD8 Т-клеток) меньше 1.

Антигенные маркеры ВИЧ выявляются в крови значительно раньше. Так, начиная со 2-й по 8-ю неделю после заражения выявляют белок p24. При получении положительных результатов в тест-системах данного типа нужно провести обследование на антитела к ВИЧ. Одновременное определение анти-ВИЧ-антител и антигенов значительно сокращает период «серонегативного окна».



## 6. Метод ИФА.

### 6.1 Методы ИФА и иммуноблотинга в диагностике гепатитов.

Констатация HCV-инфекции базируется на выявлении специфических серологических маркеров. Это важно не только для дифференциальной диагностики гепатита С, но и для суждения о стадии заболевания, прогнозирования его течения, оценки активности процесса и эффективности противовирусной терапии.

Наиболее широко практикуется определение антиHCV антител. Принципиальное значение имеет генодиагностика, основанная на детекции РНК HCV. Недавно появилась возможность обнаружения циркулирующих HCV антигенов.

#### Метод ИФА.

Выявление антиHCV антител проводят при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на основе комплекса структурных и неструктурных вирусных пептидов. В настоящее время применяются диагностические системы 3-го поколения, которые построены из рекомбинантных и/или синтетических фрагментов структурных и неструктурных HCV белков (С, NS3, NS4 и NS5). Внедрение диагностикумов 3-го поколения позволило сократить сроки первичного выявления антиHCV при острой инфекции, существенно повысить чувствительность и специфичность реакции

Частота выявления анти-HCV среди РНК HCV позитивных образцов крови приближается к 100 %. На фоне хронической инфекции антитела выявляются постоянно, а после элиминации вируса сохраняются (прежде всего, анти-С) в течение 48 и более лет. Поэтому формальное наличие анти HCV не всегда говорит о присутствии вируса в организме и не позволяет судить об активности процесса. Для суждения о вирусной нагрузке, активности HCV репликации, риска хронизации, разграничения острого и хронического гепатита, длительности инфекционного процесса и степени

поражения печени предложено использовать определение спектра антител к различным HCV пептидам, а также наблюдать за их качественной и количественной динамикой. Это дает ориентировочную информацию, которая требует подтверждения другими методами.

Анти HCV core тест может использоваться в качестве подтверждающего теста при тестировании образцов с «неопределенными» результатами. Сыворотки крови, в которых анти HCV core детектируется в разведении 1:1000 с большой вероятностью содержат вирус и являются реально позитивными. Образцы, являющиеся позитивными в разведении 1:200 и отрицательными в разведении 1:1000, необходимо в дальнейшем исследовать на наличие вирусной РНК. С большой вероятностью эти сыворотки можно отнести к реально негативным. Есть данные, что у беременных женщин (4 неделя беременности и выше) может быть ложноположительный тест на анти HCV core.

Выявление анти NS4 и высокие титры этих антител чаще всего свидетельствуют о длительности инфекционного процесса, и, по всей видимости, коррелируют со степенью поражения печени.

Большое значение для клинической практики может иметь выявление анти E1/E2. Выявление анти E в течение 1 месяца от начала заболевания и быстрое последующее снижение может свидетельствовать об очищении организма от вирусной РНК, определение анти E при хроническом гепатите С свидетельствует об активной вирусной репликации.

Для многих вирусных заболеваний, таких как гепатит В, гепатит Д, гепатит А, определение антител класса IgM к различным вирусным маркерам является важным диагностическим показателем острой или хронической инфекции.

**1. Тест на антитела к вирусу гепатита С (анти-HCV, ИФА, иммуноферментный анализ) – это анализ, который направлен на то, чтобы выявить антитела, которые вырабатываются иммунной системой для борьбы с вирусом гепатита С. Исследование на суммарные антитела**



включает в себя определение иммуноглобулинов независимо от их вида. Положительный результат анализа говорит о том, что организм заражен вирусом, и иммунитет активно с ним борется. Антитела вырабатываются при острой и хронической форме болезни. Также они еще 5-9 лет есть в крови человека, который переболел и выздоровел самостоятельно. Поэтому необходимо более точное исследование, чтобы определить, какие процессы происходят во время болезни.

2. **Тест на наличие антител класса М к вирусу гепатита С (анти-HCV IgM)** – иммуноглобулины М появляются в крови через 4 недели после заражения. Они остаются в большом количестве, пока болезнь свирепствует в организме. Через 6 месяцев, когда состояние улучшается, их становится меньше. Но они могут появиться вновь, если болезнь перейдет в хроническую стадию и начнется обострение. Положительный анализ на антитела М говорит о том, что у больного острая форма гепатита С или обострение хронической формы этой болезни. Если анализ на IgM отрицательный и в крови нет АЛТ, но есть следы РНК или IgG, то человек считается носителем вируса.
3. **Тест на наличие антител класса G к вирусу гепатита С (анти-HCV IgG)** – это выявление иммуноглобулинов G, которые обезвреживают «ядерные» элементы вирусов. Этот анализ не покажет свежий случай болезни. Ведь IgG появляются только через 2,5-3 месяца после заражения. Их количество снижается через полгода, если лечение прошло успешно. У больных с хронической формой иммуноглобулины G остаются в крови до конца жизни. Положительный результат анализа показывает, что острая стадия закончена. Начался или процесс выздоровления или болезнь ушла в подполье и появилась хроническая форма, без обострений. Если результат анализов крови на гепатит оказался отрицательным, это значит, что в вашем организме нет вирусов и антител к ним. Но в некоторых случаях врач может посоветовать сдать повторный



анализ через несколько недель. Дело в том, что признаки гепатита С появляются не сразу.

#### *Иммуоблотинг.*

Иммуоблотинг (англ. «blot» пятно) основан на дифференцированном определении антител к различным антигенам (С, NS3, NS4 и NS5), которые в виде дискретных фракций («пятен») фиксируются на нитроцеллюлозных полосках и после инкубации с исследуемой сывороткой проявляются мечеными антителами так же, как в «обычном» ИФА. Результат считается положительным при выявлении антител к двум и более антигенам.

Несмотря на высокую специфичность, современные ИФА-системы не гарантированы от гипердиагностики, т.е. от ложноположительных результатов. Для их исключения также требуется динамическая оценка на основе индикации анти HCV к дискретным антигенам (подтверждающие, или конфирмативные тесты).

Наряду с ложноположительными возможны и ложноотрицательные результаты, когда анти HCV антитела не удается обнаружить несмотря на присутствие вируса в организме. Известны по меньшей мере три подобных ситуации:

- 1) начальный период заболевания (серонегативная фаза острого гепатита фаза «окна»),
- 2) больные, получающие иммунодепрессанты (они могут быть длительно инфицированы без сероконверсии),
- 3) заражение некоторыми HCV генотипами (прежде всего 3 и 4).

## 6.2 Диагностика ВИЧ при помощи метода ИФА.

В этом анализе используется два типа реакций: иммунологическая и ферментативная.

Все вариации ИФА основаны на способности антител специфически взаимодействовать только с "собственными" антигенами, т.е. на иммунологической реакции "антиген-антитело".

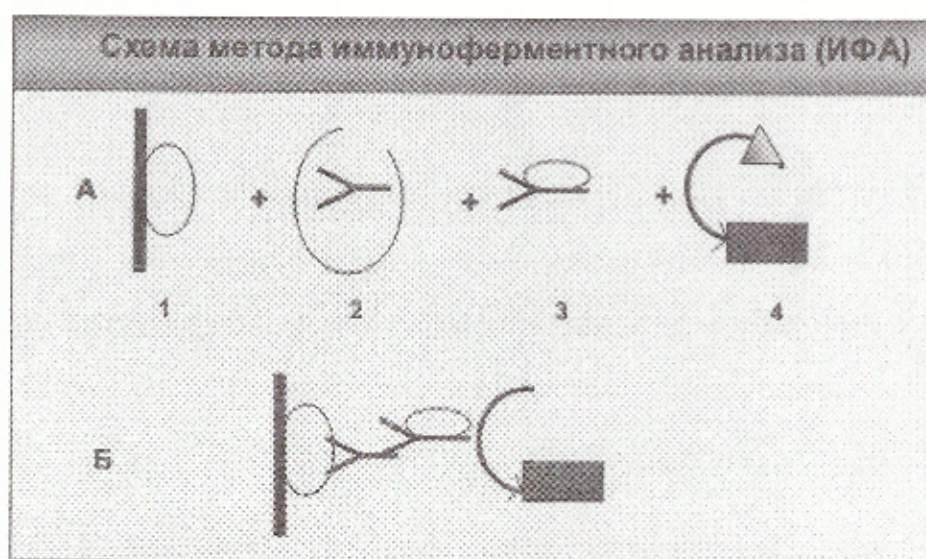
Наибольшее распространение получил гетерогенный вариант иммуноферментного анализа, при котором антиген (определяемое соединение) или антитела фиксируется на твердой основе, в качестве которой могут выступать полистироловый планшет, полистироловые бусины, пористая подложка или магнитный носитель. Анализ проводят в 3 стадии. В лунку планшета, содержащую на своих стенках тот или иной антиген (т.е. один из белков вируса), добавляют исследуемый биологический материал - сыворотку крови больного. При наличии в организме инфекционного агента, в сыворотке появляются антитела к нему. Они прочно связываются с антигеном и не удаляются при последующей промывке чашки. На следующем этапе необходимо определить, образовался или нет в лунке иммунный комплекс, то есть произошло ли соединение антигена с антителом. Простым глазом или под микроскопом это нельзя увидеть, поэтому требуются следующие две стадии, которые можно назвать проявляющими. На второй стадии анализа в лунку вносят специальные (реагирующие с разными антителами) антитела с заранее прикрепленным к ним ферментом (поэтому метод называется ферментным). Слитый в единый комплекс "антитело-фермент" (конъюгат) способен связаться с антителами, уже зацепившимися за антиген, который закреплен на твердой подложке. В результате возникает "молекулярная цепочка", на одном конце которой вирусный белок, а на другом - фермент. После отмывки весь этот многослойный "пирог" остается в лунке планшета. Далее нужно обнаружить активность фермента, чтобы сделать вывод о наличии антитела. Для этого на третьей стадии в ту же лунку вносят раствор субстрата и специального



бесцветного вещества - хромогена, который способен окрашиваться в результате серии биохимических реакций, осуществляемых присутствующим в лунке ферментом. Если в лунке появляется окраска, это означает, что все элементы цепочки присутствуют. Из этого следует вывод: в крови пациента имеются антитела к антигенам ВИЧ и, следовательно, сам пациент инфицирован этим вирусом.

Существуют и другие варианты метода ИФА. Например, можно детектировать не антитела, а сам антиген. Процедура в целом будет похожей, хотя немного более сложной.

Так как ВИЧ-инфекция длится пожизненно, то для диагностики достаточно самого факта обнаружения антител на любом этапе развития заболевания. Обнаружение антител с помощью ИФА является очень чувствительным методом, который выявляет свыше 99% ВИЧ-инфицированных.



Для проведения ИФА необходимо осуществить несколько операций. (А) На первом этапе к антигену, сорбированному на твердой поверхности (1), добавляют сыворотку крови, содержащую антитела (2). Затем в лунку вносят неспецифические антитела, слитые с ферментом (такой комплекс называют конъюгатом) (3). На конечном этапе (4) в ту же лунку вносят способное окрашиваться вещество - хромоген. Если образуется комплекс-"пирог" (Б), то



хромоген под действием фермента расщепляется и появляется окраска. Это означает, что все элементы цепочки присутствуют, "пирог" испекся, и результат тестирования антител положительный.

## Вывод.

Метод ИФА позволяет решать огромный спектр задач по количественному определению широкого класса веществ. Он используется для определения: токсинов, гормонов, онкомаркеров, лекарственных препаратов, наркотиков, пептидов и белков в биосредах человека, животных и культуральных средах. Также метод используется для диагностики инфекционных заболеваний. Посредством ИФА возможно определение иммуноглобулинов (видовая принадлежность, специфичность), а также идентификация лимфоцитов. В настоящее время благодаря своей относительно невысокой стоимости и экологической безопасности ИФА перешёл в разряд стандартных методов качественного и количественного анализа веществ.

## Влияние ВИЧ на гепатит С.

ВИЧ-положительные люди, проходящие диагностику на антитела к гепатиту С, могут получать ложноотрицательный результат, особенно если у них низкий уровень CD 4 (что свидетельствует о плохом иммунном ответе на гепатит С). В связи с этим для диагностики гепатита С у ВИЧ-положительных может применяться тест ПЦР.

Риск передачи как ВИЧ, так и гепатита С от матери к ребенку во время беременности, родов и кормления грудью увеличивается, если мать коинфицирована. Уровень риска также связан с вирусной нагрузкой обоих вирусов. ВИЧ-инфекция нарушает работу иммунной системы человека и, таким образом, ускоряет развитие гепатита С, увеличивает возможность перехода от острого к хроническому гепатиту С, развитию фиброза и, в дальнейшем, цирроза.

## Влияние гепатита С на ВИЧ.

Влияние гепатита С на прогрессирование ВИЧ-инфекции не является однозначным. Хотя в некоторых исследованиях указывается, что определенные типы этого вируса ускоряют переход ВИЧ-инфекции в стадию СПИДа, этот вопрос до сих пор остается открытым. Воздействие гепатита С

на ВИЧ ограничено, однако в случаях более серьезного повреждения печени, особенно у людей с генотипом 1, возможно отягощение заболевания. Развитие и лечение ВИЧ и гепатита необходимо подвергать тщательному мониторингу. Необходимо также внимательно наблюдать за тем, как взаимодействует их лечение.

Многие люди, инфицированные ВИЧ в России, также инфицированы гепатитом С. Это связано с тем, что пути передачи этих вирусов схожи. Наличие двух инфекций в организме называют коинфекцией. Гепатит С – одна из наиболее частых причин хронических болезней печени, наносящей сильный ущерб здоровью людей с ВИЧ. Наличие гепатита С у человека может так же повлиять на изменения в терапии ВИЧ. Начиная с 1999 г. гепатит С считается оппортунистической инфекцией для людей с ВИЧ.

Проведение исследования в лабораторных условиях на сегодняшний момент единственный и самый надежный вариант диагностики (анализ крови на ВИЧ).



### Список литературы:

1. Белая О.Ф., Цак С.Г. Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекционных заболеваний // Вестник РАМН. — 2010. — № 11. — С. 50-53.
2. Долгов В.В., Ракова Н.Г., Колупаев В.Е., Рытикова Н.С. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях. — М.-ТВЕРЬ: Триада. — 2007. — 320 с.
3. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] Гепатит С. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень № 164, Июль 2013 г. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/ru/>
4. Pondé, RA (February 2011). «Hidden hazards of HCV transmission». *Medical microbiology and immunology* 200 (1): 7–11. DOI:10.1007/s00430-010-0159-9. PMID 20461405.
5. Медицинская вирусология. Часть 2. Частная вирусология. Учебно-методическое пособие. М. Российский Государственный медицинский Университет. Московский факультет РГМУ, 2010 г. 183с.
6. Л.М. Анцилевич, Л.А. Ягудина. Практическая медицина//Практическое применение иммуноферментного анализа в диагностике заболеваний.-2014.- 03 (14)
7. Crowe S.M., Carlin J.B., Stewart R.I. et al. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J.Acquir.Immun.Defic.Syindr.* 1991, 4:770-776.
8. Vella S., Guiliano M., Pezzotti P., et al. Survival of zidovudine-treated patients with AIDS compared with that of contemporary untreated patients. *J.A.M.A.* 1992, 267:1232-1236.
9. Soriano V., Garcia-Samaniego J., Bravo R., et al. Morbilidad y mortalidad asociadas a hepatopatía crónica viral en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med.Clin. (Bare.)* 1995, 104:641-644.

10. Soriano V., Rodriguez-Rosado R., Garcia-Samaniego J. Management of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS*. 1999, 13:539-546.
11. [ВИЧ-инфекция, СПИД] Журнал для специалистов, работающих в области ВИЧ/СПИДа и ассоциированных заболеваний «Шаги-профессионал» 2006-2013.