

УДК 616.36-002+616-078

**ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА  
ГЕПАТИТА С**

**Ержанова Енлик Ержанқызы, БазарбаеваКарлыгашЖаксыбековна**  
Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан,  
Казахстан, [likonya\\_1992@mail.ru](mailto:likonya_1992@mail.ru) 1, [Karlygash.ba@mail.ru](mailto:Karlygash.ba@mail.ru) 2  
Научный руководитель – Базарбаева Карлыгаш Жаксыбековна

**Аннотация.** Острая форма вирусного гепатита С (ВГС) в подавляющем большинстве (в 70-80 % случаев) заканчивается развитием хронического гепатита. Ситуация осложняется тем, что больные хроническим гепатитом С, являясь мощным источником инфицирования здоровых людей, длительное время чувствуют себя вполне удовлетворительно, не зная о своем инфицировании и не обращаясь за медицинской помощью. Несмотря на поставленную ВОЗ цель по ликвидации вируса гепатита С (ВГС) как угрозы общественному здравоохранению, охват тестированием и лечением ВГС остается низким. Для достижения этой цели необходимы мероприятия, основанные на фактических данных, для устранения

препятствий на пути оказания медицинской помощи людям с инфекцией ВГС или подверженным риску заражения. [1, 2].

Ранняя диагностика инфекции вируса гепатита С (HCV-инфекции) и своевременное проведение адекватной терапии и профилактических мероприятий способствуют улучшению эпидемиологической ситуации по вирусному гепатиту С [3, 4].

В связи с этим, необходимость разработки новых диагностических методов, медицинских препаратов, а также проведения оперативных исследований в целях профилактики и лечения различных форм заболевания ВГС, остается одной из актуальных проблем во всем мире.

**Ключевые слова:** гепатит С, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.

**Введение.** Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (HCV), представляет собой серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире, при этом в настоящее время около 71 миллион человек живут с этой хронической инфекцией.

Вместе с тем, утверждение противовирусных препаратов прямого действия (DaaS), начиная с 2014 года, произвело революцию в лечении и позволило излечить почти всех пациентов. Число лиц, начавших лечение ВГС, увеличилось примерно с 500 000 в 2014 году до более чем 2 миллионов в 2017 году.

В 2016 году Всемирная организация здравоохранения призвала к ликвидации ВГС как глобальной угрозы общественному здравоохранению к 2030 году, поставив цель сократить число новых инфекций на 90%, излечить 80% хронических инфекций и снизить смертность на 65%.

Стандарт лечения ВГС 2020 года эволюционировал в сторону всеобщего скрининга и лечения. Однако в настоящее время наблюдается значительный разрыв между каждым этапом “каскада лечения ВГС”, начиная со скрининга, диагностики, оценки, лечения, профилактики повторного заражения и лечения цирроза. Известно, что низкие показатели диагностики приводят к еще более низким показателям лечения и, в конечном счете, излечения. Инновации могут помочь устранить основные препятствия на этих этапах, чтобы продвинуть биомедицину к ликвидации ВГС [5].

**Цель исследования** - сравнительный анализ и определение эффективности методов по выявлению вируса гепатита С у человека.

**Материалы и методы.** В качестве материала исследования были отобраны образцы плазмы крови пациентов, с предполагаемым диагнозом вирусного гепатита С. Исследованы 324 пробы на предмет обнаружения нуклеиновых кислот вирусных частиц, из которых для дальнейших исследований отобраны 47 образцов. В работе использован комплект реагентов «АмплиСенс HCV-FL», выделение РНК с медицинских стандартов был проведен с использованием набора «Рибо-лужичанин» [6].

Реакции противоположной транскрипции РНК и амплификации кДНК микроба гепатита С были проведены с применением ПЦР-набора реагентов «АмплиСенс HCV-FL» версия FER.

Реакция обратной транскрипции РНК и амплификация кДНК вируса гепатита С проведены с использованием набора реагентов «АмплиСенс HCV-Монитор-Fl» «ПЦР-комплекта» вариант FRT. При этом ПЦР с электрофоретической детекцией в агарозном геле проведен с помощью набора реагентов «АмплиСенс HCV-ERh» [6].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Согласно установлению HCV-позитивных стандартов исследования проведены методом ПЦР с гибридационно-люминесцентной детекцией. Акцентировали РНК с целью исследования микроба гепатита С, применяя комплект реагентов «РИБО-лужичанин» [6, 7].

Известно, что молекула РНК нестабильна, т.к. она денатурирует в течение нескольких часов. С целью недопущения этого процесса с полученными образцами, непосредственно сразу после их получения, ставили реакции обратной транскрипции совместно с реакцией амплификации. После завершения этой реакции получали молекулы кДНК, с которыми проходила ПЦР. Далее приступали к флуоресцентной детекции продуктов амплификации с

помощью флуоресцентного ПЦР-детектора «ALA 1/4», путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала[3].

Аппарат определял флуоресценцию по двум каналам: канал FAM определял наличие ВКО для исключения ложноотрицательных результатов; канал HEX определял непосредственно ДНК вируса гепатита С. По окончании реакции амплификации проводили детекцию продуктов ПЦР во флуоресцентном анализаторе, который фиксировал положительные и отрицательные результаты, а также наличие всех использованных видов контролей.

Установлено, что пациентов, инфицированных 1b генотипом HCV, хронический гепатит имеет более агрессивное течение и приводит к более тяжелым поражениям печени, чем у пациентов, инфицированных другими генотипами.

Размеры генотипов РНК HCV, определяемых в исследованиях, следующие:

Генотип 1a - 338 п.о.

Генотип 1b - 395 п.о.

Генотип 2a - 286 п.о.

Генотип 3a – 227 п.о.

Генотип 1b обнаружили в наибольшем количестве исследованных образцов. Число положительных результатов с генотипом 1b, обнаруженных в настоящей работе, составило 21.

Всего было проведено 47 экспериментов на определение генотипов вируса гепатита С. Результаты по распространенности генотипов вируса гепатита С приведены в таблице 1.

Таблица 1

**Распространенность генотипов гепатита С**

Генотипы HCV	Количество образцов	Процент, %
1a	1	1.4%
1b	21	45.1%
2	7	13.9%
3a	12	29.9%
1a,3a	1	0,7
1b,2,3a	1	1,4
1b,2	1	2,0
1b,3a	1	0,7
1a,2a	1	0,7
1b,1a	1	1,4
<b>Всего</b>	<b>47</b>	<b>100</b>

Из таблицы 1 видно, что наиболее распространенным оказался генотип 1b.

Результаты исследования, описанные выше, позволили отобрать положительные образцы, количество которых составило 16. Дальнейшие манипуляции проводили с целью анализа количества копий РНК вируса гепатита С. Для достижения поставленной цели проводили эксперименты с тест-системой фирмы «АмплиСенс» с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени», что сияние фиксируется мгновенно согласно 2 каналам флуоресценции (FAM – знак ВКО, HEX – знак накапливания провианта взаимодействия). С целью увеличения правдивости итогов применяли позитивные и негативные примеры. Во всех образцах, за исключением одного, ПЦР прошла успешно. Свечение в ОКО, определяемое только по каналу FAM доказывает достоверность полученных результатов и отсутствие контаминации фрагментами кДНК. В случае с ПКО 1 и 2 свечение регистрируется по обоим каналам флуоресценции, что свидетельствует об успешном прохождении реакции. По завершении ПЦР данные из

протокола исследования переносили в «AmpliSensSoftMonitor FRT» для подсчета количества копий вирусных частиц. После внесения всех данных программа автоматически строила калибровочную прямую, определяла концентрацию вируса (МЕ/мл) в анализируемых образцах и формировала протокол по результатам анализа[6, 7].

С целью определения наиболее достоверного, чувствительного и специфичного метода для определения вируса гепатита С проводили исследование 47 образцов плазмы крови пациентов с предположительным диагнозом «вирусный гепатит С». Со всеми образцами проводили исследования как методом ПЦР, так и ИФА. Все исследования осуществляли с применением комплекта реагентов «Неприкосновенность анти-ВГС». В пяти пробах определяется вирус гепатита С. В образце В (бланк) оптическая плотность определяется как 0,000. Два отрицательных контроля NC1 и NC2 демонстрируют очень низкую оптическую плотность, в то время как положительный контроль, PC1 – высокую. Из 47 исследований суммарные антитела к вирусу гепатита С выявили в тридцати случаях, что составило 63,8% [3, 6, 7].

**Выводы.** Сравнивая результаты, полученные методами ИФА и ПЦР, обнаружили, что иммуноферментный анализ выявляет антитела к искомому вирусу в два раза чаще, чем метод амплификации нуклеиновых кислот. Такие результаты вполне объяснимы, учитывая, что РНК вируса удаляется при полном излечивании организма от вирусной инфекции. В то же время антитела к вирусу гепатита С могут сохраняться в крови в течение длительного времени и обнаруживаться даже после полного отсутствия самого вируса. Данные, полученные путем сравнительного анализа двух методов обнаружения вируса гепатита С, позволили отдать предпочтение методу ПЦР при определении динамики лечения, а также окончательного излечивания от вирусного гепатита С. В то же время чувствительность метода ПЦР зависит от фирмы-изготовителя реактивов, которая декларирует в инструкции о чувствительности производимого ими набора реагентов. Так, чувствительность реагентов фирмы «АмплиСенс», использованной в настоящей работе, составляет 102 вирусных частиц в 1 мл сыворотки, что позволяет выявить наличие вируса при инфицировании сотнями частиц. Для первичного выявления вирусного гепатита С возможно использование обоих методов, поскольку как наличие антител, так и РНК вируса в совокупности и биохимическими и другими анализами позволяют поставить диагноз «вирусный гепатит С».

**Заключение.** Таким образом, чувствительность как метода ИФА, так и ПЦР достаточно высока и зависит от качества реактивов, произведенных различными фирмами, при этом в настоящее время метод амплификации является более специфичным, о чем свидетельствует повсеместное распространение использования метода ПЦР.

Таким образом, результаты анализа вышеуказанных исследований показали, что полимеразная цепная реакция (ПЦР) имеет повышенную эффективность в решении вопросов скрининга, диагностики, оценки, построения тактики и продолжительности лечения заболевания вирусного гепатита С, а также профилактики повторного заражения и лечения цирроза, определения динамики противовирусной терапии.

#### Список использованных источников

1. Cunningham EB, Wheeler A, Hajarizadeh B Interventions to enhance testing, linkage to care, and treatment initiation for hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis//The Lancet. –Elsevier, 2022. -P. 14-15.
2. Xinyun Yang, Ting Ding, Haifeng Huang, Yang Xu, Jian Yu. Development and validation of a simple and rapid method for hepatitis C virus genotyping based on one-step RT-qPCR June 19, 2020 <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8912> P. 2284-2290.
3. Dore GJ, Bajis S Hepatitis C virus elimination: laying the foundation for achieving 2030 targets//Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. -2021. -P. 23-25.
4. Рупасова А.Р., Сорокина А.Ю. Вирусные гепатиты//Медицинские науки, Пермь. -2018. -С.317-319.

5. Камсаракан Н.Н., Воронов М.В. Серологические и молекулярно-биологические методы диагностики вирусного гепатита. – Луганск, 2021. - С. 90-95.
6. Дземова А.А., Ганченко Р.А. Хронический гепатит С после начала программы элиминации HCV инфекции//Гепатология и гастроэнтерология, Санкт-Петербург. -2020. -С.165-167.
7. Соломай Т.В., Семененко Т.А. Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия. Вопросы вирусологии.2020;65(1): с. 27-34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>