

## ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОЧИПОВ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ В ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ АНТИТЕЛ ТОЛЬКО К НЕСТРУКТУРНОМУ ПРОТЕИНУ NS3 ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2012 г. А.А. Потапова, Т.А. Чеканова\*, М.Л. Маркелов\*,  
Е.А. Пудова\*, Н.П. Кирдяшкина\*, Г.А. Шипулин\*, Л.В. Ковальчук\*\*,  
В.М. Дронова, Н.Н. Потекаев

*Московский научно-практический Центр дерматовенерологии и косметологии  
Департамента здравоохранения г. Москвы, Россия;*

*\*ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия;*

*\*\*Российский национальный исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова, Москва*

**Поступила:** 19.05.2011. **Принята:** 16.01.2012

В данном исследовании были изучены диагностические возможности иммуночипов для верификации присутствия антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС). Из 22 образцов сыворотки крови со слабой положительной реакцией в ИФА только на неструктурный белок NS3 HCV (результаты исследования неопределенные) 18 образцов (81,8%) в иммуночипах были признаны анти-ВГС-положительными, потому что в них были обнаружены антитела класса G к двум или более антигенам ВГС. В 5 образцах (22,7%) в иммуночипах были обнаружены анти-ВГС класса M. Среди образцов с неопределенными результатами в ИФА количество образцов с положительными результатами в иммуночипах было в 4 раза больше, чем в иммуноблоте ( $p < 0,05$ ). Таким образом, формат иммуночипа позволяет подтвердить наличие анти-ВГС посредством расширения диапазона выявляемых антител.

**Ключевые слова:** антитела к протеину NS3, вирус гепатита С, иммуночипы

### ВВЕДЕНИЕ

Универсальным методом первичного скрининга крови на маркеры инфекции, вызываемой вирусом гепатита С (ВГС), которая длительно развивается без клинических и биохимических проявлений, является иммуноферментный анализ (ИФА) вследствие его высокой чувствительности и ценовой доступности тест-систем планшетного формата. Определенные трудности верификации наличия антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в образцах с низкой оптической плотностью в ИФА [1] привели к введению, наряду с критериями позитивного и негативного результата исследований, критериев так называемого неопределенного результата исследования для

подтверждающих тест-систем с отдельным определением антител к четырем и более антигенам ВГС: иммуноблота (ИБ), линейного иммунного анализа (ЛИА) и тест-систем планшетного формата ИФА (ИФТС). Вместе с тем, вследствие наблюдаемых в течение длительного времени неоднократных воспроизведенных неопределенного результата, особенно вследствие выявления антител к единственному неструктурному антигену ВГС (NS3, NS4 или NS5), вопрос о специфичности реакции у конкретных пациентов сохраняется. Неоднозначность результатов существующих верификационных тестов обосновывает дальнейшую оптимизацию алгоритмов серодиагностики ВГС и разработку новых высокочувствительных и специфичных молекулярных методов исследования. В последнее время появился новый класс препаратов для серодиагностики инфекционных заболеваний — иммуночипы, принцип работы кото-

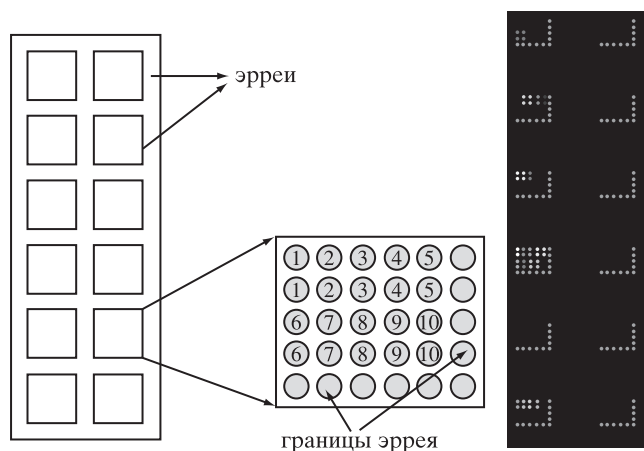
рых основан на непрямом методе выявления антител к возбудителям с помощью флуоресцентной детекции [2].

Целью представленной работы было изучение верификационных возможностей иммуночипов при серодиагностике ВГС-инфекции в случаях низкой позитивной оптической плотности антител к NS3 антигену ВГС в тест-системах для ИФА планшетного формата.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Были исследованы образцы сыворотки крови, направленные из различных лечебно-профилактических учреждений г. Москвы в лабораторию, в которой проводится массовый скрининг на маркеры вирусных гепатитов. Выявление анти-ВГС проводилось с помощью лицензированных ИФТС по двухэтапной схеме [3]. На первом этапе (скрининге) была использована ИФТС «РекомбиБест-анти-ВГС» (ЗАО «ВекторБест», г. Новосибирск) с комплексной сорбцией антигенов ВГС. На втором этапе (после обнаружения анти-ВГС в скрининге) была использована ИФТС с отдельной сорбцией Core-антигена и комплекса NS антигенов: «РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест» (ЗАО «ВекторБест», г. Новосибирск). Оптическую плотность (ОП) контролей и образцов определяли с помощью планшетного ИФА анализатора PR2100 (BioRad, США). После определения ОП для каждой пробы рассчитывали значение коэффициента позитивности в ИФА ( $KP_{ИФА}$ ) по отношению величины ОП пробы к ОП критической (для групп данные представлены как среднее  $KP \pm$  стандартное отклонение). Позитивные образцы с низкой ОП в скрининге и в подтверждающей ИФТС согласно ранее разработанному алгоритму [4] были дополнительно исследованы в ИФТС «РекомбиБест анти-ВГС-спектр» с отдельной сорбцией 4-х антигенов ВГС: Core, NS3, NS4, NS5, а также в тест-системе ЛИА (линейный иммуноанализ — разновидность иммунного блоттинга с отдельной иммобилизацией рекомбинантных антигенов на мембране) «INNO-LIA HCV Ab III update» («Innogenetics», Бельгия) и в ИБ «RecomBlot HCV IgG 2.0» («Mikrogen», Германия). В дополнительное тестирование согласно ранее проведенному исследованию отбирали образцы с  $KP_{ИФА}$  комплекса анти-NS менее 5,4 [4]. Образцы, в которых в ИФТС определялись только анти-NS3, кроме ИБ и ЛИА, были дополнительно исследованы в иммуно-

чипах. Принцип работы иммуночипов был подробно описан ранее [2]. Для данной работы в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора была сконструирована экспериментальная серия иммуночипов — диагностических наборов, включающих иммуносорбент (микроскопные слайды с иммобилизованными антигенами ВГС), раствор для разведения образцов, концентрат конъюгата, раствор для промывки иммуносорбента, положительный и отрицательные контрольные образцы. Отрицательные контрольные образцы были приготовлены из пула проб нативной сыворотки крови, инактивированных прогреванием при 56 °С в течение 1 часа и не содержащих антител к вирусу иммунодефицита человека, антител к ВГС, HbSAg, антител к *Treponema pallidum*. Отсутствие маркеров в образцах сыворотки крови, используемых для получения отрицательных контрольных образцов, было установлено методом ИФА в тест-системах планшетного формата нескольких производителей. В качестве положительных контрольных образцов был использован пул проб инактивированной сыворотки крови, содержащей антитела к ВГС и не содержащей маркеров ВИЧ-инфекции, HbSAg, антител к *Treponema pallidum*. Для приготовления иммуносорбента рекомбинантные антигены ВГС иммобилизовали на поверхности микроскопных слайдов с альдегидным покрытием CSS-100 Silylated Slides (GEL Associates Inc., США) с помощью робота для контактной печати Хаст II («LabNext», США). Дизайн иммуночипа представлен на **рис. 1**. На каждом микроскопном слайде формировали 12 индивидуальных эрреев — ограниченной зоны на слайде, предназначенной для проведения анализа одного клинического или контрольного образца. В пределах каждого эррея были иммобилизованы антигены ВГС, относящиеся к генотипам 1b и 3a: Core-3a; Core-1b, NS3-3a, NS3-1b, c-100 (участок NS4), m-5-1-3a, m-5-1-1b (участок NS4), NS5-3a; NS5-1b. Каждому антигену соответствовал индивидуальный спот (пятно) в двух повторях. При проведении анализа на каждый эррей был нанесен исследуемый или контрольный образец. После 60-минутной инкубации и отмывки следовала 30-минутная экспозиция с антивидовым конъюгатом козьих антител к IgG и IgM человека (ООО «ИМТЕК», Россия), модифицированных TRITC или FITC соответственно. Учет результатов серологического анализа на иммуночипе проводили с помощью сканера и



**Рис. 1.** Схема иммуносорбента иммуночипа и пример его флуоресцентного изображения на канале Cy5 (Red).

*Примечание:* в центр рисунка помещен эррей — зона на слайде для тестирования одной пробы, на котором цифрами отмечены споты — места с отдельно иммобилизованными антигенами:

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.

соответствующего программного обеспечения, оценивая интенсивность сигнала флуоресценции соответствующих спотов — мест локализации отдельных антигенов. На канале Cy5/Red детектировали специфические иммуноглобулины класса G, на канале Cy3/Green детектировали специфические иммуноглобулины класса M. Для каждого спота рассчитывали коэффициент K, представляющий собой отношение абсолютного значения флуоресценции конкретного спота (за вычетом суммарного фона вокруг эррея) к фону. Значение критического уровня (cut off) для каждого из антигенов и контролей устанавливали путем умножения среднего значения K в эррее с внесенным контрольным отрицательным образцом тест-системы (K-) на два. Для каждого иммобилизованного антигена рассчитывали коэффициенты позитивности антител (КП<sub>ИЧ</sub>) как отношение среднего значения K к соответствующему cut off. Положительным результатом на наличие антител к определенному антигену в исследуемом образце считали те показатели, при которых КП<sub>ИЧ</sub> был больше или равен 1.1.

В состав иммуносорбента входили 9 иммуногенных антигенов, которые можно отнести к четырем группам антигенов ВГС: Core, NS3,

NS4, NS5. Образец считали содержащим антитела к ВГС, если значения КП<sub>ИЧ</sub> были больше или равны 1,1 для двух и более групп антигенов ВГС. Результат исследования образца считали неопределенным при выявлении положительного КП<sub>ИЧ</sub> только для одной группы антигенов. Образец считали отрицательным, если значения КП<sub>ИЧ</sub> для всех иммобилизованных антигенов были менее 1,1.

В иммуночипе было исследовано 22 образца с низким КП анти-NS3 в ИФТС. Контрольную группу составляли 60 образцов с отрицательным результатом тестирования анти-ВГС в ИФТС.

Статистическая обработка проведена с помощью программ Excel и Clinic [5].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам первичного скрининга и подтверждающего исследования было выбрано 22 пробы, в которых в ИФТС с отдельным выявлением анти-Core, анти-NS3, анти-NS4 и анти-NS5 обнаруживались только анти-NS3 ВГС; из них 13 образцов были дополнительно исследованы также в ИБ (табл. 1).

В первичной ИФТС КП анти-ВГС в группе составлял  $2,42 \pm 0,66$ ; в ИФТС с отдельным выявлением антител к 4-м антигенам ВГС КП анти-NS3 был равен  $4,79 \pm 4,05$ . Выявление анти-NS3 в соответствии с инструкциями к использованным тест-системам являлось основанием для интерпретации результата исследования анти-ВГС как неопределенного. При дополнительном исследовании 13 образцов в ИБ «RecomBlot HCV IgG 2.0» и «INNO-LIA HCV Ab III update» результат исследования интерпретировался как отрицательный для 5 образцов (38,5%) (№ п/п 1, 2, 3, 6, 9), как неопределенный — для 6 образцов (№ п/п 4, 5, 11, 17, 18, 19), причем в одном из них (№ п/п 18) в ЛИА были обнаружены антитела к E2, но не к NS3 антигену ВГС. Результат исследования двух образцов был признан позитивным (15,4%) вследствие обнаружения антител не только к NS3, но и к NS4 антигену (№ п/п 10), а также к C1 и C2 антигенам ВГС (№ п/п 20).

Исследованные в ИФА 22 образца были протестированы в иммуночипах производства ЦНИИ эпидемиологии с отдельно иммобилизованными антигенами (Core-1b, Core-3a, NS3-1b, NS3-3a, c100p, m-51-1b, m-51-3a, NS5-1b, NS5-3a) и отдельным выявлением антител классов M и G; результаты представлены в табл. 2.

**Таблица 1.** Результаты исследования образцов сыворотки крови с низким коэффициентом позитивности анти-NS3 в иммуноферментных тест-системах планшетного формата с раздельным выявлением антител к Core, NS3, NS4, NS5 антигенам ВГС («Бест-анти-ВГС-спектр» с. 1805 с. 1858, производство «Вектор Бест анти-ВГС»), в иммуноблоте «RecomBlot HCV IgG 2.0», lot HC03091 (РБ, «Mikrogen», Германия) и в линейном иммуноферментном анализе «INNO-LIA HCV Ab III update», с. 009 (ЛИА, «Innogenetics», Бельгия)

п/п	Шифр пациента	Пол	Возраст, лет	КП-анти-NS3 в ИФТС; Результат	Реактивность образца к антигенам ВГС в ИБ: РБ и ЛИА (интенсивность реакции). Результат
1	887	ж	60	11,00 Неопределенный	РБ: не обнаружена (0 баллов). Отрицательный
2	206	м	50	14,23 Неопределенный	РБ: не обнаружена (0 баллов). Отрицательный
3	193	ж	79	2,76 Неопределенный	РБ: не обнаружена (0 баллов). Отрицательный
4	771	м	60	12,85 Неопределенный	РБ: к NS3 (3 балла), к геликазе (3 балла); всего 6 баллов. Неопределенный
5	547	м	59	4,30 Неопределенный	РБ: к NS3 (3 балла), к геликазе (3 балла); всего 6 баллов. Неопределенный
6	1708	ж	57	1,04 Неопределенный	РБ: к геликазе (3 балла). Отрицательный
7	246	ж	73	4,33 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
8	702	ж	32	5,48 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
9	2069	м	25	1,20 Неопределенный	РБ: к NS3; 3 балла. Отрицательный
10	253	ж	54	1,20 Неопределенный	РБ: к NS3 (3 балла), к геликазе (3 балла), к NS4 (4 балла); всего 10 баллов. Положительный
11	479	м	28	4,40 Неопределенный	ЛИА: к NS3 (1 +). Неопределенный
12	1638	ж	77	2,16 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
13	1661	ж	23	2,52 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
14	1731	ж	66	3,03 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
15*	2987	м	58	1,50 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
16	106	м	43	1,00 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
17**	1025	ж	29	1,80 Неопределенный	РБ: к NS3 (3 балла), к геликазе (3 балла), всего 6 баллов. Неопределенный
18	1356	ж	77	5,42 Неопределенный	ЛИА: к E2, (2 +). Неопределенный
19	2006	м	61	10,00 Неопределенный	ЛИА: к NS3 (1 +). Положительный
20	1425	ж	23	1,70 Неопределенный	ЛИА: к C1(1 +), к C2(+/-), к NS3 (1 +). Положительный
21	509	ж	82	4,20 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ
22	872	м	77	9,34 Неопределенный	Образец не исследован в ИБ

Примечание: \* № 15 – сыворотка крови потребителя внутривенных наркотиков; \*\* № 17 – сыворотка крови беременной женщины.

**Таблица 2.** Результат дополнительного тестирования в иммуночипах образцов сыворотки крови, в которых при предварительных исследованиях в иммуноферментных тест-системах планшетного формата с низким коэффициентом позитивности были обнаружены только анти-NS3 ВГС

№ п/п	Шифр пациента	Антигены ВГС, к которым обнаружена реактивность IgM (КП)	Результат определения анти-ВГС класса IgM	Антигены ВГС, к которым обнаружена реактивность IgG (К)	Результат определения анти-ВГС класса IgG
1	887	Не обнаружена	Отрицат.	Core-3a (1,4), Core-1b (1,4)	Неопред.
2	206	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-3a (2), NS5-3a (29,1), m5-1-1b (58,6)	Положит.
3	193	Core-3a (1,4), Core-1b (1,5), NS3-1b (7,3)	Положит.	m5-1-3a (2,3)	Неопред.
4	771	NS5-3a (2,3), NS5-1b (3,4)	Неопред.	NS3-3a (17,9), NS3-1b (46), m5-1-3a (8,9), m5-1-1b (6,7), NS5-3a (1,9), NS5-1b (3,3)	Положит.
5	547	Не обнаружена	Отрицат.	Core-3a (10,8) NS3-3a (15,3), NS3-1b (90,5), m5-1-3a (3,8), m5-1-1b (8,6), NS5-3a (1,5), NS5-1b (2,7)	Положит.
6	1708	NS3-3a (3,8), NS3-1b (6,5), m5-1-1b (3,5), NS5-3a (1,9), NS5-1b (6,2)	Положит.	Core-3a (6,5) NS3-3a (9,5), NS3-1b (47), m5-1-3a (5,3), m5-1-1b (2), NS5-3a (1,2), NS5-1b (1,7)	Положит.
7	246	Не обнаружена	Отрицат.	Core-3a (4) NS3-3a (2,7), NS3-1b (28,9), m5-1-3a (12,4), m5-1-1b (1,3)	Положит.
8	702	NS5-3a (1,3)	Неопред.	NS3-3a (1,3), NS3-1b (161,1), m5-1-1b (14,8)	Положит.
9	2069	NS3-3a (1,6) NS3-1b (2), m5-1-1a (1,8), m5-1-1b (1,5), NS5-3a (1,7), NS5-1b (1,3)	Положит.	NS3-1b (14)	Неопред.
10	253	NS5-3a (1), NS5-1b (3)	Неопред.	NS3-1b (22,5), c100 (15,5), m5-1-1b (20,3), Core-3a(2,2), Core-1b (1,9)	Положит.
11	479	NS5-3a (1,2), NS5-1b (1,1)	Неопред.	NS3-1b (64,9), m5-1-1b (1,2), Core-3a (1,2)	Положит.
12	1638	NS3-3a (1,9), NS3-1b (3,3), m5-1-1b (1,1), NS5-1b (1,1)	Положит.	NS3-1b (2,5), NS5-1b (2,1), Core-3a (2,5), Core-1b (2,3)	Положит.
13	1661	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-3a (1,2), NS3-1b (5,8), m5-1-3a (1,5), Core-3a (1,3)	Положит.
14	1731	NS3-1b (4,4)	Неопред.	NS3-3a (11,3), NS3-1b(22,5), m5-1-3a (6,8), m5-1-1b (33,3), NS3-3a (10,9), NS3-1b (38,8), Core-3a (1,8)	Положит.
15	2987	NS3-3a (4,4), NS4-1b (3), m5-1-1a (3), m5-1-1b (4,7), NS5-3a (1,3), NS5-1b (6,3), Core-3a (1,4), Core-1b (1,2)	Положит.	NS3-3a (35,7), NS3-1b (37,9), c-100 (1,9), m5-1-3a (31,1), m5-1-1b(101,3), NS3-3a (55,9), NS3-1b (135,3), Core-3a (43,4), Core-1b (5,2)	Положит.
16	106	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-1b (4,1), m5-1-1b(4,1)	Положит.
17	1025	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-1b (11,6)	Неопред.
18	1356	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-3a (10,3), NS3-1b (15,3), m5-1-3a (1,7), m5-1-1b (3), NS3-3a (1,1), NS3-1b (3,1)	Положит.
19	2006	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-3a (17,9), NS3-1b (30,9), m5-1-3a (4,4), m5-1-1b (2,4), Core-3a (2), Core-1b (1,3)	Положит.
20	1425	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-1b (1,2), m5-1-1b (16,4), Core-3a (1,7), Core-1b (1,4)	Положит.
21	509	NS3-1b (2,5)	Неопред.	NS3-3a (31,9), NS3-1b (36,3), c-100 (3,5), m5-1-3a (20,1), m5-1-1b (64,6), NS3-3a (23,1), NS3-1b (57,4), Core-3a (3,1), Core-1b (1,2)	Положит.
22	872	Не обнаружена	Отрицат.	NS3-1b (5,6), Core-3a (1,2)	Положит.

Из результатов, представленных в **табл. 1 и 2**, следует, что из 22 образцов с низким КП по анти-NS3 в ИФТС, в иммуночипах анти-NS3 не были обнаружены в 2 образцах (9%); а именно, в пробах пациентов под шифром 887 и 193 (№ п/п 1 и 2), в них соответственно выявлялись только анти-Core или анти-NS4. В двух пробах (шифр пациентов 2069 и 1025, № п/п 9 и 17 соответственно) были обнаружены только анти-NS3. Результат исследования данных четырех образцов в иммуночипах так же, как в ИФТС, был неопределенным вследствие выявления антител только к одному протеину ВГС. Таким образом, анти-NS3 были обнаружены в 20 образцах (91%). Дополнительно к анти-NS3 в 16 (80%) из 20 образцов были обнаружены антитела к NS4, в семи (35%) — к NS5, в 14 (70%) — к Core протеинам ВГС. Антитела к двум протеинам ВГС были обнаружены в 4 пробах из 22 (18,18%); в трех они были направлены к NS3 и к NS4 (пациенты 246, 702, 106), в одной — к NS3 и Core протеинам (пациент 872, проба № п/п 20). Антитела к трем протеинам ВГС обнаружены в восьми пробах (36,4%); в одной (пациент 1356) — к NS3, NS4, NS5; в одной (пациент 1638) — к NS3, NS5, Core; в шести (пациенты 206, 253, 479, 1661, 2006 и 1425) — к NS3, NS4, Core протеинам ВГС. В шести пробах (27,3%, пациенты 771, 547, 1708, 1731, 2987, 509) обнаружены антитела к четырем протеинам ВГС: к NS3, NS4, NS5 и Core. Всего в иммуночипах из 22 образцов 18 (81,8%) образцов были признаны анти-ВГС положительными, поскольку в них обнаруживались антитела более чем к двум протеинам ВГС.

При тестировании в иммуночипах 22 образцов на наличие анти-ВГС класса IgM (**табл. 2**) результат исследования 11 образцов (50%) был отрицательным, шести образцов (27,3%) — неопределенным. Среди образцов с неопределенным результатом исследования в двух пробах (пациенты 1731, 509) с низкой позитивностью детектировались анти-NS3, в четырех пробах (пациенты 771, 702, 253, 479) — анти-NS5. Пять образцов были признаны содержащими IgM к протеинам ВГС (22,7%), причем в одной пробе (пациент 193) обнаруживались IgM к двум протеинам ВГС (NS3 и к Core), в трех пробах (пациенты 1708, 2069, 1638) к трем протеинам ВГС (NS3, NS4 и Core), в одной пробе (пациент 2987) — к четырем протеинам ВГС.

Таким образом, из 22 проб, в которых в ИФТС обнаруживались только анти-NS3 и в

соответствии с правилами интерпретации результат исследования был неопределенным, в иммуночипах 18 проб (81,8%) были признаны анти-ВГС-положительными по наличию антител класса G, а пять (22,7%) — позитивными на наличие антител класса M (**табл. 3**).

Из 13 образцов, исследованных в ИБ, в 5 образцах (38,5%) результат исследования был неопределенным (в основном, вследствие обнаружения анти-NS3 и антител к геликазе), в двух (15,4%) — позитивным, в остальных шести — отрицательным (вследствие отсутствия реактивности пробы к антигенным полосам в ИБ, либо вследствие обнаружения антител к одному антигену, в основном только к NS3 протеину). При тестировании этих 13 проб в иммуночипах результат исследования IgG в пяти пробах (38,5%) был признан неопределенным, а в восьми (61,5%) — позитивным (**табл. 3**). Таким образом, среди проб с не-

**Таблица 3.** Сводная таблица результатов исследований образцов с низкой позитивной оптической плотностью антител к NS3 протеину ВГС в ИФА, иммуноблотах (ИБ) и иммуночипах (ИЧ)

№п/п	Шифр пациента	Результат В ИФТС	Результат В ИБ	Результат в ИЧ: IgG	Результат в ИЧ: IgM
1	887	+/-	-	+/-	-
2	206	+/-	-	+	-
3	193	+/-	-	+/-	+
4	771	+/-	+/-	+	+/-
5	547	+/-	+/-	+	-
6	1708	+/-	-	+	+
7	246	+/-	ни	+	-
8	702	+/-	ни	+	-
9	2069	+/-	-	+/-	+
10	253	+/-	+	+	+/-
11	479	+/-	+/-	+	+/-
12	1638	+/-	ни	+	+
13	1661	+/-	ни	+	-
14	1731	+/-	ни	+	+/-
15	2987	+/-	ни	+	+
16	106	+/-	ни	+	-
17	1025	+/-	+/-	+/-	-
18	1356	+/-	+/-	+	-
19	2006	+/-	+/-	+	-
20	1425	+/-	+	+	-
21	509	+/-	ни	+	-
22	872	+/-	ни	+	-

*Примечание:* «+» — позитивный результат, «-» — негативный результат, «+/-» — неопределенный результат исследования, «ни» — образец в ИБ не исследован.

определенным результатом исследования в ИФА (вследствие выявления только анти-NS3) в иммуночипах анти-ВГС-позитивных проб было в 4 раза больше, чем в ИБ ( $p < 0,05$ ). В трех пробах из пяти, ранее признанных не содержащими анти-ВГС в ИБ, (пациенты 193, 1708, 2069), были обнаружены IgM к ВГС.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Антигены неструктурного протеина NS3 ВГС являются одними из наиболее иммуногенных как для Т-лимфоцитов, с длительным сохранением сенсibilизации к ним после выздоровления [6], так и для В-лимфоцитов. Изучение динамики появления анти-NS3 после инфицирования (одновременно с антителами к Core антигену или ранее) привело к выводу о том, что наличие анти-NS3 является надежным маркером начала инфекционного процесса [7]. В нашей работе при исследовании образцов с анти-NS3 (в том числе с отрицательным результатом исследования в ИБ) в иммуночипе был выявлен специфический иммуноглобулин IgM — маркер острого инфекционного процесса или фазы реактивации хронического заболевания.

По данным литературы, результат, позитивный в ИФА, но отрицательный в ИБ часто определяется как ложная позитивность [8], которая может являться следствием неспецифической реакции. Однако, несмотря на высокую специфичность, результаты применения ИБ для исследования сыворотки крови людей с низким риском гемоконтактного инфицирования, в частности, доноров крови, рядом авторов были признаны неудовлетворительными [9]. Среди образцов сыворотки крови с отрицательными и неопределенными результатами исследования в ИБ (по крайней мере, с одной реактивной антигенной линией) высок процент позитивных результатов определения РНК ВГС [10]. Исследователи, в целом, сходятся во мнении о том, что необходима осторожная интерпретация результатов, негативных в ИБ, но позитивных в скрининговом ИФА.

Ранее нами были разработаны критерии отбора образцов в подтверждающее исследование в тест-системы для ИФА расширенным спектром определяемых антител к ВГС (Core, NS3, NS4, NS5), в которых, также как в ИБ, есть критерии неопределенного результата [4]. В представленной работе показано, что количество образцов, определенных

как анти-ВГС-позитивные среди образцов с неопределенным результатом исследования в подтверждающих ИФА (вследствие выявления только анти-NS3), в иммуночипах было в 4 раза выше, чем в ИБ. При этом, ни одного образца в иммуночипах не было определено как несодержащего анти-ВГС. Полученные нами при использовании иммуночипов результаты, которые свидетельствуют об истинной позитивности образцов с анти-NS3 в ИФА (даже при низком КП), согласуются с косвенным указанием на патофизиологический процесс при выявлении только данного маркера, а именно с увеличением сывороточной концентрации  $\alpha$ -фетопротеина, что характерно для процессов, связанных с повреждением и регенерацией печени [11]. С нашей точки зрения, обнаружение в подтверждающих ИФА-тест-системах низких концентраций анти-NS3, даже при признании проб в ИБ анти-ВГС-негативными, является основанием для расширенного обследования пациентов, включающего серологическое исследование с помощью иммуночипов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kiely P.R., Eliades L.A., Kebede K.M. et al. Anti-HCV confirmatory testing of voluntary blood donors: comparison of the sensitivity of two immunoblot assays. *Transfusion* 2002, 42(8), 1053–1058.
2. Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Манзенюк И.Н. и др. Разработка иммуночипа для отдельной детекции антител к вирусу гепатита С. *Клин. лаб. диагностика* 2008, 6, 25–30.
3. О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека. Приказ МЗ РФ № 322 от 21.10.2002.
4. Потапова А.А., Регченко Е.Б., Науменко В.А. Алгоритм исследования «проблемных» образцов при массовом скрининге сыворотки крови на антитела к вирусу гепатита С. *Мир вирусных гепатитов* 2008, 4, 8–12.
5. Бенсман В.М. Облегченные способы статистического анализа в клинической медицине. Краснодар 2002, 30 с.
6. Hitziger T., Schmidt M., Schottstedt V. Cellular immune response to hepatitis C virus (HCV) in nonviremic blood donors with indeterminate anti-HCV reactivity. *Transfusion* 2009, 49(7), 1306–1313.
7. Николаева Л.И. Специфический гуморальный иммунитет при вирусном гепатите С: автореф. дисс. доктора биол. наук. М., 2006, с. 15–45.

8. Alter M.J., Kuhnert W.L., Finelli L. Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. MMWR Recomm. Rep. 2003, 52(RR-3), 1 – 13, 15; quiz CE1-4.
9. Piro L., Solinas S., Luciani M. et al. Prospective study of the meaning of indeterminate results of the Recombinant Immunoblot Assay for hepatitis C virus in blood donors. Blood Transfus. 2008, 6(2), 107 – 111.
10. Engel P.M., Dennin R.H. Supplementary anti-hepatitis C virus (HCV) testing with 2nd and 3rd generation recombinant immunoblot assay and MATRIX applied to enzyme immunoassay positive sera and comparison with HCV-RNA detection. Zentralbl. Bacteriol. 1998, 228(2), 267 – 275.
11. Потапова А.А. Концентрация  $\alpha$ -фетопротеина в сыворотке крови с неопределенным результатом исследования антител к вирусу гепатита С в иммуноферментном анализе. Российский иммунологический журнал 2010, 4(13), 173 – 181.

## IMMUNOCHIPS VERIFYING POSSIBILITIES IN CASES OF ANTIBODIES DETECTION ONLY TO HEPATITIS C VIRUS NS3 PROTEIN IN ELISA

A.A. Potapova, T.A. Chekanova\*, M.L. Markelov\*, E.A. Pudova\*, N.P. Kirdjashkina\*, G.A. Shipulin\*, L.V. Kovalchuk\*\*, V.M. Dronova, N.N. Potekaev

*Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenerology and Cosmetology  
of Moscow Department of public health services, Moscow, Russia;*

*\*FBSI «Central Research Institute for Epidemiology» of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia;*

*\*\*N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

In the present study, the immunochips diagnostic possibilities for verifying the presence of antibodies to hepatitis C virus (anti-HCV) have been explored. Among 22 blood serum samples with weak positive reaction only to non-structural HCV NS3 protein (with results being indeterminate in ELISA) 18 samples (81.8%) turned out to be positive in immunochips because they contained IgG antibodies to two or more HCV antigens. In 5 samples (22.7%) IgM anti-HCV were found out in immunochips. Among samples with indeterminate results in ELISA, the number of samples with positive results in immunochips was 4 times bigger than in immunoblot ( $p < 0.05$ ). Thus, the immunochip's format permits to confirm the anti-HCV antibodies presence by expanding the range of anti-HCV being detected.