

ЭКОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.017.1

К вопросу выявления вируса гепатита В у жителей г. Гомеля

Н.И.РЕЗНИКОВА, И.В.КРАВЧЕНКО

Во всем мире вирусные гепатиты представляют проблему для здравоохранения. В мире насчитывается более 350 млн носителей вируса гепатита В и 150 млн – гепатита С.

Эпидемическая ситуация по вирусным гепатитам в республике Беларусь также требует принятия радикальных мер по ее стабилизации.

В настоящее время насчитывается 7 самостоятельных нозологических форм в категории вирусных гепатитов человека. Гепатит В является ведущей причиной заболевания печени и вызывается ДНК-содержащим вирусом. Заболевание протекает в различных клинико-морфологических вариантах – от “здорового” носительства до злокачественных форм [1, 2].

Важнейшим элементом успешной диагностики вирусных гепатитов является определение в сыворотке крови серологических маркеров инфицирования вирусами гепатита: РНК или ДНК, антигены и антитела к ним, позволяющие судить о наличии возбудителя, текущей или прошедшей инфекции [4].

Вирус гепатита имеет три основных антигена: поверхностный антиген (HBsAg) и два антигена ядра вируса (HBcAg и HBeAg).

HBsAg (австралийский антиген) является ведущим серологическим маркером, свидетельствующим о заражении вирусом гепатита В [3].

Биохимические методы исследования в диагностике гепатита В в связи с большим сходством симптоматики различных этиологических форм вирусных гепатитов имеют второстепенное значение. Наиболее эффективным в выявлении HBsAg является использование метода иммуноферментного анализа [5].

Исследования проводились на базе вирусологической лаборатории Гомельского областного центра гигиены и эпидемиологии, где в настоящее время для обнаружения австралийского антигена используются иммуноферментные тест-системы ИФА-HBs-Антиген, изготавливаемые в Санкт-Петербургском НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.

Материал и методика исследований

Тест-система обладает способностью выявлять в сыворотке крови человека HBs-антиген вируса гепатита В за счет его связывания с моноклональными антителами (анти-HBs), сорбированными на поверхности лунок стрипов. Образующиеся комплексы антитело-антиген обнаруживаются с помощью пероксидазного конъюгата на основе моноклональных антител к HBs-антигену по появлению желто-коричневого окрашивания на этапе ферментативного превращения субстратного раствора.

Тест-система позволяет выявлять HBs-антиген вируса гепатита В в сыворотке крови доноров, больных с клинически проявляющимися и скрытыми формами инфекции. Предназначена для специфической диагностики вирусных гепатитов и скринингового обследования декретированных континентов. В состав набора входит:

1. Положительный контрольный образец (ПК-1), (красный раствор)
2. Слабоположительный контрольный образец (ПК-2), (голубой раствор)
3. Сыворотка, не содержащая HBs-антиген, инактивированная прогреванием, (НК).
4. Конъюгат -моноклональные анти -HBs, меченные пероксидазой, (Концентрат конъюгата), (синий раствор).
5. Концентрат фосфатно-солевого раствора, содержащий детергент-твин-80 (ФСРТ), (оранжевый раствор).
6. Цитратный буферный раствор с перекисью водорода, (ЦБ +перекись водорода), (бесцветный раствор).
7. Орто-фенилдиамин дигидрохлорид (ОФД), (белые таблетки)
8. Раствор серной кислоты (бесцветный раствор).

Проведение иммуноферментного анализа включает следующие этапы.

1. Гидратация сорбированных анти-HBs

Во все лунки планшета вносят по (200-300) мкл оранжевого раствора ФСРТ. Инкубируют в течение (1-2) мин. при температуре 15-25 градусов, а затем из лунок вытряхивают или удаляют насосом.

2. Связывание HBs-антигена.

Одну лунку (A1) оставляют незаполненной (контроль субстрата). В три лунки вносят по 100 мкл зеленого раствора НК, в следующие две лунки -по 100 мкл раствора ПК-1, далее в две лунки по 100 мкл раствора ПК-2. Во все остальные лунки вносят по 100 мкл исследуемых проб. Инкубируют при температуре 37 градусов в течение 2-х часов во влажной камере.

После инкубации – 5-и кратное промывание раствором ФСРТ.

3. Связывание конъюгата.

Во все лунки, кроме A1 вносят по 100 мкл раствора конъюгата. Инкубация в течение 1 часа при температуре 37 во влажной камере.

После инкубации 5-и кратное промывание раствором ФСРТ. Затем лунки промывают 1 раз дистиллированной водой.

4. Проведение ферментативной реакции.

Во все лунки вносят по 100 мкл субстратного раствора. Планшет выдерживают при температуре 15-25 в течение 15 минут.

5. Остановка ферментативной реакции.

Реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл серной кислоты. При правильном проведении стадий анализа содержимое лунок с контролем субстрата и НК должно оставаться бесцветным или бледно-желтым, а содержимое лунок с ПК должно приобрести желто-коричневую окраску. Исследуемый образец оценивается как положительный, если имеются отчетливые различия в интенсивности его окрашивания по сравнению с растворами в лунках с контролем субстрата и НК.

1. Измерение оптической плотности (ОП) проводят на приборе “Санофи” при длине волны 490 нм непосредственно в лунках планшета с помощью вертикального фотометра. В качестве кюветы сравнения служит лунка A1 с контролем субстрата. При правильном проведении анализа ОП в лунках с НК не должно превышать 0.150 оптических единиц, а в лунках с ПК-1 быть не менее 0.800 о.е.. Слабоположительный контрольный образец, содержащий HBs -антиген в концентрации 0,5 нг/мл (ПК-2) должен быть не менее 0,3 о.е. Качественная оценка результатов ИФА проводится по формуле : $ОП(критическое) = 0.06 + \text{среднее значение ОП для НК}$.

1. Если ОП исследуемой пробы больше K, то ее исследуют повторно, в дубликate аналогичного результата считают содержащей HBs – Ag вируса гепатита В.

2. Если ОП исследуемой пробы меньше или равно K, то считают, что она не содержит HBs -антиген вирусного гепатита В.

Результаты и их обсуждение

Объектом исследования являлась сыворотка крови лиц, проживающих на территории г.Гомеля и относящихся к группам риска (беременные женщины, контактные с инфицированными гепатитом В; взрослые и дети закрытых учреждений). Исследование сыворотки крови проводилось с помощью иммуноферментного анализа с использованием новейших тест-систем для определения австралийского антигена в исследуемой пробе крови. Кроме того, проводился сравнительный анализ показателей выявления австралийского антигена по годам за период с 1997 по 2000 год с целью выявления динамики заболевания.

Анализ полученных данных по результатам иммуноферментного анализа показал, что уровень носительства австралийского антигена среди лиц находящихся в закрытых учреждениях в 1997 году составил 2,56 % от числа обследованных, в 1998 году -1,95 %, что на 0,61 % ниже по сравнению с предыдущим годом. В 1999 и 2000 годах уровень носительства HBsAg в этой группе обследованных составил 0 % (таблица). Снижение носительства австралийского антигена у данной группы лиц связано с вакцинопрофилактикой гепатита В детей и персонала учреждений закрытого типа с 1997 года.

При исследовании сыворотки крови лиц с диагнозом “контакт с вирусным гепатитом В”. В 1997 году показатель выявляемости носительства австралийского антигена составил 8,05 %, в 1998 году – 1,95 %, что на 6,10 % ниже, чем в предыдущем году. В 1999 году этот показатель вновь резко возрос до 9,67 % от числа обследованных лиц, что на 7,72 % выше, по сравнению с 1998 годом. В 2000 году показатель носительства вируса гепатита В остался на прежнем уровне.

В этой группе происхождения многих случаев гепатита В остается неизвестным. Сюда относятся группы лиц, отличные друг от друга и имеющие, повышенный уровень риска инфицирования вирусом гепатита В.

Сюда относятся, в частности представители отдельных профессий и лица, получающие внутривенные инфекции; сексуально активные люди (гетеросексуалы и гомосексуалисты), подростки и молодые люди, ведущие половую жизнь далекую от моногамности. Поэтому в этой группе обследуемых снижение уровня передачи вируса гепатита В проблематично.

Таблица

Показатели выявляемости HBsAg
(австралийского антигена) у жителей г.Гомеля

Годы в течении которых проводилось обследование	Контингент обследованных лиц					
	Взрослые и дети закрытых учреждений		Контактные с носителями вируса В		Беременные женщины	
	число обследованных лиц	инфицированные в %	число обследованных лиц	инфицированные в %	число обследованных лиц	инфицированные в %
1997	195	2,56	87	8,05	4,741	1,22
1998	154	1,95	154	1,95	5,240	1,11
1999	10	0	31	9,67	3,331	1,32
2000	27	0	54	9,70	686	1,61

В группе беременных женщин показатель выявляемости носительства вируса гепатита В в 1997 составил 1,22 % от числа обследованных лиц, в 1998 году этот показатель был на 0,11 % ниже по сравнению с предыдущим годом. В 1999 году показатель выявляемости HBsAg составил 1,32 %, что несколько выше по сравнению с 1998 годом. В 2000 году пока-

затель выявляемости носительства вируса повысился на 0,29 % по сравнению с 1999 годом и составил 1,61 % от общего числа обследованных лиц.

Значительность обследования данной группы лиц сводится к предупреждению угрозы заражения ребенка, т.к. установлено, что 90 % новорожденных детей заражаются гепатитом В при родах и лишь 5 % – при последующем тесном общении с матерью.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что метод иммуноферментного анализа и иммуноферментная тест-система для выявления австралийского антигена (HBsAg) является высокоэффективным, безболезненным и безопасным методом, позволяющим обнаружить возможное наличие вируса гепатита В при острой или хронической инфекции, а также при бессимптомном носительстве вируса в крови обследованных групп людей. Это позволяет получить оценку состояния заболеваемости и носительства вирусного гепатита В у групп риска, а также дает возможность оценить эффективность вакцинации для профилактики гепатита В.

Abstract

The report deals with characteristics of the method of immunoenzyme analysis with the use of the latest test-systems to determine Australian anti-gent in the blood of those living in Gomel and representing the so -called risk groups.

Литература

1. Блюгер А., Новицкий И. Вирусные гепатиты. – Рига., “Звайгзне”, 1988, 412 с.
2. Жданов В.М., Гайдамович С.Д. Общая и частная вирусология. Руководство в двух томах., М.: Медицина, 1982, том 1. – 496 с., том 2. – 520 с.
3. Евсеева Л.Ф., Асратян А.А. Иммуноферментный анализ. Получение и характеристика отечественных реагентов для индикации поверхностного антигена вируса гепатита В в сыворотке крови. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1985.– № 1. – С.90–93.
4. Львов Д.К. Многоликий гепатит. “Медицина для всех” М., 1996, № 1 С. 2–3.
5. Майер В., Кенда М. Невидимый мир вирусов. М.: Мир., 1981, 336 с.

Гомельский государственный
университет им. Ф.Скорины

Поступило 18.12.2001