

Заключение

Методика проведения предложенного способа контурной пластики отработана в экспериментальных условиях с изучением морфологических особенностей процесса приживления аллогенного коллаген-фасциального трансплантата в тканях реципиента. Учитывая достаточно успешное применение способа контурной пластики, в клинике челюстно-лицевой хирургии, его можно считать методом выбора при исправлении контура лица и устранении деформаций челюстно-лицевой области различной этиологии с преимущественной утратой мягких тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Титова А.Т., Ярчук Н.И., Румянцева В.В.* Применение аллогенной фасции для устранения нарушений формы лица // *Стоматология*. — 1979. — № 5. — С. 26–31.
2. *Чудаков О.П., Горбачев Ф.А.* Контурная пластика челюстно-лицевой области аллогенным коллаген-фасциальным трансплантатом в эксперименте // *Христианство и медицина; Актуальные проблемы медицины: Матер. II Белорусско-Американской науч.-практ. конф. врачей и 14-й научной сессии Гомельского государственного медицинского университета, посвященных 18-летию Чернобыльской катастрофы, г. Гомель 13–15 апреля 2004 г.* / Сост. С.В. Жаворонок, А.Н. Лызикив, В.В. Аничкин, А.Л. Калинин. — Учреждение образования

Гомельский государственный медицинский институт, 2004. — Т. 4. — С. 87–89.

3. *Boyce R.G., Toriumi D.M.* Considerations in the use of biologic grafts and alloplastic implants in facial plastic and reconstructive surgery // *J Long Term Eff Med Implants*. — 1992. — Vol. 2. — № 4. — P. 199–220.
4. *Franz F.P., Blocksma R., Brundage S.R., Ringler S.L.* Massive injection of liquid silicone for hemifacial atrophy // *Ann Plast Surg*. — 1988. — Vol. 20. — № 2. — P. 140–145.
5. *Guerrerosantos J.* Long-term outcome of autologous fat transplantation in aesthetic facial recontouring: sixteen years of experience with 1936 cases // *Clin Plast Surg*. — 2000. — Vol. 27. — № 4. — P. 515–543.
6. *Leaf N., Zarem H.A.* Correction of contour defects of the face with dermal and dermal-fat grafts // *Arch Surg*. — 1972. — Vol. 105. — № 5. — P. 715–719.
7. *Sclafani A.P., Romo T., Jacono A.A., McCormick S., Cocker R., Parker A.* Evaluation of acellular dermal graft in sheet (AlloDerm) and injectable (micronized AlloDerm) forms for soft tissue augmentation. Clinical observations and histological analysis // *Arch Facial Plast Surg*. — 2000. — Vol. 2. — № 2. — P. 130–136.
8. *Titova A.T., Yarchuk N.I., Romyantseva V.V., Limberg A. A.* Contour plasty of the face using allogeneous fascia // *Acta Chir Plast*. — 1988. — Vol. 30. — № 2. — P. 94–104.
9. *Wellisz T.* Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant // *Aesthetic Plast Surg*. — 1993. — Vol. 17. — № 4. — P. 339–344.

Поступила 22.11.2004

УДК 616.36-002:616-097

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
СПЕКТРА АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С**

**С.В. Жаворонок, Е.В. Воропаев, Аль Шаби Аль Ханса,
В.М. Мицура, А.В. Воропаева**

Гомельский государственный медицинский университет

В соответствии с ГОСТом проведена разработка средств диагностики и контроля качества вирусного гепатита С, в основе которого лежит технология иммуноферментного анализа. Подготовлены технические условия на производство, программа и методика испытаний, проведены предварительные испытания иммуноферментных тест-систем для выявления антител к отдельным полипептидам вирусного гепатита С, а также стандартной национальной панели сывороток с различным содержанием антител к вирусному гепатиту С.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, вирусный гепатит, анти-НСV, синтетические полипептиды.

**METHODICAL APPROACHES TO CREATION DOMESTIC DIAGNOSTIC
THE TEST-SYSTEMS FOR REVEALING ANTIBODIES
TO INDIVIDUAL POLYPEPTIDES HCV**

**S.V. Zavoronok, E.V. Voropaev, Munasar Hani,
V.M. Mitsura, A.V. Voropayev**

Gomel State Medical University

In conformity with national standard, design of diagnostics and monitoring methods to qualifying control of virus hepatitis C according to the basis of ELISA technology. Creation of test

manual documentation, techniques of tests are prepared, preliminary researches in ELISA test-systems for revealing antibodies to individual polypeptides HCV, and also standard national panels with various contents antibodies HCV.

Key words: ELISA, virus hepatitis C, anti-HCV, synthetically polypeptides.

Вирусы связывались с воспалением печени, или гепатитом, начиная с 40–50-х годов прошлого века. Тогда идентифицировали и начали изучать два типа вирусов гепатитов: А и В. Но уже в то время было высказано предположение о третьем, неопознанном типе вируса, который обозначили как ни-А ни-В гепатит [9]. Идентифицирован же он был только в 1989 году и получил название вируса гепатита С (HCV). После этого и началось активное изучение HCV-инфекции, являющейся одной из причин развития хронических диффузных заболеваний печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Частота хронизации HCV-инфекции достигает 70–80%.

Для скрининговой диагностики HCV-инфекции наиболее широко практикуется определение анти-HCV антител методом иммуноферментного анализа (ИФА), который в последнее время не только используется достаточно широко, но и находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой — углубляются и совершенствуются методы самого анализа. Это приводит к тому, что упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов. Идет постоянный поиск все новых и новых ферментов, используемых в качестве маркеров [2, 1]. В то же время принципиальное значение имеет генодиагностика, основанная на детекции РНК HCV. Недавно появилась возможность обнаружения циркулирующих HCV-антигенов, в частности, Core Ag HCV [6, 5].

Проблема скрининговой диагностики вирусного гепатита С на ранних стадиях заболевания усугубляется тем, что в настоящее время определения только тотальных антител к HCV недостаточно. Известно, что в организации генома HCV выделяют две зоны, кодирующие структурные и неструктурные (функциональные) белки. К структурным белкам относят белки, кодируемые Core, E1 и E2 зонами РНК HCV. В неструктурной зоне РНК HCV выделяют участки, обозначенные как: NS2, NS3, NS4A, NS4B,

NS5A и NS5B. Большинство из белков, кодируемых неструктурными зонами РНК HCV, необходимы для репликации вируса.

Однако ряд индивидуумов не вырабатывают антитела на те или иные белки, против которых в норме наблюдается интенсивный гуморальный ответ, и потому продолжает увеличиваться количество больных, перенесших вирусные гепатиты бессимптомно. Это делает типичной ситуацию, когда поражение печени регистрируется в уже далеко зашедшей стадии — цирроза или даже первичного рака, при которых терапия этиотропными препаратами (интерферонами) практически бесполезна.

Учитывая, что HCV персистирует в крови больных острым и хроническим гепатитом С одновременно с анти-HCV, внимание разработчиков диагностических препаратов концентрируется на создании тест-систем для детекции антител, обеспечивающих максимально полное выявление носителей вируса и максимально ранние сроки диагностики острой инфекции. Многообразие антигенов и антигенных детерминант, кодируемых структурной и неструктурной зоной РНК HCV, определило направление в конструировании диагностических препаратов выбором и аранжировкой олигопептидов, применяемых для их создания. После масштабных испытаний диагностических средств с использованием ИФА на территории Российской Федерации приказом МЗ РФ № 322 от 21.10.2002. с 1 октября 2003 года регламентировано, какими именно диагностическими средствами необходимо проводить подтверждение HCV-инфекции: «запретить с 1 января 2004 года к применению диагностические тест-системы для подтверждения анти-HCV, содержащие неполный спектр структурных и неструктурных белков HCV».

Материалы и методы

Разработка комплекта НТД велась в соответствии с СТБ 1019–96 ГОСТ РБ «Разработка и постановка на производство медицинских изделий».

Контроль качества проводили с использованием тест-системы сравнения, в

качестве которой выступала ИФА тест-система фирмы Вектор-Бест, позволяющая проводить отдельное выявление антител к различным полипептидам HCV.

Для создания тест-системы для отдельного выявления антител к различным полипептидам вируса гепатита С нами были использованы рекомбинантные полипептиды, полученные в фирме «Капель» (г. Москва). Для сорбции использовались стрипованные полистироловые модифицированные планшеты фирмы «Биомедикал» (г. Москва). Модификацию, т.е. ультрафиолетовое облучение проводили бактерицидным облучателем в течение 30 минут.

Для сорбции использовались следующие синтетические полипептиды: область CORE — HCV 21 (0,5 мкг/мл) и 34 (1 мкг/мл), NS4 — HCV 6 (1 мкг/мл) и 645 (0,5 мкг/мл), NS5 — HCV 540 (1 мкг/мл); для области NS3 использовался рекомбинантный полипептид (0,1–0,2 мкг/мл) и синтетический HCV–93 (0,5 мкг/мл). Собранная таким образом диагностическая тест-система выявляла 1 b генотип HCV.

Сорбция полипептидов проводилась на физиологическом растворе, при комнатной температуре, на ночь, сушка на воздухе. Конъюгат: антитела против IgG человека, меченные пероксидазой хрена — фирм «Сорбент-сервис» и «Капель» (г. Москва).

На созданных тест-системах в общей сложности нами обследовано 70 больных ХГС, находившихся на стационарном лечении. Сыворотки крови этих больных исследовались методом ИФА на определение спектра антител к четырем белкам HCV (Core, NS3, NS4, NS5).

Проводилась качественная оценка результатов иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями по применению данных тест-систем. Оптическая плотность измерялась при длине волны 450 нм на автоматическом иммуноферментном анализаторе АИФ М/340 производства Витебского телевизионного завода.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы STATISTICA v.5.0, были применены метод вариационной статистики Фишера-Стьюдента, критерий χ^2 , непараметрический критерий Манна-Уитни.

Для модификации планшет в качестве источников ультрафиолетового излучения

применяли широко используемый облучатель бактерицидный потолочный ОБП-300 (ТУ 64-1-1445–78). В облучателе использовали две открытые газозарядные лампы низкого давления, излучающие УФ лучи (длина волны 253,7 нм).

Результаты и обсуждение

Вирусом гепатита С инфицировано 1% населения Республики Беларусь, что составляет около 100 000 человек, из которых около 10% имеют манифестные формы инфекции. В Российской Федерации частота обнаружения антител к антигенам HCV в сыворотках крови доноров составляет в среднем 2–4% [4]. На долю HCV приходится около 40% всех случаев хронического гепатита. В основном инфицированные — это молодые люди в возрасте 15–29 лет [8, 3, 7].

У большинства людей, перенесших вирусный гепатит С, иммунная система оказывается неспособной элиминировать вирус, что позволяет ему длительно реплицироваться в гепатоцитах и ряде других клеток. При этом пациенты имеют выраженный гуморальный и клеточный иммунный ответ как на структурные, так и на неструктурные белки вируса.

Важнейшей задачей создания качественных наборов является стандартизация технологических операций процесса изготовления изделия и, в первую очередь, стандартизация нанесения на поверхность лунок полимерных стрипов комбинаций синтетических полипептидов — аналогов антигенных детерминант вируса гепатита.

Иммобилизация чувствительного материала (синтетических полипептидов) в зависимости от природы носителя может быть выполнена либо посредством физической адсорбции, либо путем образования химической связи с поверхностью носителя.

Современные методы диагностики позволяют с высокой точностью выявлять HCV-инфекцию и следить за ее развитием, что дает возможность прогнозировать заболевание и своевременно назначать антивирусную терапию.

Характерным признаком гепатита С является отсроченная сероконверсия. Первые анти-HCV антитела удается обнаружить не ранее 5–12 недель после инфицирования, но сроки их появления могут удлиниться до 30–50 недель. Спектр антител достаточно сложен, отражая эпитопную

поливалентность HCV-антигенов. Динамика антител к различным антигенам (точнее их эпитопам) неодинакова, что имеет диагностическое значение.

Детекция антител к каждому из HCV-антигенов имеет самостоятельное диагностическое значение. Так, например, известно, что анти-Core, анти-E и анти-NS3 выявляются на самых ранних этапах сероконверсии, анти-NS4 и анти-NS5, как правило, появляются позднее. По мере развития инфекционного процесса титры выявляемых анти-HCV увеличиваются.

Таким образом, учитывая высокую чувствительность и специфичность метода ИФА, перспективность его применения для диагностики различных форм HCV-инфекции, индивидуальную вариабельность спектра антител к различным эпитопам вируса у больных HCV-инфекцией, отсутствие на рынке РБ широко доступных отечественных тест-систем, необходимость создания современной отечественной иммуноферментной тест-системы для определения спектра антител к основным эпитопам вируса гепатита С очевидна.

Разработанные диагностические препараты были апробированы с использованием сывороток крови больных хроническими вирусными гепатитами В и С, находившихся на лечении в инфекционных стационарах Гомельской и Витебской областей.

Отобран банк анти-HCV позитивных сывороток крови. Их дополнительный отбор в больших объемах — более 800 сывороток крови проводится на Гомельской областной станции переливания крови.

На основе этих банков крови изготовлены пулы сывороток содержащих анти-HCV в различных концентрациях, пулы стандартизованы на тест-системах производства фирмы Вектор Бест (Новосибирская область, п. Кольцово) и НПО «ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ» (Нижний Новгород) с использованием наборов стандартных образцов (СО) анти-HCV, разработанных в соответствии с международным стандартом NIBSC code 80/549 (для HBsAg) Государственным учреждением НИИ Эпидемиологии и Микробиологии Министерства Здравоохранения Республики Беларусь (НИИЭМ) с нашим участием.

На основе пулов сывороток изготовлен опытный образец панели стандартных сывороток, содержащих анти-HCV в 8 различных

концентрациях плюс две негативных по анти-HCV. При определении чувствительности тест-системы рекомендуется использовать все стандартные сыворотки, входящие в состав панели. Уровнем чувствительности тест-системы считается наименьшая концентрация панели, оцененная согласно инструкции по применению данной тест-системы как положительный образец в обеих лунках. Стандартизованные сыворотки были лиофилизированы, остаточная влажность составила не более 1,3%.

Заключение

В результате проведения предварительных внутрилабораторных испытаний было установлено, что по параметрам чувствительности и специфичности тест-система, созданная нами, практически полностью соответствует коммерческим иммуноферментным тест-системам, зарегистрированным в Республике Беларусь. Уточнённые данные по этим параметрам будут представлены после официальных медицинских испытаний, которые будут проводиться в соответствии с назначением Центра экспертиз и испытаний в здравоохранении Республики Беларусь.

При анализе выявляемого спектра анти-HCV у 98,3% больных хроническим гепатитом С выявлены антитела к CORE-белку, у 97,2% — антитела к NS3, у 96,0% — антитела к NS4, у 63,1% — антитела к NS5. У большинства обследованных больных ХГС (92,0%) одновременно выявлялись антитела к CORE, NS3 и NS4-белкам. Антитела анти-HCV IgM выявлены у 48,6% больных. При обнаружении анти-NS5 и анти-HCV IgM чаще выявлялся повышенный уровень АЛТ ($p = 0,047$ и $p = 0,011$ соответственно).

Таким образом, для подтверждения HCV-инфекции методом иммуноферментного анализа необходимо использовать диагностические системы 3-го и 4-го поколения, которые построены из всего спектра рекомбинантных и/или синтетических фрагментов структурных и неструктурных HCV-белков (Core, NS3, NS4 и NS5).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Виринская А.С., Гудков В.Г.* Разработка и совершенствование диагностических препаратов в отношении ротавирусной инфекции и вирусного гепатита А. — С. 120–127.
2. *Волосевич Н.Н., Владыко А.С.* Использование лизатов рекомбинантного и нативного пептидов вируса ЛХМ в иммуноферментном анализе. //

Проблемы инфекционной патологии XXI века. Материалы юбилейной конференции, посвященной 80-летию НИИЭМ (г. Минск 27–28 октября 2004 г.) / Под ред. проф., чл.-корр. НАНБ Л.П. Титова. — Мн.: НИИЭМ, 2004. — С. 110–119.

3. Соринсон С.Н., Селиванов Н.А., Корочкина О.В. и др. Гепатит С: механизмы многолетней персистенции вируса и фазы течения инфекционного процесса // Клиническая медицина. — 1997. — № 10 — С. 27–30.

4. Львов Д.К. Вирусные гепатиты С и G (Hepacivirus, Flaviviridae): этиотропная терапия // Вопр. вирусол. — 1998. — № 2. — С. 54–58.

5. Маянский А.Н., Обрядина А.П., Уланова Т.И. и др. Диагностика гепатита С: информационные материалы. — Н. Новгород, 2003. — 47 с.

6. Система диагностики диффузных паренхиматозных поражений печени у различных групп населения с повышенным риском инфицирования вирусными гепатитами В, С, D, G: Методические рекомендации. / С.В. Жаворонок, А.Л. Калинин, А.А. Ключарева и др. — Мн., 1998. — 52 с.

7. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. — СПб.: ТЕЗА, 1998. — 325 с.

8. Bukh J. The hepatitis C virus. American Association for the Study of Liver Diseases Post-graduate Course 2000, Update on Viral Hepatitis, October 27–28. — Dallas, Texas, 2000. — P. 102–111.

9. Sherlock S. December 1996. Hepatitis C Virus: a Historical Perspective. Digestive Diseases and Science 3S-5S.

Поступила 28.03.2005

УДК 575.1

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ СУММАРНОЙ ДНК ИЗ ПАТОГЕННЫХ И САПРОФИТНЫХ ГРИБОВ КЛАССОВ *ASCOMYCETES*, *BASIDIOMYCETES* И *DEUTEROMYCETES*

М.Я. Острикова, О.Ю. Баранов

Гомельский государственный медицинский университет
Институт леса

Предложен быстрый микрометод выделения препаратов суммарной ДНК из грибов родов *Candida*, *Aspergillus*, *Pleurotus* и *Lentinus*. Установлено, что полученные микропрепараты ДНК грибов характеризуются высокой степенью чистоты и отсутствием деградации.

Ключевые слова: ДНК, *Aspergillus*, *Candida*, *Pleurotus*, *Lentinus*

CHARACTERISTIC FEATURES OF ISOLATION OF TOTAL DNA FROM PATHOGENIC AND SAPROPHYTE *ASCOMYCETES*, *BASIDIOMYCETES* AND *DEUTEROMYCETES* FUNGUS

M.Ya. Ostriкова, O.Yu. Baranov

Gomel State Medical University
Institute of Forest

The micromethod of rapid preparation of DNA samples from fungi genus *Candida*, *Aspergillus*, *Pleurotus* и *Lentinus* have been developed. Showed, that prepared samples of DNA have high quality of clearness and no visual degradation.

Key words: DNA, *Aspergillus*, *Candida*, *Pleurotus*, *Lentinus*.

Введение

К настоящему времени методы анализа ДНК [2, 3, 4] нашли широкое практическое применение в различных областях медицины: изучение и определение врожденных заболеваний на различных стадиях онтогенеза; выявление и типировка инфекционных возбудителей *in vitro* и *in vivo*; исследование гено-

мов и классификация штаммов микроорганизмов [3, 5], используемых для получения лекарственных средств и др. Для большинства используемых технологий первоначальным этапом анализа является выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты из изучаемых объектов [1, 5]. Важным требованием, предъявляемым к стадии экстракции, является