

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ

Абдыкалыкова А.Н., Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова, биолого-географический факультет, гр. БТ-42, студент
(*Научный руководитель — к.б.н., профессор Погосян Г.П.*)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С МЕТОДАМИ ПЦР И ИФА

В настоящее время известно, что инфекции вирусной природы являются повсеместно выявляемыми и трудно диагностируемыми, сопровождаются тяжелыми осложнениями для организма человека. Одним из самых трудно излечиваемых и распространенных является вирус гепатита С, что обусловило выбор объекта данной работы [1, 2]. С целью выявления наиболее достоверного, чувствительного и специфичного метода определения вируса гепатита С проводили исследования, применяя методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА). Известно, что ПЦР обладает рядом преимуществ, которые в настоящее время сделали его наиболее достоверным методом для определения РНК HCV. Однако изолированное выявление РНК вируса гепатита С на фоне полного отсутствия каких-либо других серологических маркеров не может полностью исключить ложноположительный результат ПЦР. В таких случаях требуется всесторонняя оценка клинических, биохимических и морфологических исследований, в том числе определение антител к вирусу гепатита С /<http://www.gepatit.ru/gepatit-c-analysis/>.

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 /www.gepatit.com/c/infect.php /.

Большое значение при выявлении вируса гепатита С имеет определение количества копий РНК данного инфекционного агента [3,4]. Определение вирусной нагрузки проводится с применением количественной ПЦР - теста на концентрацию вируса (виремию) в крови.

Материалы и методы

Исследовали образцы сыворотки крови 43 пациентов с предварительным диагнозом «гепатит С». Для выделения ДНК использовали набор реагентов «Рибо-сорб», для постановки реакции обратной транскрипции «Ампилсенс - ОТ», амплификации – «?» (фирмы «Ампилсенс»). Репликацию кДНК проводили в аппарате (фирмы «ДНК-технология»). Анализ продуктов ПЦР проводили в детекторе «ALA «1/4».

Для поведения исследований сыворотки крови на обнаружение иммуноглобулинов классов G и M к вирусу гепатита С методом ИФА применяли набор реагентов «Вектор-Бест»

Методика проведения иммуноферментного анализа. Для приготовления растворов и проведения ИФА использовали свежееотобранные образцы сыворотки (плазмы) крови. Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, перед использованием центрифугировали 10-15 мин при 3000 об/мин – Перед постановкой реакции все компоненты набора выдерживали при комнатной температуре (18-25)°C 30 мин. После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковывали в пакет с осушителем и поместили в холодильник (2-8)°C. – Растворы ТМБ и конъюгата в рабочем разведении готовили непосредственно перед использованием. При промывке лунки (стрипа, планшета) заполняли полностью, не допуская переливания промывочного раствора через края лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. При приготовлении растворов и проведении ИФА использовали одноразовые наконечники для дозаторов.

Результаты и обсуждение

Для определения преимуществ двух методов выявления вируса гепатита С проводили эксперименты в октябре-ноябре 2016 года. За это время исследовали 43 образца сыворотки

крови пациентов с предположительным диагнозом «вирусный гепатит С». Определяли чувствительность и специфичность методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА). Методом ИФА выявляли суммарные антитела.

Первоначальные анализы проводили, используя метод ПЦР. Для этого из всех образцов сыворотки крови выделяли молекулы РНК. С целью получения к ДНК ставили реакции обратной транскрипции с применением фермента ревертазы. После постановки реакции амплификации определяли наличие нуклеиновых кислот на флуоресцентном анализаторе по свечению. В каждом исследовании применяли следующие виды контрольных образцов: отрицательный контрольный образец (ОКО), ВКО, ПКО. Результаты анализа показали, что из 43 образцов плазмы крови, с предполагаемым наличием ВГС, РНК искомого вируса методом ПЦР выявили в 13 образцах крови.

Последующие эксперименты проводили, анализируя сыворотки крови тех же пациентов, используя иммуноферментный анализ. Этот метод позволил выявить суммарные антитела в 30 случаях. Сравнивая результаты, полученные с применением двух методов анализа вируса гепатита С, обнаружили, что положительными в обоих тест-системах оказалось 13.

Определяя преимущества каждого из методов, учитывали выявление с помощью ПЦР непосредственно РНК вируса, а с использованием ИФА — антител, выделяемых в изучаемому вирусу. Известно, что антитела могут вырабатываться в организме человека в течение достаточно длительного времени после его окончательного выздоровления. Зная ряд преимуществ ПЦР, такие как актуальность ответа, проведение анализа в минимальном объеме, универсальность, невозможность инфицирования персонала, а также количество выявленных молекул нуклеиновых кислот вируса гепатита С, можно сделать вывод, что ПЦР является более специфичным методом. Однако нельзя полностью исключить использование метода ИФА, поскольку известны некоторые недостатки метода амплификации фрагментов ДНК.

Таким образом, при диагностике вируса гепатита С необходимо исследование сыворотки крови сначала методом иммуноферментного анализа, а затем для подтверждения — полимеразной цепной реакцией.

Литература:

1. Баширова Д.К. Клинико-иммунологические особенности течения хронического вирусного гепатита С при HCV-моноинфекции и HCV+HIV-коинфекции / Д.К.
2. Баширова О.М. Романенко, И.М. Хаертынова, А.П. Цибулькин Мир вирусных гепатитов. // Казанский медицинский журнал. – 2005. – Т. 86. – №2. – С. 142-149
3. Дьякова И.П. Особенности клинической картины и лечения HCV-инфекции. // Национальный институт здоровья США. - 2002. – №7-8. – С. 2-15
4. Кузина Л.Е. Сравнительная оценка результатов определения антител к вирусу гепатита С при использовании различных иммуноферментных тест-систем и подтверждающих тестов.
5. Ведерников В. Е. Количественное определение вируса гепатита С методом ПЦР в реальном времени и его генотипирование с использованием флуорогенных бинарных зондов: автореферат. – Новосибирск, 2011. – 224с.

Абеуова В.Д., Карагандинский государственный университет имени академика Е.А.Букетова, факультет математики и информационных технологий, гр. М-204, студент (Научный руководитель – к.п.н., доцент Шаяхметова Б.К.)

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ПЛОСКОЙ ТРИГОНОМЕТРИИ

Слово тригонометрия составилось из двух греческих слов: тригонон — треугольник и метрейн — измерять, и в буквальном переводе означает измерение треугольников.