

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ФИЛИАЛ «НАУЧНО – ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР САНИТАРНО –
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И МОНИТОРИНГА»
РГП НА ПХВ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОБЩЕСТВЕННОГО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ» МЗ РК

Г.Е. Нусупбаева, А.С. Муталиева, Н.Ж. Тлеумбетова

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА
ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ**

(методические рекомендации)

Алматы
2019

УДК:616,9

ББК:55.1

Н90

Рецензенты:

1. Сапарбеков М.К. – д.м.н., почетный профессор Казахстанского медицинского университета «Высшая школа общественного здравоохранения», председатель ассоциации общественного здоровья

2. Айкимбаев А.М. – д.м.н., профессор, консультант Филиала «Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ НЦОЗ МЗ РК

Авторы:

Нусупбаева Г.Е. – магистр общественного здравоохранения, заведующая Референс лабораторией по контролю за вирусными инфекциями

Муталиева А.С. – магистр медицинских наук, врач-вирусолог Референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями

Тлеумбетова Н.Ж. – врач-вирусолог Референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями

Н90. Молекулярно-генетическая диагностика парентеральных вирусных гепатитов: Методические рекомендации / Нусупбаева Г.Е., Муталиева А.С., Тлеумбетова Н.Ж. // Алматы: Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга, 2019. – 38 с.

ISBN 978-601-7541-78-1

Настоящие методические рекомендации описывают стандартные условия проведения преаналитического этапа полимеразно-цепной реакции в режиме «реального времени» (далее ПЦР), соблюдение которых поможет предупредить лабораторные ошибки в диагностике парентеральных вирусных гепатитов В, С и Д методом ПЦР, этапы ПЦР, требования к коммерческим тест- наборам ПЦР, преимущества ПЦР метода и его автоматизации.

УДК:616,9

ББК:55.1

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП «Республиканский центр развития медицинский науки и образования РГП РЦРЗ» №167 от «09» сентября 2019 года)

© Нусупбаева Г.Е., Муталиева А.С., Тлеумбетова Н.Ж., 2019

Содержание

Перечень сокращений, условных обозначений, символов	4
Понятия, используемые в методических рекомендациях	6
Введение	7
1. Преимущества метода ПЦР в режиме «реального времени» в диагностике парентеральных вирусных гепатитов	12
1.1. Основные требования к проведению метода ПЦР, этапы ПЦР	12
1.2. Требования к коммерческим тест-наборам ПЦР	13
2. Ограничения метода ПЦР	14
3. Преаналитический (долабораторный) этап диагностики парентеральных вирусных гепатитов методом ПЦР	14
3.1. Подготовка пациента к выполнению исследований	15
3.2. Получение, предобработка, хранение и транспортировка биоматериала в лабораторию	15
4. Методы молекулярно-генетической диагностики парентеральных вирусных гепатитов	18
4.1. Диагностика ВГВ методом ПЦР	19
4.1.1. Обнаружение ДНК ВГВ (качественное исследование)	22
4.1.2. Количественное определение ДНК ВГВ (вирусная нагрузка)	22
4.1.3. Определение генотипа ВГВ	24
4.2. Диагностика ВГС методом ПЦР.....	24
4.2.1. Обнаружение РНК ВГС (качественное исследование)	25
4.2.2. Количественное определение РНК ВГС (вирусная нагрузка)	25
4.2.3. Определение генотипа ВГС	26
4.3. Диагностика ВГД методом ПЦР	27
4.3.1. Обнаружение РНК ВГД (качественное исследование)	28
4.3.2. Количественное определение РНК ВГД (вирусная нагрузка)	28
5. Автоматизация этапов ПЦР посредством роботизации и программного обеспечения	29
6. Ошибки, встречающиеся при проведении ПЦР-диагностики	30
Заключение	34
Список использованных источников	36

Перечень сокращений, условных обозначений, символов

ВГ	- вирусный гепатит
ВГВ	- вирус гепатита В
ГВ	- гепатит В
ВГД	- вирус гепатита Дельта
анти-ВГД	- антитела к вирусу гепатита Д
ГД	- гепатит Дельта
ВГС	- вирус гепатита С
анти-ВГС	- антитела к вирусу гепатита С
ГС	- гепатит С
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ГЦК	- гепатоцеллюлярная карцинома
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	- иммуноферментный анализ
КК	- контроль качества
МЕ	- международных единиц
МР	- методическая рекомендация
НК	- нуклеиновая кислота
ОГВ	- острый вирусный гепатит В
ОГС	- острый вирусный гепатит С
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
УВО	- устойчивый вирусологический ответ
РВО	- ранний вирусологический ответ
ХВГ	- хронический вирусный гепатит
ХГВ	- хронический гепатит В
ХГС	- хронический гепатит С
HBcAg	- сердцевинный (ядерный) антиген вируса гепатита В
HBsAg	- поверхностный антиген вируса гепатита В

- анти-HBs** - антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В
- HBsAg** - е-антиген вируса гепатита В
- анти-HBe** - антитела к е-антигену вируса гепатита В
- HCVcAg** - сердцевинный антиген вируса гепатита С
- NAT** - тест для выявления нуклеиновых кислот
- WHO GHP** - Глобальная программа ВОЗ по борьбе с гепатитом

Понятия, используемые в методических рекомендациях

Виремическая стадия инфекции– инфекция, вызванная вирусом гепатита В или С, при которой вирус находится в крови. Виремия подразумевает наличие активной, продолжающейся или текущей инфекции;

Гепатоцеллюлярная карцинома– первичный рак печени, поражающий гепатоциты;

ДНК ВГВ– геномы ВГВ, которые можно обнаружить и подсчитать в клиническом материале (сыворотка, плазма крови, биоптат печени) с помощью тестирования на нуклеиновые кислоты;

Иммуноферментный анализ– лабораторный серологический иммуноанализ для определения антител, антигенов или их комбинации;

Критерии эффективности теста аналитическая чувствительность/предел обнаружения – наименьшая концентрация определяемого вещества в пробе, которая стабильно обнаруживается в 95% образцов при исследовании в обычных лабораторных условиях;

Латентная (скрытая) ВГВ–вариант ВГВ-инфекции, когда HBsAg не обнаруживается, однако выявляется ДНК ВГВ, хотя уровень виремии очень низкий (менее 200 МЕ/мл);

Пороговый цикл– цикл, на котором интенсивность флюоресценции начинает превышать базовый порог;

Пробы ДНК или РНК– выделенная рибонуклеиновая или дезоксирибонуклеиновая кислота из клинического материала на этапе экстракции ПЦР;

РНК ВГД– геномы ВГД, которые можно обнаружить и подсчитать в клиническом материале (сыворотка, плазма крови, биоптат печени) с помощью тестирования на нуклеиновые кислоты;

РНК ВГС – геномы ВГС, которые можно обнаружить и подсчитать в клиническом материале (сыворотка, плазма крови, биоптат печени) с помощью тестирования на нуклеиновые кислоты;

Тест для выявления нуклеиновых кислот – молекулярная технология, с помощью которой можно выявить очень низкие концентрации нуклеиновых кислот вируса (РНК или ДНК) как количественным, так и качественным способом;

Хроническая ВГВ – устойчивое обнаружение HBsAg в течение по крайней мере шести месяцев;

Хроническая ВГС – наличие в крови РНК ВГС или HCVcAg в сочетании с положительным результатом серологического исследования на антитела к ВГС.

Введение

Вирусные гепатиты – одна из ведущих причин смертности в мире, которой до недавнего времени не уделялось достаточного внимания как приоритетной проблеме общественного здравоохранения [1].

Вирусные гепатиты с парентеральным механизмом передачи, несмотря на их активное изучение и внедрение современных способов детекции, лечения и профилактики, продолжают оставаться одной из приоритетных задач здравоохранения во всех странах мира. Это связано не только их широкой распространенностью и высоким хронизирующим потенциалом, но и необходимостью совершенствования эпидемиологического и лабораторного надзора с учетом современных представлений о распространенности и эпидемиологических особенностях инфекций [2].

К вирусным гепатитам с парентеральным механизмом передачи возбудителя относятся вирусные гепатиты В, С и D, вызываемые вирусами ВГВ, ВГС и ВГД, соответственно. Эти вирусы играют важнейшую роль в возникновении хронических вирусных заболеваний печени.

Ежегодно на территории республики регистрируются более 6000 случаев впервые выявленных ВГ, из них на долю ХГВ приходится 48%, ХГС составляет 52%. Настораживает тенденция роста ХВГ, так в сравнении с 2009 годом отмечается рост заболеваемости в 3,4 раза. Рост ХВГ обусловлен за счет роста ХГС (Рисунок 1).

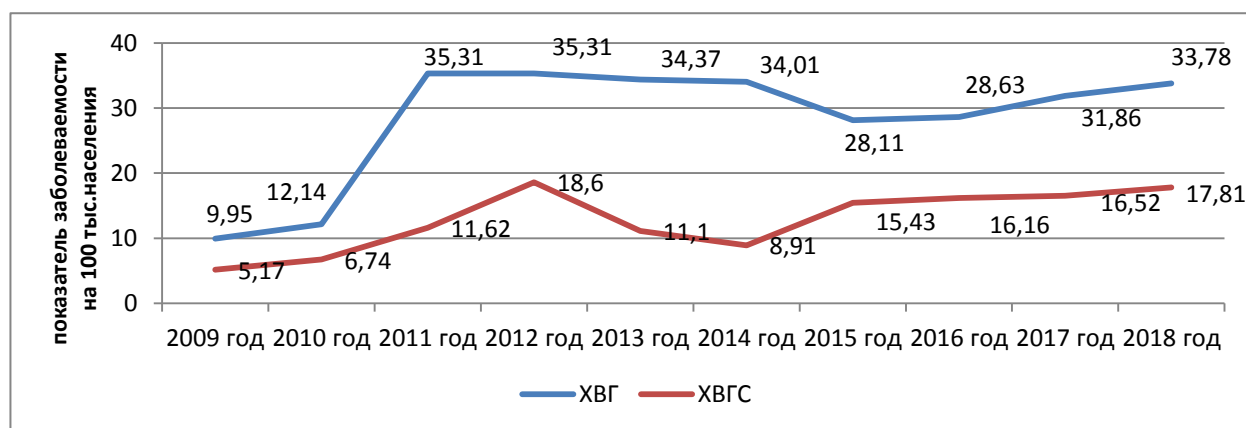


Рисунок 1 – Заболеваемость хроническими вирусными гепатитами, в том числе ХВГС в РК, за 2009-2018 гг.

Наиболее высокая заболеваемость хроническими формами вирусных гепатитов регистрируется в возрастной группе от 30 до 60 лет, это около 87%. Если придерживаться статистики, ежегодно более 200-300 человек физически активных и работоспособных, подвержены риску развития цирроза или рака печени (при ХГС риск развития цирроза и рака печени 1% -5%, при ХВГВ - 5% -20% развивают цирроз в течение периода 20-30 лет).

Проблема ВГВ остаётся одной из приоритетных в здравоохранении в связи с высокой частотой развития хронических форм болезни. Приблизительно у

одной трети населения Земли выявляются маркеры перенесенной инфекции ВГВ и у 350 млн. человек маркеры текущей хронической инфекции, характеризующейся широким спектром клинических вариантов и исходов заболевания - от неактивного носительства ВГВ с низким уровнем вирусемии до ХГВ с выраженной активностью и возможностью формирования неблагоприятных исходов, таких как цирроз печени и ГЦК. От цирроза печени и ГЦК ежегодно в мире погибает около 1 млн. человек. Конечные стадии прогрессирующего ХГВ являются причиной 5-10 % выполняемых ежегодно трансплантаций печени [3-9].

ВГС как относительно новая нозологическая форма, входит в число наиболее актуальных проблем эпидемиологии и гепатологии, что связано не только с ростом заболеваемости, но и высоким процентом развития хронических форм. В настоящее время, в мировом масштабе проблема ВГС, наиболее опаснее своими осложнениями, приобрела черты «молчаливой эпидемии». Это своеобразное выражение подчеркивает тот факт, что вирус, медленно и скрытно приводит к деструкции гепатоцитов печени или их злокачественной трансформации. Во многих случаях ВГС протекает бессимптомно, вплоть до развития цирроза печени и рака. По прогнозной оценке экспертов СДС в мире в ближайшие 10 лет ожидается увеличение количества инфицированных ВГС до 400-450 млн., больных циррозом печени почти в 5 раз, ГЦК - в 3 раза, смертности от заболевания печени – в 2,5 раз. Отметим, что подобный прогноз касается и нашей республики. Положение с гепатитом С усугубляется тем, что в Казахстане, как и во всем мире, отсутствуют вакцины для специфической профилактики. Но эффективная терапия гепатита С приблизилась к 100 %, что стало возможным благодаря появлению противовирусных препаратов прямого действия [10-12].

ВГД может инфицировать только тех людей, кто инфицирован ВГВ. Двойная инфекция ВГД и ВГВ может приводить к развитию более серьезной болезни и худшему результату. Безопасные и эффективные вакцины против ВГВ обеспечивают защиту от инфекции ВГД. По оценкам ВОЗ, в глобальном масштабе около 5 % людей с хронической инфекцией ВГВ также инфицированы ВГД, и это означает, что в общей сложности во всем мире ВГД инфицировано 15-20 миллионов человек. Тем не менее, это только приблизительная цифра, поскольку многие страны не ведут учета распространенности ВГД. Согласно данным Национального центра по контролю и профилактике заболеваемости (ЦКЗ), большинство случаев сочетанного инфицирования ВГВ и ВГД заканчивается выздоровлением, и только от 2,4 до 4,7 % взрослых, инфицированных одновременно ВГВ и ВГД, становятся носителями хронического гепатита и подвергаются риску серьезного поражения печени [13].

Лабораторная диагностика вирусных гепатитов, активно развивающаяся отрасль медицинской науки. На протяжении 50 лет, прошедших с открытия «австралийского антигена», открыты многочисленные вирусы, отвечающие за возникновение гепатитов. Многообразие серологических маркеров инфицирования, способы их выявления при помощи высокочувствительных и

специфичных методов открыли возможность не только этиологической расшифровки острого или хронического вирусного гепатита, но и проведение мониторинга лечения и вакцинопрофилактики.

Традиционно методы лабораторной диагностики ВГ делят на 2 группы: обнаружение вирусных антигенов и антител к ним и молекулярно-биологические методы детекции и анализа вирусных нуклеиновых кислот. Эволюционное развитие методической базы и диагностических препаратов в полной мере отразилось на лабораторной диагностике ВГ. Накопленные знания по этиологии и патогенезу этих инфекций человека служат основой современной диагностики. Вместе с тем, необходимо подчеркнуть, что данные обнаружения специфических маркеров инфицирования ВГ являются важной, но частью общей системы постановки диагноза.

Лабораторная диагностика ВГ является ключевым компонентом эффективного реагирования на эпидемию этих инфекций. Только современная специфическая лабораторная диагностика позволяет выявить заболевание на ранней стадии. Раннее выявление лиц с хронической ВГВ/ВГД или ВГС-инфекцией позволяет им получить необходимую помощь и лечение, предотвратить или затормозить прогрессирующее поражение печени. Тестирование также открывает возможности для привязки пациентов к вмешательствам, направленным на сокращение передачи инфекции путем проведения консультирования в отношении рискованных форм поведения, предоставления безопасных приспособлений (таких как стерильные иглы и шприцы), а также проведения вакцинации против ГВ.

Учитывая длительное развитие ВГ без клинических проявлений, лабораторные методы диагностики являются основными при выявлении заболевания. В настоящее время выявление лиц, инфицированных вирусными гепатитами, обеспечивается главным образом проведением скрининга населения. Применяемые методы является высокочувствительным и специфичным, но проблема ложных результатов анализа стоит и в настоящее время очень остро, уровень противоречивых и ложноположительных реакций с различными диагностическими препаратами может достигать 10-20 %.

В свою очередь качество лабораторных исследований обусловлено не только и не столько совершенством диагностических препаратов и наличием современного оборудования в лаборатории, сколько соблюдением всех правил проведения анализа, начиная с момента получения биологического образца и заканчивая интерпретацией его результата. На любом из этих этапов лабораторного исследования могут иметь место ошибки, которые будут влиять на окончательный результат анализа. Помимо того, что лабораторные ошибки чреваты потерей времени и средств на проведение повторных исследований, более серьезным следствием может стать неправильный диагноз. Это означает, что до 6 % пациентов станут получать неправильную терапию, которая может привести к ухудшению состояния здоровья пациента, а примерно 19 % пациентов будут назначены ненужные дополнительные исследования, подразумевающие удорожание и удлинение сроков лечения [14].

Другим важным аспектом контроля ВГ является надзор за инфекциями и их регистрация. ГД не регистрируются как самостоятельная нозологическая форма. Сведения о циркуляции вирусов ГД представляют ценность как для теоретической вирусологии, поскольку расширяют современные представления об эпидемиологии данных инфекций, так и для практического здравоохранения, так как помогают выявить группы риска и потенциальные источники инфицирования, а также указывают на необходимость внедрения и расширения диагностики ГД.

Полноценный эпидемиологический анализ, направленный на выявление источников и путей передачи инфекции, не возможен без анализа нуклеотидных последовательностей возбудителя. В силу большего числа случаев заболевания, географической удаленности и небольшого числа центров, способных проводить подобный анализ, оперативное применение методов молекулярной эпидемиологии при расследовании случаев гепатита является скорее исключением, чем правилом. Очевидно, что успешный контроль данной инфекции возможен только при создании обширной базы данных последовательностей вируса гепатита, циркулирующих на территории республики. Молекулярно-биологические методы позволяют детально охарактеризовать модельные инфекции и оценить возможности их применения в системе контроля вирусных гепатитов.

Для оптимизации контроля ВГВ диагностика данной инфекции должна строиться на одновременном определении ДНК ВГВ и HBsAg. На необходимость этого указывает существование случаев скрытой HBsAg-негативной инфекции, распространенность которой достигает 2 % даже при применении тестов для определения HBsAg с чувствительностью 0,01 нг/мл. Основной причиной развития скрытой формы ВГВ-инфекции является не наличие мутаций в детерминанте HBsAg, а низкий уровень вирусной репликации и продукции HBsAg.

Частота выявления мутаций, связанных с первичной лекарственной устойчивостью ВГВ, составляет 6,2 % среди пациентов с ВГВ-моноинфекцией и 10 % – среди пациентов с ВГВ/ВИЧ-коинфекцией. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения исследований на лекарственную устойчивость ВГВ до начала противовирусной терапии для выбора адекватного препарата.

Перечисленные нерешенные проблемы в системе контроля инфекций, вызываемых гепатотропными вирусами, определили актуальность настоящей разработки данных методических рекомендаций.

В настоящее время лабораторная диагностика парентеральных вирусных гепатитов осуществляется как в государственных медицинских лабораториях, так и лабораториях частного сектора, что затрудняет получение единой информации о результатах исследования и соответственно о качестве проведенных лабораторных исследований. Расхождение клинико-эпидемиологических диагнозов с данными серологических и молекулярно-биологических исследований является следствием применения в лабораториях разных методик диагностики вирусных гепатитов.

Отсутствие нормативных документов по молекулярно-генетическим и серологическим исследованиям в республике приводит к тому, что лаборатории предоставляют не достоверные результаты пациентам и лечащим специалистам и соответственно пациенту могут назначить не корректное лечение, что в свою очередь может привести к фатальным последствиям.

Разработанные методические рекомендации позволят унифицировать молекулярно-генетические методы исследований при диагностике вирусных гепатитов. Описанные в методических рекомендациях предполагаемые ошибки на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах полимеразно-цепной реакции позволят специалистам не допускать и выявлять ошибки приводящие к получению ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а также даст понимания при анализе и интерпретации полученных результатов. Кроме того, приведенный алгоритм диагностики вирусных гепатитов позволит специалистам лаборатории правильно интерпретировать полученные результаты, что позволит выявить заболевших, предотвратить распространение вирусных гепатитов, определить схему лечения. Правильная интерпретация их сочетаний позволит врачам быстро оценить результаты исследований и назначить лечение. Кроме этого, правильно выбранный алгоритм позволит более рационально и адекватно проводить исследования, а также обеспечит доступность населения к высокочувствительной подтверждающей методике, зачастую недоступной для населения в виду высокой стоимости.

1. Преимущества метода ПЦР в режиме «реального времени» в диагностике парентеральных вирусных гепатитов

Молекулярно-генетические методы, в частности полимеразно-цепная реакция в режиме «реального времени» (ПЦР), являются наиболее точным методом диагностики парентеральных вирусных гепатитов, которые позволяют:

- обнаружить ДНК ВГВ и РНК ВГС/ВГД (в крови или биоптате печени);
- определять концентрацию (вирусную нагрузку) ДНК ВГВ и РНК ВГС, ВГД в крови;
- определять генотип ВГВ, ВГС.

ПЦР позволяет обнаружить ДНК/РНК вируса посредством распознавания специфичного участка вирусного генома, который затем подвергается амплификации. Благодаря этапу амплификации становится возможным обнаружить в исследуемом образце такие низкие концентрации вируса, которые не всегда определяются при обычном исследовании. В свою очередь, это существенно увеличивает чувствительность метода, решает проблему серологического окна и неспецифических реакций ИХЛА и ИФА.

В отличие от серологической диагностики метод ПЦР обычно используется для обнаружения самого вируса и установления, является ли инфекция активной и принесет ли пользу противовирусная терапия.

Кроме того, применение этого метода позволяет определить, когда следует прекратить противовирусную терапию (в связи с отсутствием ответа на лечение или резистентности к нему (ВГВ)), а также подтвердить излеченность от вируса или его эффективное подавление (ВГС).

1.1. Основные требования к проведению метода ПЦР, этапы ПЦР

ПЦР исследование должно проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП «Санитарные-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества», утвержденные приказом Министерства здравоохранения РК № 684 от 8 сентября 2017 г.

Для проведения ПЦР в режиме «реального времени», необходимо наличие специализированного оборудования, соблюдение строгих требований к лабораторным условиям постановки реакций и технике сбора образцов, а также наличие высококвалифицированных сотрудников, способных провести прецизионные измерения и не допустить риска контаминации.

Основные принципы организации работы ПЦР-диагностических лабораторий, требования ПЦР и ошибки при постановке ПЦР анализа отображены в методических рекомендациях «Метод полимеразной цепной реакции в диагностике вирусных инфекций», утвержденные приказом Председателя КГСЭН МЗ РК № 315 от «25» декабря 2012 г.

Диагностика парентеральных вирусных гепатитов методом ПЦР состоит из следующих этапов:

1. Экстракция ДНК ВГВ и РНК ВГС/ВГД из исследуемых образцов;
2. Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
3. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»;
4. Анализ и интерпретация результатов.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК/РНК, выделенные из клинического материала (плазма, сыворотка крови и биоптат печени) пациента [15]. Для экстракции ДНК/РНК из исследуемых образцов и проведения амплификации используются коммерческие тест-наборы ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Процедура экстракции (выделение) ДНК/РНК из исследуемых образцов и проведения амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, проводится в соответствии с инструкцией к тест-набору. По окончании выполнения программы амплификации, необходимо приступить к анализу и интерпретации результатов. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ/ВГС/ВГД. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t в соответствующей графе в таблице результатов. Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения C_t), сомнительным во всех других случаях. Граничные значения C_t указаны во вкладыше к тест-набору. Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты прохождения контрольных образцов в соответствии с данными оценки результатов контрольных реакций.

1.2. Требования к коммерческим тест-наборам ПЦР и их транспортировке

Тест-наборы ПЦР должны отвечать минимальным критериям приемлемости в соответствии с преквалификацией ВОЗ применительно к средствам для диагностики *in vitro* (IVD) или в соответствии с результатами строгой нормативной оценки IVD. Все IVD следует использовать с соблюдением инструкции изготовителя и, при возможности, в учреждениях, участвующих в схемах национальной или международной внешней оценки качества [16]. Согласно требованиям Кодекса «О здоровье народа и системе

здравоохранения» (статьи 71,75) от 18.09.2009 г., тест-наборы ПЦР должны обладать высокой чувствительностью, должны иметь регистрационное удостоверение казахстанского образца и инструкцию. В соответствии с приказом МНЭ РК № 76 от 04.02.2015 г. «Правила хранения, транспортировки и использования профилактических препаратов», транспортировка тест-набора ПЦР, поставщиком, должен осуществляться в термоконтейнерах с хладоэлементами или в специальном транспорте, оборудованном холодильником при температуре от плюс 2°C до плюс 8°C в максимально сжатые сроки, но не более 48 часов с момента их загрузки. Термоконтейнер с тест-набором должен иметь маркировку с указанием типа, температуры хранения, требуемой для сохранности их качества. В термоконтейнер должны быть вложены термоиндикаторы. При приеме тест-набора, проверяются показатели соответствующих термоиндикаторов, вложенных в термоконтейнеры, на которых указывается дата поступления.

2. Ограничения метода ПЦР

1. Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.

Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Обычно этот интервал составляет 4-8 недель.

2. Возможность перекрестной реакции.

Подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме данного и сходных микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа.

3. Изменчивость микроорганизмов.

Хотя при конструировании тест-системы фрагмент генома, используемый для амплификации, выбирается из высоко консервативной области, изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке генома, и, таким образом, становиться неуловимыми данной тест-системой.

3. Преаналитический (долабораторный) этап диагностики парентеральных вирусных гепатитов методом ПЦР

Преаналитический (долабораторный) этап – является одним из важнейших мероприятий обеспечения качества лабораторного анализа. Значительная часть этого этапа проходит вне лаборатории, поэтому один из самых эффективных способов устранения ошибок – хороший контакт и совместная работа с врачами-инфекционистами и гепатологами.

Главная задача диагностической лаборатории состоит в том, чтобы обеспечить врача-инфекциониста или гепатолога информацией, необходимой для лечения больного. Такая информация предоставляет ценность, только если она точна, соответствует клинической ситуации и правильно используется врачом при принятии решений. Сложность организации преаналитического этапа в диагностической лаборатории любого типа во многом обусловлена тем, что здесь преобладает ручной труд и тем, что многочисленный персонал, обслуживающий пациента на этом этапе, имеет разноплановое подчинение.

3.1. Подготовка пациента к исследованиям

Подготовка пациента к исследованиям одна из важнейших составляющих преаналитического этапа. От пациента требуют соблюдения следующих правил:

- анализ крови сдают с утра;
- перерыв между последним приемом пищи и сдачей крови должен составлять 12 часов;
- за 2-3 дня до анализа нужно отказаться от жареной и жирной пищи, и алкоголя.

3.2. Получение, предобработка, хранение и транспортировка биоматериала в лабораторию

Лабораторная часть преаналитического этапа начинается с момента доставки пробы и заявки в лабораторию. Выделяют следующие этапы:

- организация приема проб и заявок (регистрация проб пациента);
- идентификация проб, центрифугирование;
- при необходимости условия и сроки хранения проб до анализа;
- выявление влияний (гемолиз, липемия) и примесей (метаболиты лекарств, загрязнения);
- распределение проб по рабочим местам, выполнение исследования;

При поступлении материала в лабораторию лаборант проверяет соответствие проб направлениям, состояние проб, время взятия и доставки материала. Специалистом лаборатории должны быть определены и утверждены критерии отказа в приеме материала на исследование (например, расхождение между данными заявки и этикетки на пробирке, невозможность прочесть заявку, материал взят не с тем антикоагулянтом или консервантом, превышение сроков доставки, наличие сгустков в цельной крови с антикоагулянтом и прочее). После центрифугирования наиболее частые критерии отказа – гемолиз, мутность пробы. Рекомендуемым материалом для исследования парентеральных вирусных гепатитов является плазма периферической крови. Возможно проведение анализа других видов клинического материала (сыворотка, биоптат печени).

ВАЖНО! Сыворотку допустимо использовать только для качественного выявления вирусов гепатитов в случае невозможности получения плазмы.

Важно помнить, что клиническая чувствительность набора реагентов ввиду осаждения вирусных частиц при ретракции сгустка может быть существенно снижена.

Транспортировку клинического материала и предобработанных проб осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом. В таблице 1 приведены характеристики этапов получения, предобработки, хранения и транспортировки биоматериалов в лабораторию.

Таблица 1 - получение, предобработка, хранение и транспортировка биоматериала в лабораторию

Вид клинического материала	Взятие (забор) материала ¹	Предобработка материала	Хранение и транспортировка материала
Сыворотка крови ²	Забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой ³ с использованием вакуумной системы в одноразовые стерильные вакуумные пробирки без геля (красная крышка) и с гелем (желтая крышка) с активаторами свертывания (кремнезем и/или тромбин).	После взятия пробы крови в одноразовые стерильные вакуумные пробирки, ее следует перемешать путем переворачивания 5–6 раз для лучшего контакта с активатором свертывания. Затем центрифугируют при 3500 об./мин в течение 10 мин при 25°C. Прежде чем центрифугировать пробирки с сывороткой, необходимо дождаться полного свертывания крови.	<ul style="list-style-type: none"> • при температуре 2–8 °C — в течение 5 суток; • при температуре минус 20 °C — в течение года; • при температуре минус 70 °C — длительно.
Плазма крови ²	Забор крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой ³ в одноразовые стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом (жемчужно-белая крышка –	При использовании одноразового шприца: пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом ⁴ (в	<ul style="list-style-type: none"> • при температуре 2–8 °C — в течение 5 суток; • при температуре минус 20 °C — в течение года; • при температуре минус

	<p>К2ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% ный раствор цитрата натрия в соотношении 1:9).</p>	<p>противном случае кровь свернется, и выделение ДНК/РНК станет невозможным). Затем центрифугируют при 3000 об./мин в течение 20 минут при 25°С. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (одноразовыми пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки^б объемом 1,5 или 2,0 мл; При использовании вакуумной системы, вакуумную пробирку, следует перемешать путем переворачивания 8-10 раз для лучшего контакта с антикоагулянтом. Затем центрифугируют при 3500 об./мин в течение 10 мин при 25°С.</p>	<p>70 °С — длительно.</p>
<p>Биоптат печени</p>	<p>Биоптат печени забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции. Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки объемом 2 мл, содержащих физиологический раствор или соответствующую транспортную среду.</p>	<p>Микробиоптат печени, помещенные в микропробирки с закручивающимися крышками или в пробирки объемом 1,5 мл с защелкой, содержащие 0,1 мл транспортной среды, предобработки не требуют. Макробиоптаты - кусочки ткани массой 0,1-1 г помещают в охлажденную фарфоровую ступку и добавляют</p>	<ul style="list-style-type: none"> • при комнатной температуре – в течение 6 часов; • при температуре 2-8 °С – в течение 3 суток; • при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели; • при температуре минус 70 °С – длительно.

	Пробирку плотно закрывают.	охлажденный изотонической раствор хлорида натрия объемом 0,5-1 мл. Измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1-0,2 мл) стерильным наконечником с фильтром в стерильные микропробирки ⁵ .	
--	----------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

ВАЖНО!

1. Осуществлять взятие клинического материала, строго следуя инструкции, только стерильными одноразовыми инструментами в стерильные одноразовые флаконы, пробирки, контейнеры. Работать в одноразовых перчатках;

2. Допускается только однократное замораживание (в противном случае происходит разрушение нуклеиновых кислот) и оттаивание материала, поэтому образцы плазмы или сыворотки для длительного хранения желательно разлить небольшими (0,1 – 0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл;

3. В зависимости от возраста пациента и размера вены, размер иглы может варьировать от 0,7x25 мм до 0,9x38 мм.

4. Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя;

5. Использовать пробирки только с маркировкой «DNase-, RNase-free».

4. Методы молекулярно-генетической диагностики парентеральных вирусных гепатитов

- методы обнаружения (качественная оценка) ДНК или РНК (ПЦР);
- методы количественной оценки (определение нагрузки вируса) ДНК или РНК (ПЦР);
- определение генотипа (ПЦР);
- определение чувствительности к противовирусным препаратам (секвенирование);

4.1. Диагностика ВГВ инфекции методом ПЦР

Первичная диагностика ВГВ традиционно строится на выявлении в сыворотке крови больного HBsAg, а не на определении ДНК ВГВ, что связано с существованием случаев выявления HBsAg при отрицательном результате теста на ДНК ВГВ. Действительно, продукция «пустых» частиц HBsAg на несколько порядков превышает продукцию зрелых вирионов, содержащих вирусную ДНК [17]. Однако с внедрением чувствительных тестов для выявления ДНК ВГВ, позволяющих выявлять вирусную ДНК в концентрациях менее 1000 копий/мл, ситуация изменилась кардинальным образом. Стало очевидно, что существует значительное количество случаев ВГВ-инфекции, ускользающих от диагностики при тестировании на HBsAg, но сопровождающихся присутствием в крови вирусной ДНК.

Существует ряд причин, по которым в ткани печени или сыворотке крови HBsAg-негативных пациентов может выявляться ДНК ВГВ:

1. Невозможность детекции HBsAg по причине низкого уровня его экспрессии в фазе «серологического окна» ВГВ-инфекции;
2. Низкий уровень вирусной репликации у людей с хронической ВГВ-инфекцией, связанный с иммунным ответом хозяина или интерференцией с другими вирусами (например, ВГС, ВИЧ);
3. Наличие мутаций в участках генома вируса, кодирующих эпитопы HBsAg, определяемые в тест-системах, а также мутаций, связанных с угнетением вирусной репликации;
4. Нахождение HBsAg в составе иммунных комплексов;
5. Интеграция вирусной ДНК в геном гепатоцитов, сопровождающееся снижением репликативной активности ВГВ.

Скрытая ВГВ-инфекция нередко регистрируется у пациентов в фазе «серологического окна», предшествующей появлению анти-HBs. В этот период концентрация HBsAg в крови опускается ниже предела чувствительности тест-систем иммуноферментного анализа (ИФА), а анти-HBs еще не выявляются. Технически такие случаи подпадают под определение «скрытой» ВГВ-инфекции, однако в последнее время в публикациях по данной теме истинно скрытой считается ВГВ-инфекция, длительное время сохраняющая свой серологический профиль (отсутствие HBsAg при наличии ДНК ВГВ в сыворотке крови и/или ткани печени) [18]. Наиболее часто формирование скрытой ВГВ-инфекции связывают с низким уровнем вирусной репликации и малым содержанием HBsAg в сыворотке крови. Причин для этого может быть несколько. Известно, что частота спонтанного исчезновения HBsAg в крови у пациентов с ХГВ составляет примерно 0,7–1,3 % в год, что нередко сопровождается сероконверсией и выработкой анти-HBs [19]. Согласно классическим представлениям о течении ВГВ-инфекции, исчезновение HBsAg и выработка анти-HBs соответствуют критериям выздоровления, однако позднее было показано, что у таких пациентов даже при отсутствии сывороточных маркеров ВГВ-инфекции ДНК вируса может выявляться в ткани печени на протяжении всей жизни [20]. Весомым аргументом в поддержку

снижения уровня вирусной репликации как основного фактора, обуславливающего формирование скрытой ВГВ-инфекции, является исследование, проведенное М. Насс и соавт., в ходе которого производилось трансфецирование клеток NuH-7 клонированными последовательностями ВГВ, выделенными от пациентов со скрытой ВГВ-инфекцией. Авторы наблюдали ингибирование репликативной активности вируса, а также снижение экспрессии HBsAg к клеточной культуре. Анализ последовательностей показал присутствие мутаций, обуславливающих нарушение инкапсидации вирусной пгРНК и синтез ДНК ВГВ, а также мутаций, вызывающих нарушение экспрессии pre-S2/S и HBsAg [21].

О возможной связи скрытой ВГВ-инфекции с интерференцией, вызванной коинфекцией другими вирусами, свидетельствует высокая частота HBsAg-негативной инфекции у пациентов с коинфекцией ВГВ/ВГС. Оба вируса имеют общие пути передачи, и коинфекция встречается достаточно часто, особенно в высокоэндемичных областях и в группах риска. I. Сассиола и соавт. были опубликованы данные обследования сывороток крови и биоптатов печени, взятых от 200 пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС), а также от 50 пациентов, не имевших серологических маркеров ВГВ и ВГС. Скрытая ВГВ-инфекция была выявлена у 33 % пациентов с ХГС и 14 % пациентов без ХГС [22].

По сравнению с моноинфекцией ВГВ у людей, инфицированных одновременно ВГВ и ВГС, HBsAg появляется позже и детектируется в сыворотке крови в течение меньшего времени. Вирусная нагрузка ВГВ в сыворотке крови ниже, как и уровни АЛТ. Кроме того, было показано, что core-белок ВГС ингибирует репликацию ВГВ и экспрессию его генов, однако это наблюдение недавно было поставлено под сомнение Р. Bellecave и соавт., которые показали возможность репликации обоих вирусов *in vitro* на культуре клеток NuH7 без признаков взаимного ингибирования [23]. Другая возможная причина формирования скрытой ВГВ-инфекции – наличие в геноме вируса мутаций, обуславливающих невозможность выявления HBsAg при помощи тест-систем ИФА – так называемых мутаций иммунного бегства. Наиболее хорошо описанной из таких мутаций является замена глицина на аргинин в 145-й аминокислотной позиции α -детерминанты S-гена ВГВ (G145R) [24]. Показано, что G145R сохраняется в доминантной популяции ВГВ в течение нескольких лет, поскольку вирус, имеющий в геноме данную мутацию, сохраняет способность к репликации, обладает инфекционными и патогенными свойствами (по результатам экспериментального заражения шимпанзе). Эпидемиологические исследования показали, что вариант G145R является наиболее распространенным мутантом ВГВ, наблюдаемым как в естественной среде, так и в когортах людей после вакцинопрофилактики и терапии специфическим анти-ВГВ-иммуноглобулином [25]. Для объяснения причин развития скрытой ВГВ-инфекции, помимо очевидных случаев серологического окна или присутствия мутаций иммунного бегства, четкой концепции пока не предложено. Основными механизмами развития скрытой ВГВ-инфекции считаются накопление в популяции вируса мутаций, связанных с

посттранскрипционным процессингом поверхностного белка и его секрецией, либо мутаций, связанных с угнетением вирусной репликации, а также особенности иммунной системы хозяина, приводящие к неполной элиминации вируса из организма в ходе естественного разрешения ХГВ [26].

Вероятность выявления скрытой ВГВ-инфекции значительно повышается, если детекция ДНК ВГВ проводится не в сыворотке или плазме крови, а непосредственно в гепатоцитах, однако молекулярное исследование биоптатов печени, особенно у пациентов без выраженной патологии печени, проводится достаточно редко. I. Castillo и соавт. [27] определяли ДНК ВГВ и РНК ВГС в образцах биопсии печени 76 серонегативных по ГВ пациентов со стабильным повышением уровня АЛТ, наблюдавшихся в течение 2 лет. В указанной группе пациентов у 22 % была выявлена скрытая ВГВ-инфекция, у 46 % – ВГС, у 32 % – скрытая коинфекция обоими вирусами. Таким образом, 54 % пациентов имели ДНК ВГВ в ткани печени, что свидетельствует о необходимости учитывать возможность наличия скрытой ВГВ-инфекции у большого количества пациентов с гепатитом неясной этиологии или ВГС-инфекцией. В другом исследовании скрытая ВГВ-инфекция обнаруживалась в ткани печени у 16,3 % из 98 пациентов, не имеющих каких-либо клинических или биохимических признаков заболевания печени, при этом у большинства таких пациентов (62,5 %) выявлялись анти-НВс [28].

В связи с вышеприведённым данным литератур по диагностике вирусных гепатитов, применение метода ПЦР для диагностики ВГВ является крайне важным. В настоящее время во всем мире разработаны и внедрены в клиническую практику надежные молекулярно-генетические методы, в частности, ПЦР, позволяющая выявить ДНК ВГВ в крови, в ткани печени и в других тканях организма. Наличие ДНК ВГВ в сыворотке крови, лимфоцитах, клетках печени указывает на репликацию НВV, являясь иногда единственным маркером в случае ее особой формы - скрытой ВГВ-инфекции. Индикация ВГВ ДНК также позволяет диагностировать гепатит, вызванный мутантными штаммами ВГВ, при которых не выявляются другие маркеры - НВеAg-антиген, НВs-антиген и т.д. Исследование крови на наличие антигенов и антител в сочетании с молекулярно генетическими методами в динамике болезни позволяет не только констатировать наличие ВГВ-инфекции, но и различать острую инфекцию (НВsAg в сочетании с анти-НВсIgM) от хронической (НВsAg в сочетании с анти-НВсIgG), судить о выздоровлении и сформировавшемся протективном иммунитете (анти-НВs более 10 МЕ/л), регистрировать сероконверсию- НВеAg/анти-НВе), выявить виремию (наличие ДНК НВV в крови), определить форму ХГВ (НВеAg-негативный или НВеAg позитивный), судить об эффективности проводимой терапии.

ПЦР позволяет определять в исследуемом материале ДНК ВГВ как качественно, так и количественно. ПЦР при ВГВ безусловно необходим для суждения о вирусной репликации. Вирусную ДНК в сыворотке крови обнаруживают у 50% больных при отсутствии НВеAg. Выявление ДНК ВГВ в крови имеет большое значение для прогноза острого ВГВ. Установлено, что персистирование ДНК ВГВ более 8 недель после дебюта заболевания указывает

на хронизацию процесса, тогда как элиминация ДНК вируса в течение первых 2 недель болезни коррелирует с полным выздоровлением.

4.1.1.Обнаружение ДНК ВГВ (качественное исследование)

Качественное исследование ВГВ в клиническом материале (сыворотка, плазма, биоптаты печени) подтверждает, наличие вируса в организме больного и тем самым устанавливает патогенез заболевания. Обнаружение ДНК ВГВ является важнейшим анализом, который в совокупности с другими лабораторными исследованиями позволяет диагностировать инфекцию, определять характер инфекционного процесса, выступать в качестве критерия в проведении терапии и оценки ее эффективности. ДНК ВГВ начинает обнаруживаться в крови в среднем через месяц после инфицирования и является первым диагностическим маркером ВГВ, опережая появление HBeAg на 10-20 дней [29].

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из сыворотки/плазмы крови. Качественное определение ДНК ВГВ, проводится с помощью высокочувствительной количественной (или качественной и количественной) ПЦР с нижним лимитом определения менее 15 МЕ/мл на анализаторах с автоматической подготовкой проб в режиме реального времени, с использованием тест-систем с высоким уровнем аналитической надежности [30]. Процедура определения ДНК ВГВ проводится в соответствии с инструкцией к тест-набору.

4.1.2. Количественное определение ДНК ВГВ (вирусная нагрузка)

Количественный метод определения концентраций ДНК ВГВ в сыворотке или плазме крови позволяет, во-первых, проводить мониторинг противовирусной терапии и оценивать ее эффективность, во вторых, прогнозировать исход хронического гепатита, поскольку в крупных когортных исследованиях показана прямая связь между высокой вирусной нагрузкой ВГВ (более 10⁴ копий/мл) и вероятностью прогрессирования заболевания в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) [31]. Оптимальным методом измерения вирусной нагрузки ВГВ является количественное определение вирусной ДНК ВГВ в сыворотке и/или плазме крови ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Определение концентрации ДНК ВГВ позволяет дифференцировать хронический HBeAg-негативный гепатит и стадию неактивного носительства (ДНК ВГВ <2000 МЕ/мл), проводить мониторинг ответа на противовирусную терапию на основании изменений вирусной нагрузки, отслеживать возникновение резистентных к терапии вариантов вируса, на которое указывает повышение уровней ДНК ВГВ. Стандартизованные количественные тесты являются важным инструментом мониторинга вирусной нагрузки при противовирусной терапии. Применение количественных тестов на ДНК ВГВ ранее было затруднено вследствие отсутствия стандартизации, однако в настоящее время доступны стандарты ВОЗ для ДНК ВГВ. В настоящее время

отсутствует консенсус по значению вирусной нагрузки, ниже которого уровень ДНК ВГВ указывает на «неактивное» носительство инфекции, а также по пороговому значению, указывающему на необходимость терапии. Однако ВОЗ рекомендует начинать противовирусную терапию для пациентов старше 30 лет, имеющих постоянно повышенные уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ) и вирусную нагрузку $>20\ 000$ МЕ/мл [32]. HBeAg является суррогатным маркером виремии, однако наличие анти-HBe не обязательно указывает на прекращение репликации вируса.

Стандартизация количественных методов определения ДНК ВГВ в сыворотке крови привела к появлению МЕ. МЕ не отражают истинного количества вирусных частиц (копий ДНК) в образце плазмы крови в зависимости от используемой тест-системы 1 МЕ/мл соответствует различному содержанию вирусных частиц (2-7 копий/мл). Если соотношение копии/МЕ для тест-системы не определено, для ориентировочного пересчета принято использовать усредненный коэффициент, равный 5 (1 МЕ=5 копий вирусной ДНК). Таким образом, 100000 копий/мл (105 копий/мл) равняются приблизительно 20000 МЕ/мл (2×10^4 МЕ/мл). На современном этапе для выявления ДНК ВГВ в крови наиболее перспективным является использование тест-систем на основе ПЦР с детекцией сигнала в режиме реального времени. Такие тест - системы как правило обладают оптимальными аналитическими характеристиками: наиболее широким линейным диапазоном измерений (для количественной оценки вирусной нагрузки) от 10-100 МЕ/мл до 10^8 - 10^{10} МЕ/мл, высокой аналитической чувствительностью (10-100 МЕ/мл) и специфичностью. Вирусная нагрузка измеряется в МЕ на мл (МЕ/мл). Соотношение между ранее использовавшимися единицами (копиями) и МЕ в тест-наборах разных производителей может быть различным - от 1,5 до 8 (при отсутствии данных о коэффициенте принято использовать усредненное значение 5, т.е. 1 МЕ=5 копий).

Для определения вирусной нагрузки ДНК ВГВ используется тест-набор, предназначенный для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Процедура определения вирусной нагрузки ВГВ проводится в соответствии с инструкцией к тест- набору. Большинство современных тест-наборов для количественного определения ДНК ВГВ основаны на ПЦР в режиме «реального времени» и имеют широкий линейный диапазон измерений – от 6-10 000 000 МЕ/мл. При получении значения выше линейного диапазона образец может быть перетестирован после 10-кратного разведения; полученный результат умножают на 10. Количественное определение ДНК ВГВ, проводится с помощью высокочувствительной количественной ПЦР с нижним лимитом определения менее 15 МЕ/мл на анализаторах с автоматической подготовкой проб в режиме реального времени, с использованием тест-систем с высоким уровнем аналитической надежности [30].

4.1.3. Определение генотипа ВГВ

Генотип ВГВ является фактором, от которого может зависеть эффективность противовирусного лечения. Выделяют 10 генотипов ВГВ, которые обозначаются латинскими буквами от А до J. Для каждого генотипа характерны определенные географические и этнические особенности распространенности. Клиническое течение и исход ХГВ могут зависеть от генотипа ВГВ. Исследования по определению генотипа, рекомендуется провести после обнаружения ДНК ВГВ в исследуемых образцах с помощью тест-наборов, предназначенных как для качественного, так и для количественного определения ДНК ВГВ. Для анализа можно использовать образцы ДНК, экстрагированной из клинического материала, в которых на этапе обнаружения и/или количественного определения ВГВ были получены положительные результаты.

Для определения генотипа ВГВ, используется тест-набор, предназначенный для выявления и дифференциации генотипов А, В, С и D ВГВ в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Спектр выявляемых генотипов, зависит от характера циркуляции определенных генотипов на территории РК. Процедура определения генотипа ВГВ проводится в соответствии с инструкцией к тест- набору.

4.2. Диагностика ВГС методом ПЦР

Основным маркером инфекции, применяемым при проведении первичной диагностики ГС, являются антитела к ВГС – анти-ВГС. Однако серологические тесты не позволяют выявлять ВГС в предсероконверсионную фазу, которая может продолжаться в среднем 80 дней, а также иммунокомпromетированных пациентов, не выработавших адекватный иммунный ответ к ВГС, не позволяют различать активную и прошедшую инфекцию. Для решения этой проблемы применяются различные диагностические подходы, одним из них является тест для выявления антигена ВГС (точнее комбинированные тесты для выявления анти-ВГС и антигена ВГС) в большинстве своем не дали выраженного преимущества по сравнению с определением вирусной РНК с точки зрения сокращения серологического окна [33]. Поэтому для скрининга донорской крови и для подтверждения активной инфекции у людей с анти-ВГС преимущественно применяется определение РНК ВГС методом ОТ-ПЦР.

Современный этап лабораторной диагностики ВГС можно охарактеризовать как этап начала широкого применения молекулярно - генетических методов (ПЦР) выявления РНК ВГС. Диагностика ВГС методом ПЦР направлена на выявление РНК ВГС в крови человека. В большинстве случаев ВГС острой формы переходит в хроническую. Важно замедлить темпы распространения вируса на начальной стадии, чтобы повысить шансы на выздоровление. Поэтому, метод ПЦР играет большую роль в ранней диагностике ВГС. Определение РНК вируса методом ПЦР идет в двух

направлениях –качественном и количественном (вирусная нагрузка). Качественный показатель отражает степень репликации вируса. При количественном обнаружении фиксируется количество единиц РНК в 1 мл крови и выражается как МЕ/мл или копии/мл.

4.2.1.Обнаружение РНК ВГС (качественное исследование)

РНК ВГС выявляется в крови уже через 5 дней после инфицирования, т.е. задолго до появления антител к ВГС. Время появления анти-ВГС различно: в одних случаях - через 2 - 4 недели после начала гепатита, в других - через месяцы после повышения уровня аминотрансфераз. У ряда больных с самоограничивающимся течением инфекции анти-ВГС никогда не появляются. Серологические тесты являются свидетельством ВГС инфекции, тогда как только определение РНК ВГС позволяет различать активную инфекцию от прошедшей. Проведение ПЦР позволяет выявить РНК ВГС не только в сыворотке крови, но и в биоптате печени, что важно при подтверждении роли ВГС в формировании ГЦК. У подобных больных РНК ВГС регистрируется в гепатоцитах и при отсутствии анти-ВГС и РНК ВГС в сыворотке крови.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из сыворотки и/или плазмы крови. При качественном определении РНК ВГС, используются тест- наборы, предназначенные для выявления РНК ВГС в клиническом материале методом ПЦР в режиме «реального времени» (формат FRT). Нижний лимит определения РНК ВГС тест-набора должен составлять 15 МЕ/мл [34]. Процедура определения РНК ВГС проводится в соответствии с инструкцией к тест- набору.

4.2.4. Количественное определение РНК ВГС (вирусная нагрузка)

Определение вирусной нагрузки РНК ВГС помогает определить, стадии активной репликации вируса (при ХГС), для определения эффективной тактики лечения. Также, исследование дает возможность определить насколько высок риск передачи возбудителя и насколько эффективным будет лечение. Количественное определение РНК ВГС для выявления исходной вирусной нагрузки до начала терапии, а также для мониторинга во время лечения широко применяется для оценки эффективности антивирусного ответа на комбинированную терапию пегилированными интерферонами рибавирином, а также на терапию новыми препаратами прямого противовирусного действия. Современные методики по ведению и терапии ВГС-инфекции рекомендуют количественное определение РНК ВГС перед началом антивирусной терапии, во время (так называемая терапия, управляемая вирусологическим ответом) и через 24 недели по окончании терапии. Отрицательный результат выявления РНК ВГС в чувствительном тесте через 24 недели после окончания терапии является целью лечения и указывает на достижение УВО [35]. Во время двойной антивирусной терапии пегилированным интерфероном и рибавирином обычно наблюдают РВО, определяемый как снижение на 2 или более

десятичных логарифма (lg) уровней РНК ВГС через 12 недели терапии. Отсутствие РВО рассматривают как достоверный прогностический фактор недостижения УВО, в этом случае терапию пегилированным интерфероном и рибавирином рекомендуется прекращать. Быстрый вирусологический ответ (БВО), т. е. отсутствие выявляемых уровней РНК ВГС через 4 недели терапии, является определяющим прогностическим фактором достижения УВО [36]. Определение вирусной кинетики стало также применяться для выбора персонализированной продолжительности терапии при использовании новых противовирусных препаратов прямого действия для лечения ХГС в рамках тройной терапии с ингибиторами протеазы ВГС [37].

Количественное определение РНК ВГС позволяет определить вирусную нагрузку - концентрацию генетического материала возбудителя в одном миллилитре крови. Для определения вирусной нагрузки РНК ВГС используется набор реагентов, предназначенный для количественного определения РНК ВГС в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Процедура определения вирусной нагрузки ВГС проводится в соответствии с инструкцией к тест-набору. Нижний лимит определения РНК ВГС тест-набора должен составлять 15 МЕ/мл [34].

4.2.5. Определение генотипа ВГС

ВГС отличается высокой изменчивостью и наличием нескольких вариантов генотипа. Помимо определения вирусной нагрузки важнейшим клинически значимым фактором является генотип ВГС, поскольку генотипы вируса различаются по степени чувствительности к интерферону и препаратам прямого действия. Известно, что эффективность стандартной противовирусной терапии ГС во многом определяется генотипом ВГС, что делает необходимым проведение исследований по идентификации генетических вариантов вируса, преобладающих на той или иной территории и/или в определенной социальной, возрастной или клинической группе [38].

Согласно современной классификации ВГС подразделяют на 7 генотипов, каждый из которых, в свою очередь подразделяется на субтипы. Генотип вируса обозначается арабскими цифрами (1-7), а субтип – строчными латинскими буквами (a, b...). Генотип ВГС является наиболее важным фактором, от которого зависит эффективность и тактика противовирусного лечения ХГС [39]. Для клинической практики достаточно разграничивать 5 субтипов ВГС: 1a, 1b, 2, 3a/3b. Все эти виды по-разному реагируют на различные способы лечения, при этом отдельные разновидности абсолютно устойчивы ко многим лекарственным препаратам. Поэтому, для того чтобы подобрать подходящие препараты и назначить курс лечения достаточной длительности необходимо точно определить, каким типом вируса заражен пациент.

Достоверным прогностическим фактором развития инфекции ВГС и ответа на противовирусную терапию является генотип ВГС. Генотипом вируса также

определяется продолжительность курса лечения, что весьма актуально учитывая широкий спектр побочных действий интерферона и низкую переносимость этого препарата больными. Кроме этого, генотип дает возможность определить и показать состояние печени.

Исследования по определению генотипа, рекомендуется провести после обнаружения РНК ВГС в исследуемых образцах с помощью тест-наборов, предназначенных как для качественного, так и для количественного определения РНК ВГС. Для анализа можно использовать образцы РНК, экстрагированной из клинического материала, в которых на этапе обнаружения и/или количественного определения ВГС были получены положительные результаты.

Для определения генотипа, используется тест-набор ПЦР предназначенный, для выявления и дифференциации генотипов ВГС в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Если, концентрация РНК ВГС в исследуемой пробе находится в пределах аналитической чувствительности тест-набора, генотип не определяется по причине низкой вирусной нагрузки. В связи, с этим рекомендуется использовать более чувствительные тест-наборы для определения генотипа ВГС.

4.3. Диагностика ВГД-инфекции методом ПЦР

ВГД способен размножаться только при наличии ВГВ-инфекции, после одновременного заражения двумя вирусами или в результате суперинфекции организма, уже инфицированного ВГВ. Известно, что для коинфекции ВГД/ВГВ характерно более тяжелое протекание заболевания печени, более быстрое прогрессирование в цирроз и более высокий риск развития декомпенсации и гибели пациента по сравнению с моноинфекцией ВГВ [40].

В связи с этим ранняя диагностика ГД у людей с ВГВ-инфекцией имеет важнейшее значение для выбора тактики наблюдения и лечения. Поскольку при коинфекции ВГВ/ВГД патогенез определяется именно ВГД, а подходы к терапии ХГВ и ГД принципиально отличаются (агенты прямого действия, активные против ВГВ, не эффективны в отношении ВГД), ранняя диагностика ВГД-инфекции является критическим фактором успешной терапии.

При коинфекции и суперинфекции ВГД наблюдается подавление репликации ВГВ как у пациентов, так и в экспериментах по моделированию инфекции. Примерно 70–90 % пациентов с коинфекцией ВГД отрицательны по HBeAg (маркеру активной репликации ВГВ), и у большинства отмечают низкие уровни ДНК ВГВ в крови [41]. При инфицировании ВГД всегда развиваются антитела к капсидному белку вируса (анти-ВГД), поэтому каждый положительный по HBeAg пациент должен тестироваться на анти- ВГД IgG для выявления случаев коинфекции. После контакта с ВГД анти-ВГД IgG сохраняются длительное время даже после прекращения инфекции [40]. Раньше диагностика текущей ВГД-инфекции основывалась на определении анти-ВГД класса IgM (теста, обладающего относительно невысокой чувствительностью и

специфичностью), в настоящее время для подтверждения инфекции применяется определение РНК ВГД в обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Скрытая (не выявляемая в серологических тестах) ВГД-инфекция не описана, поэтому тестирование РНК ВГД при отсутствии анти-ВГД не рекомендовано. В 2013 г. появился Международный стандарт ВОЗ молекулярных тестов, аналогичный РНК ВИЧ, РНК ВГС и ДНК ВГВ, который позволил стандартизировать существующие тест-системы [42]. Однако определение анти-ВГД IgM по-прежнему актуально при обследовании пациентов, отрицательных по РНК ВГД, но имеющих клиническую картину ВГД-ассоциированного заболевания печени.

4.3.1. Обнаружение РНК ВГД (качественное исследование)

ИФА используют для выявления серологических маркеров. В качестве серологических маркеров антител класса IgM в вирусу ВГД (анти-ВГД) могут указывать на репродукцию вируса в организме. Однако наблюдается высокая частота серонегативной ВГД-инфекции, и поэтому целесообразно использовать тест-системы на основе ПЦР для диагностики ВГД-инфекции. РНК ВГД - это первый диагностический маркер, который обнаруживают в крови пациента, антитела появляются на 2-3 недели позже. Выявление РНК ВГД с помощью ПЦР позволяет проводить раннюю диагностику. Обнаружение РНК-вируса свидетельствует об этиологической роли возбудителя в патогенезе заболевания (хронический вирусный гепатит Д), указывает на активность патологического процесса и коррелирует с максимумом воспалительно-некротических изменений в печени.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК, выделенные из сыворотки и/или плазмы крови. При качественном определении РНК ВГД, используются тест-наборы, предназначенные для выявления РНК ВГД в клиническом материале методом ПЦР в режиме «реального времени» (формат FRT). Процедура определения РНК ВГД проводится в соответствии с инструкцией к тест-набору. Однако широкий доступ к диагностике ВГД отсутствует, как и стандартизированный подход к анализу на наличие РНК ВГД, который используется для мониторинга ответа на противовирусную терапию.

4.3.2. Количественное определение РНК ВГД (вирусная нагрузка)

Количественное определение РНК ВГД в плазме крови необходимо проводить в процессе интерферонотерапии для оценки ее эффективности. Для определения вирусной нагрузки РНК ВГД используется набор реагентов, предназначенный для количественного определения РНК ВГД в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Процедура определения вирусной нагрузки ВГД проводится в соответствии с инструкцией к тест-набору. При отсутствии возможности количественного анализа РНК ВГД целесообразным маркером

для мониторинга реакции на лечение является HBsAg. Снижение титра HBsAg часто свидетельствует об исчезновении поверхностного антигена и клиренсе ВГД, хотя исчезновение поверхностного антигена редко встречается при лечении.

5. Автоматизация этапов ПЦР посредством роботизации и программного обеспечения

Проведение исследований методом ПЦР требует определенных условий. Необходимо, чтобы они проводились быстро, с высокой степенью чувствительности и специфичности, были безопасны для персонала, и исключали возможность ошибки. Для выполнения подобных условий возможно максимально автоматизировать лабораторные процессы посредством роботизации и программного обеспечения. Автоматизация метода ПЦР предоставляет возможность оптимизации лабораторных исследований, управления рабочими потоками, увеличения эффективности и пропускной способности лаборатории, повышения качества выполняемых исследований, быстрой и безопасной передачи данных, снижения себестоимости выполняемых исследований. Автоматизация лабораторных процессов позволяет исключить влияние человеческого фактора на проведение исследований и существенно повысить качество проводимых анализов.

В настоящее время, на рынке существуют автоматические станции для экстракции нуклеиновых кислот, совместно с набором реагентов необходимо использование протоколов и реагентов, позволяющих проводить экстракцию РНК из образцов плазмы и сыворотки крови объемом от 0,1 мл до 1 мл.

Преимущества автоматической станции пробоподготовки:

- время работы вручную значительно снижается, поскольку исключаются требующие время действия при обработке проб;
- упрощает работу и значительно повышает продуктивность;
- не требует дополнительного оборудования;
- имеет диагностическое программное обеспечение;
- встроенный сканер штрих кодов;
- контроль всего процесса с помощью единой системы управления данными.

Также, существует автоматический ПЦР-анализатор для амплификации, детекции и количественного анализа нуклеиновых кислот в реальном времени с использованием 5'-нуклеазной технологии. Принцип проведения ПЦР в режиме реального времени основывается на выявлении и количественном определении флуоресцентного сигнала во время ПЦР амплификации. Поцикловое определение накапливаемого продукта ПЦР позволяет совмещать температурный цикл, определение флуоресценции и компьютерный анализ в одном приборе ПЦР в режиме реального времени позволяет автоматизировать процессы амплификации, учета результатов и количественной ПЦР или RT-ПЦР, проводя количественное определение продуктов реакции в каждом

образце на каждом цикле. Анализатор не требует дополнительных манипуляций после завершения загрузки образцов.

Программное обеспечение автоматического анализатора позволяет проводить мониторинг пациентов и образцов, интегрирование в лабораторную систему, графический интерфейс – простой и информативный способ общения с прибором. Автоматический ввод задания, реагентов и отслеживание результата. Уровень доступа к программному обеспечению задается пользователем. Возможность программировать собственные тесты. Возможность, работы с базой данных результатов.

Основные преимущества автоматического анализатора:

- надежность – оборудование имеет сертификаты CE-IVD и одобрено FDA;
- быстрота – позволяет получить за краткое время результаты первой постановки (с момента центрифугирования до выдачи результатов);
- точность – высокая точность определения РНК (ДНК) вируса и количественное определение;
- удобство – закрытый анализатор не требует вмешательства оператора после того, как завершена погрузка образцов;
- снижает риск загрязнения образца;
- увеличивает оптимизацию рабочего процесса;
- совмещает на одной платформе IVD исследование и исследование, задаваемое пользователем;
- позволяет одновременно тестировать несколько образцов. Результаты количественного определения доступны сразу по окончании амплификации, не требуя дополнительной очистки или анализа;
- мониторинг пациентов и образцов на приборе;
- автоматический ввод задания, реагентов и отслеживание результата;
- не требует дополнительных манипуляций!
- снижен риск контаминации благодаря использованию закрытых пробирок и фермента;
- система обладает широким набором свойств, направленных на сведение к минимуму ошибок, возникающих иногда при обработке проб вручную;

Кроме этого, на рынке существуют модульные автоматизированные системы для ПЦР диагностики, состоящая из двух приборов-пробоподготовка и анализатора. Модульная система сочетает в себе полностью автоматизированную пробоподготовку, амплификацию и детекцию, а также удобное в работе программное обеспечение, объединяющее оба компонента. Данное сочетание обеспечивает полную автоматизацию и интеграцию с ЛИС для максимальной эффективности работы лаборатории. Тесты являются тестами высокого медицинского значения и валидированы результатами клинических исследований.

6. Ошибки при использовании метода ПЦР

Применение метода ПЦР требует строгого соблюдения правил в организации работы и проведении всех этапов анализа. Отсутствие

достаточного опыта использования амплификационных технологий и стереотипы мышления персонала, ранее работавшего в биохимических или бактериологических лабораториях, могут приводить к ошибкам, результатом которых может стать неверное - ложноотрицательное или ложноположительное заключение. Другой вид ошибок связан с неверно выбранной диагностической стратегией обследования больного либо с неправильной интерпретацией врачом результата ПЦР-анализа вследствие неверных представлений о биологии исследуемого инфекционного агента и о возможностях метода ПЦР. Основные проблемы при использовании ПЦР-анализа в лабораторной диагностике базируются на молекулярно-биологических основах метода. Процесс амплификации носит цепной характер, по его завершении может образовываться миллиардное количество продуктов – ампликонов, являющихся вторичной матрицей для амплификации. Возникает опасность разнесения их с электрофоретической зоны в другие зоны, что ведет за собой появление контаминации. Контаминация ведет к возникновению ложноположительных результатов или других артефактов ПЦР (Таблица 2).

С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа, – прежде всего, связанные с нарушением правил взятия, хранения и транспортировки клинического материала. Однако при диагностике могут допускаться и другие ошибки, которые могут быть не замечены сотрудником лаборатории при анализе результатов.

Таблица 2 - Ошибки, встречающиеся при проведении ПЦР-диагностики

Характер ошибки	Причина ошибки	Следствие ошибки	Возможность лабораторного контроля ошибки	Способы предотвращения ошибки
Контаминация пробы на стадии забора материала	Использование при заборе пробы инструментария, пробирок, перчаток и др. материалов, загрязненных «положительной» ДНК	Ложноположительный результат	Невозможен	Использование разового инструментария и материалов; повышение образовательного уровня медицинского персонала
Загрязнение пробы примесями, ингибирующим и ПЦР	Проба содержит примеси ингибиторов ПЦР. Сильными ингибиторами являются гемоглобин,	Ложноотрицательный результат	Осуществляется при использовании и тест-систем с внутренним контролем	Использование разового инструментария и материалов; соблюдение правил забора материала

	гепарин			
Забор материала выполнен неадекватно, в пробе отсутствуют клеточные структуры.	Несоблюдение правил забора материала (вместо соскоба клеток собрана поверхностная слизь)	Ложноотрицательный результат	В некоторых случаях возможен при визуальном контроле	Соблюдение правил забора материала; использование специальных одноразовых щеточек-зондов
Разрушение ДНК при транспортировке и хранении пробы	Несоблюдение правил транспортировки и хранения проб	Ложноотрицательный результат	Невозможен	Соблюдение правил транспортировки и хранения проб
Потери ДНК во время пробоподготовки	Несоблюдение инструкции выделения ДНК; использование некачественных реактивов	Ложноотрицательный результат	Возможен при проведении положительного образца через все стадии пробоподготовки	Соблюдение инструкции выделения ДНК; использование качественных реактивов
Контаминация в отдельных пробах	Нарушение правил работы в ПЦР-лаборатории; использование одного наконечника при обработке разных проб; при внесении реагентов наконечник касается стенок пробирки; загрязнение дозатора	Ложноположительный результат	Возможен при постановке параллельных проб	Соблюдение правил работы в ПЦР-лаборатории; инструкции выделения ДНК и постановки ПЦР; использование наконечников с фильтрами
Тотальная контаминация	Загрязнение реагентов, дозаторов “положительной” ДНК	Ложноположительный результат	Осуществляется при постановке отрицательного контроля	Соблюдение правил работы в ПЦР-лаборатории; инструкции выделения ДНК и постановки ПЦР; использование наконечников с фильтрами

Наиболее частая ошибка при исследовании методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени связана с прибором, который при

больших колебаниях флуоресценции может зафиксировать ложноположительные результаты. В связи с этим необходимо проводить анализ индивидуальной кривой. Пороговая линия должна пересекать индивидуальную кривую в области начала экспоненциального роста, и это не один из множества пиков колебания флуоресценции. Также прибор может выдать ложноотрицательный результат в случае, если на первых циклах ПЦР по каким-то причинам произошло существенное уменьшение флуоресценции. Эту ошибку можно обнаружить при анализе исходных кривых флуоресценции. Если образец положительный, то на исходной кривой будет виден четкий экспоненциальный рост. Для большей достоверности можно сравнить такую сомнительную кривую с кривой заведомо положительной. Все положительные кривые имеют сходный угол наклона и уровень флуоресценции при выходе на плато заметно отличается от колебаний в отрицательных образцах.

Ошибки на завершающем, постаналитическом этапе, связаны с неверной интерпретацией врачом результатов ПЦР-анализа вследствие ошибочных представлений об инфекционном агенте или о возможностях метода. То есть при назначении ПЦР-исследования врач должен очень четко представлять границы специфичности применяемых тест-систем. Вместе с тем не совпадение результатов различных методов исследования не говорит об ошибке. Зачастую ПЦР-исследование дает положительный результат, в то время, как ИФА – отрицательный, либо наоборот. Несовпадение результатов исследований может объясняться, например, периодом “серологического окна”. В случае обратных результатов исследований возможен “иммунологический след” – остаточный уровень антител, который у некоторых людей может сохраняться многие месяцы и даже годы после выздоровления, либо при проведении ПЦР не учитывается видоспецифичность тест-систем. Приведенные примеры показывают, что необходима обратная связь между специалистами ПЦР-лаборатории и врачами-клиницистами, для осуществления точной диагностики в сложных случаях и выработки правильной стратегии лечения пациента.

Заключение

В апреле 2016 г. на Ассамблее Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) было принято решение о глобальной ликвидации вирусных гепатитов как проблемы общественного здравоохранения к 2030г. Необходимость программы определяется значимостью для человечества этих инфекций, а также разработкой современных вакцинных и лечебных препаратов, которые могут защитить и вылечить больных вирусными гепатитами. Кроме того, накоплены знания по использованию новых, современных методов эпидемиологического анализа, позволяющих реально оценить бремя вирусных гепатитов и уровень необходимых затрат для реализации разработанных в программе задач. Принципиально новые подходы к воздействию на все 3 звена эпидемического процесса вирусных гепатитов (источник инфекции, пути передачи возбудителя и восприимчивый организм) позволяют ожидать достижения поставленной цели. Глобальная стратегия сектора здравоохранения по вирусному гепатиту на 2016–2021 гг.: на пути к ликвидации вирусного гепатита является документом разработанный ВОЗ, в которой определены основные положения стратегии, перспективное видение, цель, целевые показатели и руководящие принципы, а также стратегические направления и первоочередные действия.

Проблема вирусных гепатитов является многофакторной, для ее решения необходимы усилия медицинской науки, здравоохранения и всего общества. Учитывая, что вирусы гепатитов В, С и D являются агентами, вызывающими рак печени, борьба с ними должна быть интегрирована в будущую специальную общенациональную программу по борьбе с онкологическими заболеваниями.

Актуальность проблемы парентеральных вирусных гепатитов обусловлена повсеместным распространением, значительным социально-экономическим ущербом, высокой частотой хронизации, активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста. В связи высокой генетической гетерогенностью парентеральных вирусных гепатитов, качественное и количественное определение ДНК/РНК и его генотипа имеет не только безусловное клиническое значение для подбора схемы и контроля лечения, но и является перспективным для решения эпидемиологических задач на региональном уровне.

Разработанная в Казахстане Дорожная карта «О реализации мер по профилактике парентеральных вирусных гепатитов на 2017-2020 годы», является подтверждением, что Казахстан ставит конкретные цели по снижению заболеваемости вирусными гепатитами. Одними из основных мероприятий Дорожной карты является совершенствование лабораторной диагностики ВГ в части разработки стандартов молекулярно-генетической диагностики вирусных гепатитов, серологической диагностики вирусных гепатитов, определение Национальной референс-лаборатории по диагностике вирусных гепатитов с учетом утвержденных стандартов, участие лабораторий, проводящих диагностику парентеральных ВГ, в программе внешней оценки качества.

Таким образом, создание современной системы лабораторной диагностики вирусных гепатитов, включающей систему внешнего контроля качества и оптимизации проводимых исследований, характеристикой популяций вируса (генотиповой и субтиповой анализ). Использование современных специфических лабораторных технологий позволяет более достоверно и доказательно установить форму инфекционного процесса, в последующем выбрать схему лечения и проконтролировать ее эффективность, что позволяет спрогнозировать исход заболевания.

Литература

1. План действий сектора здравоохранения по борьбе с вирусными гепатитами в Европейском регионе ВОЗ // Всемирная организация здравоохранения. – 2017.
2. Серов В.В., Апросина З.Г., Игнатова Т.М. Вирусный гепатит - одна из ведущих проблем современной медицины // Хронический вирусный гепатит. – Москва. – 2004. – С. 5-18.
3. Котова В. О., Балахонцева Л. А., Троценко О. Е. Молекулярно-генетическая характеристика вирусного гепатита В на территории хабаровского края // Молекулярная диагностика 2017. – 2017. – С. 52-53.
4. World Health Organization et al. World Health Organization Hepatitis B factsheet //World Health Organization: Geneva. – 2017.
5. European Association For The Study Of The Liver et al. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection //Journal of hepatology. – 2012. – Т. 57. – №. 1. – С. 167-185.
6. Доклад ВОЗ о состоянии здравоохранения в Европе //Курс на благополучие. – 2012.
7. Лобзин Ю.В. Инфекционные болезни. - Санкт-Петербург, 2001. - 543 с.
8. Андерсон Р., Мэй Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль. – Москва, 2004. – 784 с.
9. Гисеке Йохан. Современная эпидемиология инфекционных болезней. – Стокгольм, 2004. – 276 с.
10. Кудырова Б.М. Качество жизни больных гепатитом С при разных видах лечения // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2007. – №3. – С.36-38.
11. Марголис Х.С. (Margolis H.C). Гепатит С в странах Центральной и Восточной Европы и в Новых независимых государствах. – 2005.
12. Андерсон Р., Мэй Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль. – М., 2004. – 783 с.
13. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2014. –Т. 4. – №. 11. – С. a021550.
14. Plebani M., Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency //Clinical chemistry. – 1997. – Т. 43. – №. 8. – С. 1348-1351.
15. «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР диагностики», ЦНИИ эпидемиологии. Методические рекомендации. – Москва, 2012.
16. Руководство ВОЗ по тестированию на гепатиты В и С. - 2017.
17. Као J. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers // Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2008. – Vol. 4. – P. 553 - 562.
18. Gerlich W.H., Brener C., Saniewski M. et al. Occult hepatitis B virus infection detection and significance // Dig. Dis. – 2010. – Vol. 1. – P. 116 - 125.

19. McMahon B.J., Holck P., Bulkow L., Snowball M. Serologic and clinical outcomes of 1536 Alaska Natives chronically infected with hepatitis B virus // *Ann. Intern. Med.* – 2001. – Vol. 9. – P. 759-768.
20. El-Sherif A., Abou-Shady M., Abou-Zeid H. et al. Antibody to hepatitis B core antigen as a screening test for occult hepatitis B virus infection in Egyptian chronic hepatitis C patients // *J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 359-364.
21. Hass M., Hannoun C., Kalinina T. et al. Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals // *Hepatology.* – 2005. – Vol. 1. – P. 93-103.
22. Cacciola I., Pollicino T., Squadrito G. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 1. – P. 22-26.
23. Bellecave P., Gouttenoire J., Gajer M. et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 1. – P. 46-55.
24. Carman W.F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus // *J. Viral Hepat.* 1997. – Vol. 4. – P. 11-20.
25. Mederacke I., Bremer B., Heidrich B. et al. Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the CobasTaqMan platform to study HDV RNA kinetics // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48. P. 2022-2029.
26. Candotti D., Lin C.K., Belkhir D., Sakuldamrongpanich T. et al. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence // *Gut.* 2012. – Vol. 61. T. 12. – P. 1744-53.
27. Castillo I., Rodriguez-Inigo E., Lopez-Alcorocho J. et al. Comparative study on the clinical and virological characteristics among patients with single occult hepatitis B virus (HBV), single occult hepatitis C virus (HCV) and occult HBV and HCV dual infection // *J. Med. Virol.* – 2007. – Vol. 3. – P. 236-241.
28. Pettrignani M., Harms M., Verhoef L., van Hunen R. et al. Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January–February 2010 // *Euro Surveill.* – 2010. – Vol. 15. – № 20. – P. 19572.
29. Biswas R., Tabor E, Hsia CC, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection // *Transfusion.* – 2003. – Vol. 43. – P. 788-798.
30. Клинический протокол диагностики и лечения «хронический гепатит В у взрослых». Клинический протокол РЦПЗ МЗ РК. – 2018
31. Tillmann H.L. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 13. – P. 125-140.
32. WHO: Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Geneva. World Health Organization. – 2015.
33. Ghany M.G., Strader D.B., Thomas D.L. et al. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update // *Hepatology.* 2009. – Vol. 49. – P. 1335-1374.

34. Хронический вирусный гепатит С у взрослых. Клинический протокол РЦРЗ МЗ РК. – 2017.
35. Abdelrahim SS, Khiry RM, Esmail MA, Ragab M, Abdel-Hamid M, Abdelwahab SF. Occult hepatitis C virus infection among Egyptian hemodialysis patients // J Med Virol. – 2016. – V. 88. – Т. 7. – P.1388-1393.
36. American Association for the Study of Liver Diseases et al. AASLD, IDSA, IAS-USA. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C.
37. Jacobson I.M., McHutchison J.G., Dusheiko G. et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364. – P.2405-2416.
38. Афанасьев М. В., Синьков В. В., Соловьев С. Ю. Генетическое разнообразие возбудителя гепатита с на территории иркутской области //МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017. – 2017. – С. 46-46.
39. Smith D. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource//Hepatology. – 2014. – Vol. 59. – P. 318-327.
40. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after // J. Hepatology. - 2009. - Vol. 50. P. 1043-1050.
41. Zachou K., Yurdaydin C., Drebbler U. et al., for the HИDT-1 Study Group. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis // Liver Int. – 2010. – Vol. 30. – P. 430-437.
42. Chudy M., Hanschmann K.M., Bozsayi M., Krieb J. et al. Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays // WHO Report.

Информация об авторах и рецензентах

Название МР: Молекулярно-генетическая диагностика парентеральных вирусных гепатитов

Организация разработчик: филиал «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга» РГП на ПХВ НЦОЗ МЗ РК

Информация об авторах

№	Ф.И.О.	Ученая/академическая степень, Ученое звание	Должность, место работы	Электронный адрес	Контактный телефон
1	Нусупбаева Г.Е.	Магистр общественно го здравоохранения	Заведующая референс лабораторией по контролю за вирусными инфекциями НПЦСЭЭиМ	gnusupbaeva@mail.ru	+77014945664
2	Муталиева А.С.	Магистр медицинских наук	Врач-вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями НПЦСЭЭиМ	aknyr.kz@mail.ru	+77072410788
3	Тлеумбетова Н.Ж.		Врач-вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями НПЦСЭЭиМ	NN_Nazym@mail.ru	+77783308607

Информация о рецензентах

№	Ф.И.О.	Ученая/академическая степень, Ученое звание	Должность, место работы	Электронный адрес	Контактный телефон
1	Сапарбеков М.К.	Д.м.н., профессор	Заведующий кафедрой эпидемиологии и гигиены Медицинского факультета – ВШОЗ КазНУ им. Аль-Фараби	murat.saparbekov@kaznu.kz	+77772681895
2	Айкимбаев А.М.	Д.м.н., профессор	Консультант НПЦСЭЭиМ	alim.aikimbayev@mail.ru	+7013155520