

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

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

**СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ 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 КМУ «ВШОЗ», председатель ассоциации общественного здоровья
2. Айкимбаев А.М. – д.м.н., профессор, консультант Научно – практического центра санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга

**Авторы:**

Нусупбаева Г.Е. – магистр общественного здравоохранения, заведующая референс лабораторией по контролю за вирусными инфекциями РГП на ПХВ «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга»

Тлеумбетова Н.Ж. – врач - вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями филиала «Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга»

Муталиева А.С. – магистр медицинских наук, врач - вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями Научно – практического центра санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга

Н90. Серологическая диагностика вирусных гепатитов: Методические рекомендации / Нусупбаева Г.Е., Тлеумбетова Н.Ж., Муталиева А.С. // Алматы: Научно – практический центр санитарно – эпидемиологической экспертизы и мониторинга, 2018 -31с.

**ISBN 978-601-7541-77-4**

В настоящих Методических рекомендациях изложены стандартные условия проведения серологического анализа, динамика и интерпретация серологических маркеров ВГ, требования к тест-наборам, преимущества серологического анализа по сравнению с другими методами и его автоматизации.

**УДК: 616.9**

**ББК:55.1**

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП «Республиканский центр развития здравоохранения» (протокол заседания Департамента развития медицинской науки и образования РГП РЦРЗ №166 от «09» сентября 2019 года)

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

## Содержание

Перечень сокращений, условных обозначений, символов.....	4
Понятия, используемых в методических рекомендациях.....	5
Введение.....	7
Глава 1. Иммунологический анализ парентеральных вирусных гепатитов В, С и Д .....	8
1.1 Сущность иммунологического анализа .....	8
1.2 Преимущества иммунологического анализа по сравнению с другими методами.....	9
1.3 Основные требования к проведению метода иммунологического анализа .....	10
1.4 Требования к коммерческим тест-наборам и их транспортировке.....	10
Глава 2. Преаналитический этап диагностики парентеральных вирусных гепатитов методом иммунологического анализа.....	11
2.1. Подготовка пациента к выполнению исследований.....	11
2.2. Получение (кровь), предобработка, хранение и транспортировка биоматериала в лабораторию.....	12
Глава 3. Аналитический этап диагностики парентеральных вирусных гепатитов методом иммунологического анализа.....	14
3.1. Подготовка и использование компонентов набора. Режим хранения..	17
3.2. Практические советы по постановке иммунологического анализа.....	17
Глава 4. Проведение серологической диагностики парентеральных вирусных гепатитов В, С.....	19
4.1. Динамика и интерпретация серологических маркеров ВГ Ви ВГД – инфекции.....	19
4.2. Подтверждающие тесты на HbsAg .....	22
4.3. Динамика и интерпретация серологических маркеров ВГС – инфекции.....	22
4.4. Тестирование на сердцевинный антиген ВГС (p22).....	23
4.5. Подтверждающие тесты на антитела к ВГС.....	23
Заключение.....	24
Список использованных источников.....	25

## Перечень сокращений, условных обозначений, символов

<b>МР</b>	- методическая рекомендация;
<b>ВГВ</b>	- вирус гепатита В;
<b>ВГС</b>	- вирус гепатита С;
<b>ВГД</b>	- вирус гепатита Дельта;
<b>ВОЗ</b>	- Всемирная организация здравоохранения;
<b>ИФА</b>	- иммуноферментный анализ;
<b>КК</b>	- контроль качества;
<b>ИХЛА</b>	- иммунохемилюминесцентный анализ;
<b>ИЭХЛ</b>	- иммуноэлектрохемилюминесцентный анализ;
<b>HBsAg</b>	- поверхностный S антиген вируса гепатита В;
<b>Анти-HBs</b> гепатита В;	- антитела к поверхностному S антигену вируса гепатита В;
<b>HBcAg</b>	- сердцевинный (ядерный) антиген вируса гепатита В;
<b>Анти-HBcore IgM</b> класса М;	- антитела к ядерному антигену вируса гепатита В
<b>Анти-HBcore IgG</b> класса G	- антитела к ядерному антигену вируса гепатита В
<b>HBe Ag</b>	- E антиген вируса гепатита В;
<b>Анти-HBe</b>	- антитела к E антигену вируса гепатита В;
<b>HCVcAg</b>	- сердцевинный антиген вируса гепатита С;
<b>Анти-HCV</b>	- антитела к вирусу гепатита С;
<b>WHO GHP</b>	- Глобальная программа ВОЗ по борьбе с гепатитом;
<b>СП</b>	- Санитарные правила;
<b>ГЦК</b>	- гепатоцеллюлярная карцинома;

## Понятия, используемых 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;

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

**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.

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** – лабораторный серологический иммуноанализ для определения антител, антигенов или их комбинации;

**Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)** – основанный на выявлении комплекса антиген-антитело при взаимодействии антигенов со специфическими антителами, химически конъюгированными с люминофорами (веществами, способными светиться в ультрафиолетовом свете);

**Период серонегативного окна** – это период времени, когда инфекционный агент (вирус) уже попал в организм и размножается, но антитела в крови больного еще не появились;

**Е-антиген вируса гепатита В (HBeAg)** – вирусный белок, обнаруживаемый в фазе высокой репликативной активности вируса гепатита В. HBeAg обычно является маркером активной репликации вируса «дикого типа», но не играет существенной роли в процессе репликации;

**Анти-HBc IgM.** – выявляются при остром гепатите В, но с помощью чувствительных методов могут быть обнаружены при хронической ВГВ-инфекции;

**Антитела к е-антигену вируса гепатита В (анти-HBe)** – антитела к HBeAg, обнаруживаются при низком уровне репликации ВГВ;

**Антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (анти-HBs)** – антитела к HBsAg появляются в ответ на вакцинацию против гепатита В и в процессе выздоровления от гепатита В. Наличие этих антител свидетельствует о перенесенной в прошлом инфекции и развитии иммунитета;

**Антитела к сердцевинному антигену вируса гепатита В (анти-HBc)** – антитела к сердцевинному (капсидному) белку вируса гепатита В. Анти-HBc не являются нейтрализующими антителами и обнаруживаются как при острой, так и при хронической инфекции;

**Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg)** – белок внешней оболочки ВГВ, который образуется в избытке при репликации вируса и обнаруживается в крови при острой и хронической ВГВ-инфекции;

**Сердцевинный антиген вируса гепатита В (HBsAg)** - сердцевинный белок ВГВ. Сердцевинный белок покрыт HBsAg и поэтому не обнаруживается в свободном состоянии в сыворотке крови;

**Антитела к ВГС (анти-ВГС)** - антитела к ВГС, которые можно обнаружить в крови обычно в течение двух-трех месяцев после развития ВГС-инфекции или контакта с источником инфекции;

**Сердцевинный антиген вируса гепатита С (HCVcAg)** - нуклеокапсидный белок ВГС (p22), который выделяется в плазму крови во время сборки вируса и обнаруживается с самого начала и на всем протяжении инфекционного процесса;

**Мультиплексное тестирование** - использование в диагностическом устройстве (или картридже с реагентами) одного и того же биологического образца для выявления ряда инфекций (например, ВИЧ, сифилиса, гепатита С, гепатита В);

**Серологические тест- системы** - набор серологических тестов, которые позволяют определять наличие антигенов или антител в биологических образцах, как правило в сыворотке или плазме крови, но также в цельной капиллярной или венозной крови и в ротовой жидкости. К ним относятся быстрые диагностические тесты (БДТ) и лабораторные иммунологические тесты, такие как иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА) и иммуноэлектрохемилюминесцентный анализ (ИЭХЛ);

## Введение

Вирусные гепатиты – одна из ведущих причин смертности в мире, которой до недавнего времени не уделялось достаточного внимания как приоритетной проблеме общественного здравоохранения. В Европейском регионе ВОЗ от причин, связанных с вирусными гепатитами, ежегодно умирают около 171 000 человек (приблизительно 2% от всех случаев смерти), что соответствует более чем 400 случаям смерти в день [1]. Приблизительно 98% этих смертей вызваны отдаленными последствиями хронических вирусных гепатитов В и С (56 000 и 112 500 случаев смерти в 2013 г.), а остальные случаи смерти могут быть отнесены на счет острых вирусных гепатитов. Согласно оценке ВОЗ, с 2000 г. смертность от гепатита выросла на 22%, по имеющимся данным более 13 миллионов человек в Европейском регионе живут с инфекцией вируса гепатита В (ВГВ), и более 15 миллионов – с хронической инфекцией вируса гепатита С (ВГС) [2].

На территории республики Казахстан ежегодно регистрируются около 6000 случаев впервые выявленных вирусных гепатитов, из них на долю хронического вирусного гепатита В приходится 48%, хронический вирусный гепатит С составляет 52%. Изучена динамика и тенденции заболеваемости, частоты хронических форм парентеральных вирусных гепатитов на территориях РК за период с 2009 по 2018 год. Установлено, что на территории отмечается положительный темп роста заболеваемости хроническими вирусными гепатитами, где абсолютный прирост заболевания составил 23,83. На территориях с высокими показателями заболеваемости и хронических форм гепатита С аналогичные показатели для гепатита В были также высокими, что свидетельствовало о значительном сходстве путей и факторов передачи возбудителей гепатита В и С, а также контингентов риска по заболеванию этими инфекциями.

По официальным источникам в 2018г. отмечается рост заболеваемости хроническими впервые выявленными вирусными гепатитами на 6% (далее – ХВГ), за счет роста хронических впервые выявленных вирусных гепатитов с дельта агентом на 43,8% (далее – ХВГД), хронических впервые выявленных вирусных гепатитов без дельта агента на 2,9% (далее – ХВГВ) и хронических впервые выявленных вирусных гепатитов С на 7,8% (далее – ХВГС) [3].

Большая роль в системе эпидемиологического надзора за распространением парентеральных вирусных гепатитов принадлежит лабораторной диагностике, которая в настоящее время имеет достаточно значительный спектр диагностических возможностей для определения основных маркеров данных инфекций. Грамотное применение данных лабораторной службы способно обеспечить контроль за эпидемической ситуацией на территориях Казахстана.

В связи с этим первое место в выявлении заболевания занимает лабораторная диагностика, в основу которой положено определение специфических диагностических маркёров. В системе противоэпидемических и

профилактических мероприятий в отношении парентеральных вирусных гепатитов большое значение имеет качество лабораторной диагностики.

В Республике Казахстан 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, качестве проведенных лабораторных исследований. Качество диагностики вирусных гепатитов значительно различается в разных медицинских учреждениях, что зависит ряда от объективных и субъективных причин. Расхождение клинико-эпидемиологических диагнозов с данными серологических и молекулярно-биологических исследований является следствием применения в лабораториях разных методик диагностики вирусных гепатитов, отсутствием референсного анализа (верификации, оценки сопоставимости) применяемых в Республике методов диагностики вирусных гепатитов. Соответственно организация референсного анализа (верификации чувствительности, специфичности, оценки сопоставимости) методов диагностики маркеров вирусных гепатитов является одной из важных задач которую необходимо реализовать. Для достоверной диагностики этих инфекций необходимо своевременное и качественное проведение лабораторных исследований в определенные сроки заболевания. С целью совершенствования лабораторной диагностики парентеральных гепатитов, разработана и реализуется дорожная карта «Реализация мер по профилактике, диагностике, лечению и предотвращению последствий парентеральных вирусных гепатитов в Республике Казахстан на 2017-2020 годы» утвержденная МЗ РК №727 от 26 .09.2017. Методические рекомендации «Серологическая диагностика парентеральных вирусных гепатитов» разработана в соответствии с пунктом 1.4 Дорожной карты.

Разработка методических рекомендаций по серологической диагностики парентеральных вирусных гепатитов (далее-МР) является актуальной, поскольку пошаговая схема проведения исследований дает возможность не только этиологической расшифровки острого или хронического вирусного гепатита, но и проведение вакцинопрофилактики.

МР определяют основные принципы организации и порядок осуществления серологической диагностики парентеральных вирусных гепатитов, а также практические советы по постановке иммунологического анализа и требования к коммерческим тест-наборам, их транспортировке.

## **Глава 1. Иммунологический анализ парентеральных вирусных гепатитов В, С и Д**

### **1.1 Сущность иммунологического анализа**

Иммунологические методы: метод иммуноферментного анализа, основанный на выявлении комплекса антиген-антитело с помощью фермента по изменению окраски специфического субстрата; метод



иммунохемилюминесцентного анализа, основанный на выявлении комплекса антиген-антитело при взаимодействии антигенов со специфическими антителами, химически конъюгированными с люминофорами (веществами, способными светиться в ультрафиолетовом свете) с последующим измерением уровня свечения.

Так как процесс образования иммунохимических комплексов происходит в строго количественном соотношении, обусловленном аффинностью, концентрациями компонентов и условиями реакции, то достаточным для определения исходной концентрации анализируемого соединения является количественная оценка образовавшихся иммунных комплексов. Для такой оценки возможно либо прямое определение концентрации образующихся иммунокомплексов (тип 1), либо количественная оценка оставшихся свободными мест специфического связывания (тип 2). Второй общей стадией иммунологического анализа является формирование связи меченного ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. И наконец, заключительным обязательным процессом является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим, флуориметрическим, люминесцентным и т.д.), что достигается путем измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени. Большинство лабораторные серологические иммуноанализы различаются только по принципу обнаружения образовавшихся иммунных комплексов. Пороговое значение, обычно устанавливаемое производителем тест-системы, позволяет определить, при каком результате тест можно считать реактивным (положительным), поэтому результаты обычно представляют в виде отношения полученной оптической плотности к пороговому значению (ОП/ПЗ), или к критической оптической плотности, тест-системы. Такие типы анализов предпочтительны при необходимости исследовать большое количество образцов (свыше 40 в день) и являются наиболее экономически эффективными в этих условиях.

Любые методы тестирования на гепатиты В и С должны выполняться в соответствии с инструкциями производителя теста. Кроме того, необходимо использовать стандартные операционные процедуры (СОП), которые помогут лицам, проводящим тестирование, свести к минимуму ошибки при тестировании и регистрации результатов и тем самым улучшить качество результатов исследования.

## **1.2.Преимущества иммунологического анализа по сравнению с другими методами**

Иммунологический анализ по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами:

— высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;

— возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала;

— стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения иммунологического анализа (до года и более);

— простотой проведения реакции;

— наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;

— возможностью автоматизации всех этапов реакции

— относительно низкой стоимостью диагностических наборов.

Благодаря своей невысокой стоимости и экологической безопасности, иммунологический анализ перешел в разряд стандартных, «рутинных» анализов.

### **1.3. Основные требования к проведению метода иммунологического анализа**

Исследование должно проводиться в лаборатории, выполняющей иммунологические 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 Министра здравоохранения РК №684 от 8 сентября 2017г.

Иммунологические анализы предназначены для проведения тестирования главным образом на базе лабораторий или медицинских учреждений, а не на уровне сообщества, так как в специализированных учреждениях постоянно имеются в наличии квалифицированный персонал, лабораторные помещения с климатическим контролем и необходимая инфраструктура (электроснабжение; специализированные оборудования, таких как промывочные устройства для планшетов, ридеры, инкубаторы, анализаторы, холодильные камеры), а для проведения таких анализов обычно требуется хранить диагностические наборы в условиях холодной цепи и использовать прецизионные пипетки.

Основные принципы проведения иммуноферментного анализа отображены в методических рекомендациях «Имуноферментный анализ вирусных инфекций», Астана, 2008.

### **1.4. Требования к коммерческим тест-наборам и их транспортировке**

Тест-наборы должны отвечать минимальным критериям приемлемости в соответствии с преквалификацией ВОЗ применительно к средствам для

диагностики *in vitro* или в соответствии с результатами строгой нормативной оценки тест-наборов. Все тест-наборы следует использовать с соблюдением требований согласно инструкции производителя, при возможности, в организациях, участвующих в системах национальной или международной внешней оценки качества. Согласно требованиям Кодекса «О здоровье народа и системе здравоохранения» (статьи 71,75) от 18.09.2009г, тест-наборы должны обладать высокой чувствительностью, должны иметь регистрационное удостоверение казахстанского образца и инструкцию. В соответствии с приказом МНЭ РК №76 от 04.02.2015г. «Правила хранения, транспортировки и использования профилактических препаратов», транспортировка тест-набора поставщиком должна осуществляться в термоконтейнерах с хладоэлементами или в специальном транспорте, оборудованном холодильником при температуре от 2°С до 8°С 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.

## **Глава 2. Преаналитический этап диагностики ВГВ и ВГС методом иммунологического анализа**

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 – контакт и совместная работа с врачами.

Главная задача диагностической лаборатории состоит в том, чтобы обеспечить врача 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.

### **2.1. Подготовка пациента к выполнению исследований**

Подготовка пациента к исследованиям одна из важнейших составляющих преаналитического этапа. Необходимо придерживаться соблюдение 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.

В случае экстренных операций при получении результатов сложно придерживаться вышеуказанных требований, но при получении результатов необходимо учитывать этот факт.

## **2.2. 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;
- идентификация и обработка проб;
- при необходимости условия и сроки хранения проб до анализа;
- выявление влияний (гемолиз, липемия) и интерферирующих веществ (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 направления, 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.

### **Получение, предобработка, хранение и транспортировка биоматериала в лабораторию**

**Таблица 1.**

<b>Вид материала</b>	<b>Взятие (забор) материала<sup>1</sup></b>	<b>Предобработка материала</b>	<b>Хранение и транспортировка</b>
----------------------	---	--------------------------------	-----------------------------------

ла			вка материала
Сыворотка крови <sup>2</sup>	Забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой <sup>3</sup> 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.	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 <sup>2</sup>	Забор крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой <sup>3</sup> в одноразовые стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом (жемчужно-белая крышка –К2ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8% ный раствор цитрата натрия в соотношении 1:9).	При использовании одноразового шприца: пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом <sup>4</sup> (в противном случае кровь свернется, и выделение ДНК/РНК станет невозможным). Затем центрифугируют при 3000 об./мин в течение 20 минут при 25°C. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (одноразовыми пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки <sup>5</sup> объемом 1,5 или 2,0 мл; При использовании вакуумной системы, вакуумную пробирку, следует перемешать путем переворачивания 5-6 раз для лучшего контакта с антикоагулянтом. Затем центрифугируют при 3500 об./мин в течение 10 мин при 25°C.	при температуре 2–8 °C — в течение 5 суток; при температуре минус 20 °C — в течение года; при температуре минус 70 °C — длительно.
Биоптат печени	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	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 охлажденный изотонический раствор хлорида	при комнатной температуре – в течение 6 часов; при температуре 2-8 °C – в течение 3 суток; при температуре минус 20 °C – в

	транспортную среду. Пробирку плотно закрывают.	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 <sup>5</sup> .	течение 1 недели; при температуре минус 70 °С – длительно.
--	--	--	--

### **Примечание**

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».

## **Глава 3. Аналитический этап диагностики парентеральных вирусных гепатитов методом иммунологического анализа**

Аналитический этап включает технологический процесс проведения исследований, подготовку реагентов и приборов к проведению исследования, выполнение протокола анализа, проведение процедуры контроля качества, регистрацию, математическую обработку результатов исследований.

Контроль качества на аналитическом этапе исследований основывается на оценке достоверности и воспроизводимости результатов посредством использования контрольных материалов.

### **Факторы, влияющие на аналитический этап.**

Факторы, влияющие на создание аналитического качества, можно разделить на постоянные и переменные, внешние – не зависящие от пользователя и внутренние, которые пользователь может контролировать.

**К постоянным внешним факторам** относятся обстоятельства, связанные с характеристиками метода ограничения аналитического принципа, ограничения характеристик оборудования, выбор производителя реагентов, ограничения характеристик тест систем, а также прослеживаемость калибровки для количественных тестов.

**Переменные внешние факторы** зависят от серии реагентов, калибраторов, расходных материалов.

**Внутренние факторы**, в первую очередь, это условия выполнения иммунологического анализа.

**К постоянным внутренним факторам** относятся условия выполнения теста, калибровка пипеток, качество воды, качество отмывки, соблюдение температурных и временных ошибок инкубации. Однако на выполнение теста могут влиять и другие условия – время проведения, температура в лаборатории, объемы исследований и т. д. Также имеет большое значение стандартизация этапов исследований.

**Переменные внутренние факторы** связаны с конкретной реализацией теста.

К ним относятся неправильные действия, связанные с недостаточной квалификацией персонала, ошибка при внесении образцов и реагентов, несделанное вовремя обслуживание прибора, отсутствие контроля процедуры исследования с ведением журнала ошибок и описанием проблем и т. д. Постоянные факторы определяют систематическую ошибку и контролируются внешней оценкой качества. Переменные факторы обуславливают случайную ошибку в исследовании, которая может быть зафиксирована внутрилабораторным контролем качества.

**Внешняя оценка качества (далее -ВОК).** **ВОК** – это объективная оценка результатов лаборатории, осуществляемая внешней организацией, в том числе путем сравнения результатов лаборатории с интервалом результатов других лабораторий, преимущественно с целью оценить их правильность (систематическую погрешность). Все клинические лаборатории должны участвовать в системе НВОК (Национальная программа внешнего контроля качества).

**Внутрилабораторный контроль качества (далее-ВЛК).** **ВЛК** – это объективная проверка результатов, постоянно осуществляемая непосредственно в лаборатории, в том числе путем алгоритмов оценки измерений контрольных материалов преимущественно с целью оценить их воспроизводимость (случайную погрешность). Иначе говоря, ВЛК представляет собой оперативный контроль результатов до их передачи для клинического использования, а ВОК является ретроспективной оценкой результатов после их клинического использования. Правильность результатов оценивается с помощью ВОК, и далее лабораторный работник должен полагаться на их воспроизводимость, которую отражает ВЛК.

Правила проведения ВЛК подробно описаны в МР «Обеспечение качества иммуноферментного анализа вирусных гепатитов», Астана, 2007г.

Полноценный контроль качества в каждой лаборатории – это обязательное сочетание внутрилабораторного контроля и внешней оценки качества. Они дополняют друг друга и создают единую систему управления аналитическим качеством в лаборатории. Участие в программах внешней оценки качества не заменяет проведение внутрилабораторного контроля и наоборот.

Процедура ВЛК основана на ежедневном измерении контрольного материала в рамках рутинной процедуры тестирования. Обязательным условием проведения иммунологического анализа является анализ контрольных материалов. Контрольные материалы включаются в каждую серию анализа.

**Контрольные материалы (далее-КМ).** КМ – это максимально приближенный к человеческому образцу, в идеале изготовленный из биологических жидкостей человека. КМ должны анализироваться так же, как пробы пациентов. Они могут быть жидкими или лиофилизированными и содержать один или более известных аналитов (обычно КМ содержат множество различных аналитов). КМ нормального уровня содержит нормальные концентрации определяемого аналита. КМ патологического уровня содержит повышенное или сниженное по сравнению с нормальными значениями количество аналита.

При ВЛК используются КМ с аттестованными и неаттестованными значениями контролируемых показателей. Аттестованным значением является значение измеряемой характеристики контрольного материала (концентрации вещества), установленное при его аттестации и приводимое в паспорте и других документах на контрольный материал. Для одного и того же показателя в документах на КМ может быть указано несколько значений отдельно по каждому методу измерения. КМ с аттестованными и неаттестованными значениями могут быть использованы для исследования воспроизводимости результатов.

КМ должны соответствовать следующим требованиям:

- матрица, т.е. состав и свойства биологического материала, в котором находится измеряемый компонент (сыворотка крови, плазма, цельная кровь моча или другой биологический материал), предпочтительнее человеческого происхождения. Использование КМ животного или смешанного происхождения допускается, за исключением некоторых аналитических методов (ограничения указываются в инструкции производителя).
- уровни исследуемых компонентов в КМ должны соответствовать значениям показателей в нормальном и патологическом диапазоне; за нормальный принимается диапазон значений лабораторного показателя, соответствующий состоянию здоровья обследуемого, за патологический – диапазон, соответствующий состоянию болезни пациента.
- перечень компонентов в паспорте закупаемого КМ должен соответствовать исследуемым в лаборатории показателям.
- методы определения показателей в КМ должны соответствовать методам, применяемым в конкретной лаборатории.
- срок годности КМ после изготовления:
  - для аттестованных КМ при хранении лиофилизированных форм при 2–8 °С – более 1 года;
  - для неаттестованных КМ при хранении лиофилизированных форм при 2–8 °С – более 2 лет;
  - для жидких КМ (готовых к употреблению) при 2–8 °С – не менее 3 месяцев;



- после вскрытия флакона или восстановления лиофилизированных форм – 4–8 часов при 20–25 °С;
- время восстановления лиофилизированных форм – не более 30 минут.

### **3.1. Подготовка и использование компонентов набора. Режим хранения**

Распространенной ошибкой является неправильная подготовка и использование компонентов набора, а также нарушение режима его хранения. Рекомендации:

1. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
2. Открытые реагенты стабильны 30–60 дней при хранении от 2 до 8 °С в зависимости от типа набора.
3. Не смешивайте реагенты из наборов разных серий.
4. Перед началом работы все реагенты должны достичь комнатной температуры. При дробном использовании набора следует сократить до минимума нахождение растворов при комнатной температуре и, особенно, в открытом виде.
5. Для растворения лиофилизированных компонентов, а также для приготовления рабочих растворов из концентрированных препаратов, входящих в состав набора, необходимо использовать дистиллированную (или деионизированную) воду со значением рН, близким к нейтральному (не менее 6,0). Лيوфилизированные компоненты должны быть растворены не менее, чем за 10–15 мин. до использования, и раствор тщательно перемешивают – не менее 10 раз.
6. Перед использованием тщательно перемешать реагенты во флаконах. Отбирайте из флакона только необходимое количество реагентов. Никогда не сливайте излишки реагентов обратно во флаконы во избежание контаминации. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.
7. Перед вскрытием пакета с планшетом его следует выдержать при комнатной температуре примерно 30 мин. для предотвращения конденсации влаги на планшете. Если планшет разборный, и используются не все стрипы сразу, то после вскрытия оставшиеся стрипы следует немедленно поместить в пакет с влагопоглотителем и плотно его закрыть,
8. Для приготовления растворов используйте одноразовая посуда либо при невозможности тщательно вымытая посуда.
9. Избегайте попадания света на раствор хромогена и конъюгата.
10. Рабочие растворы конъюгата и субстрата обычно готовятся за 10–15 мин. до внесения в планшет (если нет особых указаний в инструкции к набору реагентов) в количестве, необходимом для анализа.

### **3.2. Практические советы по постановке иммунологического анализа**

1. Составьте схему расположения бланка, стандартов, контролей и образцов на планшете. Убедитесь, что все необходимые реагенты и образцы нагрелись до комнатной температуры.
2. Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов (например, 2 образца внесены в одну лунку), нельзя, удалив сыворотку из этой лунки, вносить в нее новый образец, необходимо забраковать лунку, например путем заклеивания.
3. Каждый из исследуемых образцов следует вносить, используя новый наконечник для пипетки.
4. Следите за точностью пипетирования. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации, вносите реагенты с одной и той же скоростью.
5. Оптимизируйте промывание и режим работы с микропланшетом. Слишком интенсивное удаление жидкости вошером может подсушить белковое покрытие в ячейке, инактивировав его, а слишком слабое приведет к тому, что останутся капельки жидкости. Не оставляйте ячейки сухими между стадиями добавления реагентов. Если в ходе работы возникли непредвиденные задержки, заполните ячейки промывающим раствором.
6. Рекомендуется, чтобы все образцы анализировались в дублях.
7. Одной из причин получения неудовлетворительных результатов при использовании твердофазных наборов является использование шейкеров-инкубаторов, которые не обеспечивают необходимую интенсивность встряхивания. Наборы некоторых производителей не требуют использования шейкеров. Инкубация проводится без встряхивания при комнатной температуре или при 37 °C в термостате.
8. Температурный режим инкубации также является фактором, оказывающим влияние на протекание иммунохимической реакции в лунке. Низкая температура в лаборатории (менее 18 °C) приводит к тому же результату, что и плохое встряхивание.
9. Во время инкубации необходимо заклеить микропланшет адгезивной пленкой или закрыть крышкой, за исключением стадии инкубации с субстратом (только с помощью крышки!).
10. Инкубируйте планшеты с субстратом в темноте, этим Вы сможете избежать краевых эффектов на планшете. в Вашего оборудования путем верификации.
11. Необходимо наличие постоянно действующей внутрилабораторной системы контроля качества анализов и участие лаборатории в системе внешнего контроля качества анализов.
12. Для лабораторий с небольшим объемом исследований важно, чтобы после вскрытия набора его компоненты оставались стабильными длительное время. Необходимо учитывать, что, как правило, после вскрытия набор стабилен не более 1–2 месяцев.

## Глава 4. Динамика и интерпретация маркеров вирусных гепатитов

### 4.1. Характеризация ВГВ и ВГД инфекции

Для более детальной характеристики ВГВ-инфекции можно использовать ряд ВГВ-маркеров помимо HBsAg, таких как общий уровень анти-НВс и содержание анти-НВс IgM, HBeAg и a-HBeAg и поверхностному антигену вируса гепатита В (анти-НВс) (см. табл. 2). При одновременном определении этих маркеров можно составить профиль тестирования для дифференцирования острой и хронической инфекции, установления стадии заболевания и выявления тех пациентов, которым может быть показано лечение, для мониторинга прогрессирования заболевания или ответа на противовирусное лечение, а также определения показаний к первичной или повторной иммунизации против ВГВ.

Вслед за HBsAg в крови появляется HBeAg, который служит маркером высоких уровней репликации вируса. При острой ВГВ-инфекции, которая разрешается самостоятельно, происходит относительно ранняя сероконверсия HBeAg в анти-НВе, и при этом исчезают HBsAg и HBeAg. Однако при хронической ВГВ-инфекции сероконверсия в анти-НВе может откладываться на многие годы. При этом в крови либо устойчиво содержится HBeAg, либо не выявляются ни анти-НВе, ни HBeAg. Относительно рано в течение инфекции могут появляться антитела к сердцевинному антигену гепатита В (анти-НВс), нередко в течение недели или двух после появления HBsAg, что в типичных случаях характеризуется активным ответом иммуноглобулина(Ig)M анти-НВс, который стихает примерно через 6 месяцев (рисунок 1 и 2).

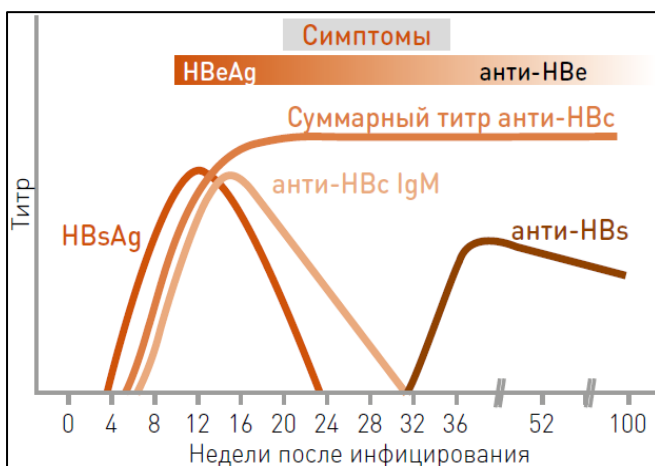


Рис 1. Острая ВГВ-инфекция

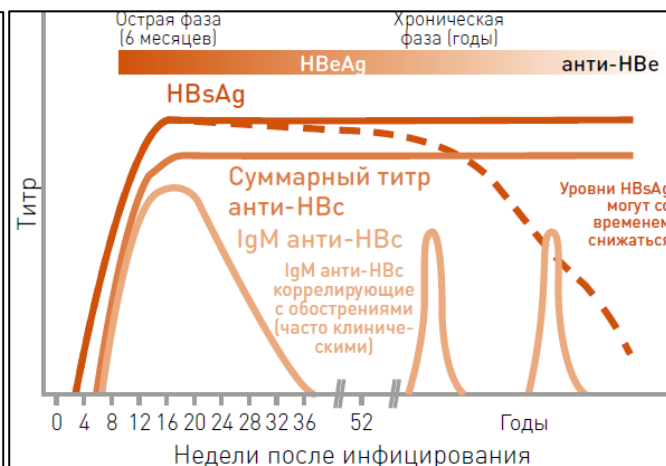


Рис 2. Хроническая ВГВ-инфекция

При устойчивом обнаружении HBsAg в течение свыше 6 месяцев ставится диагноз ХГВ. Ранее перенесенная ВГВ-инфекция характеризуется наличием антител (анти-НВс и анти-НВс). Иммуитет к ВГВ-инфекции после вакцинации характеризуется присутствием только анти-НВс. Следует также выяснять,

находится ли пациент в HBeAg-положительной или в HBeAg-негативной фазе инфекции, хотя в обоих случаях требуется мониторинг на протяжении всей жизни поскольку ситуация меняется со временем.

У лиц с хроническим гепатитом В (далее-ХГВ) положительный результат тестирования на HBeAg свидетельствует о высоком уровне репликации вируса и высокой степени контагиозности. Спонтанное улучшение может возникать после HBeAg-положительной сероконверсии (анти-HBe) со снижением репликации ВГВ и нормализацией уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ).

### Краткое описание маркеров ВГВ-инфекции

Таблица 2.

Маркер	Характеристики
HBeAg	<ul style="list-style-type: none"> <li>Первый серологический маркер, который появляется при ВГВ-инфекции (рисунок 1 и 2). Основной маркер, используемый для скрининга определенных групп населения с целью выявления лиц, инфицированных ВГВ.</li> <li>Период окна от момента инфицирования ВГВ до выявления HBeAg составляет примерно 38 дней, однако конкретная длительность зависит от аналитической чувствительности применяемой тест-системы, иммунологического статуса пациента и индивидуальной кинетики вируса</li> <li>Выявление HBeAg более 6 месяцев свидетельствует о формировании ХГВ</li> <li>Может наблюдаться скрытая ВГВ-инфекция, когда HBeAg не определяется, однако вне периода окна обнаруживается ДНК ВГВ</li> <li>Количественная оценка HBeAg – это потенциальный альтернативный маркер виремии, который можно использовать для мониторинга ответа на противовирусную терапию</li> </ul>
анти-HBc IgM*	<ul style="list-style-type: none"> <li>Отмечаются высокие уровни во время острой инфекции, могут обнаруживаться в течение вплоть до 6 месяцев</li> <li>Используется в целях дифференциального диагноза между острой и хронической ВГВ-инфекцией, однако повторное появление во время «пиков» печеночных проб в течении хронической ВГВ-инфекции делает его ненадежным индикатором недавней первичной ВГВ-инфекции (рисунок 2)</li> </ul>
Анти-HBc (общий титр)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Появляется примерно через 3 месяца после инфицирования и служит наиболее постоянным маркером инфекции</li> <li>Наряду с анти-HBs указывает на разрешившуюся инфекцию</li> <li>Присутствие анти-HBc (с наличием или отсутствием анти-HBs) также указывает на возможность реактивации процесса в условиях иммуносупрессии</li> </ul>
HBeAg	<ul style="list-style-type: none"> <li>Признак активной репликации вируса в печени</li> <li>Коррелирует с высокими уровнями ВГВ-виремии и поэтому является маркером «высокой контагиозности»</li> <li>Коррелирует с прогрессирующим течением болезни печени</li> </ul>
анти-HBe	<ul style="list-style-type: none"> <li>Отражает реакцию организма на HBeAg и обычно указывает на снижение содержания ДНК ВГВ и, следовательно, контагиозности</li> <li>Присутствует в фазах иммунного контроля и ускользания от иммунного ответа</li> <li>Может сосуществовать с HBeAg в течение периода сероконверсии от е-антигена к е-антителам в конце фазы иммунной толерантности</li> <li>Сероконверсия по HBeAg является признаком благоприятного течения заболевания и свидетельствует о снижении активности вирусной репликации.</li> <li>Встречаются мутантные штаммы ВГВ с нарушенным синтезом HBeAg. У</li> </ul>

	пациентов, инфицированных такими штаммами, несмотря на наличие анти-НВе, может наблюдаться высокий уровень репликации вируса и неблагоприятное течение заболевания.
Анти-НВс	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Нейтрализующие антитела, представляющие собой защиту от инфекции</li> <li>• Обнаруживаются после спонтанного исчезновения НВсАг (наряду с анти-НВс IgG)</li> <li>• Образуются при иммунизации и используются для мониторинга иммунного ответа на вакцинацию (анти-НВс отсутствуют)</li> <li>• Могут сосуществовать с НВсАг, поэтому их наличие не свидетельствует об отсутствии текущей инфекции</li> </ul>
анти-ВГД	антитела к дельта-антигену ВГД. Анти-ВГД класса IgM являются маркером острой инфекции. При ко-инфекции обнаруживаются отсрочено (через 2-4 недели после появления клинических признаков ОГ) и циркулируют в крови в течение 3-4 месяцев. При суперинфекции выявляются уже к началу острого периода заболевания и могут циркулировать длительное время.
Анти-ВГД IgG	маркер как перенесенной, так и хронической инфекции ВГД.

*Анти-НВс – антитела к сердцевинному антигену вируса гепатита В;*

*Анти-НВс – антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В;*

*НВеАг – антиген е вируса гепатита В;*

*НВсАг – поверхностный антиген вируса гепатита В; Ig – иммуноглобулин.*

*\* Потенциальным последствием неправильной интерпретации положительного теста на IgM анти-НВс является то, что пациент с хронической ВГВ-инфекцией, у которого наблюдается обострение болезни печени, не получает своевременного противовирусного лечения, и хотя таких пациентов повторно обследуют через несколько месяцев для подтверждения изначального диагноза острой ВГВ-инфекции, значительная доля таких пациентов может выпасть из последующего наблюдения.*

Наиболее частые варианты сочетания маркеров ВГВ при различных формах ГВ и в разные фазы хронической инфекции представлены в таблице 3.

### **Результаты лабораторных исследований при различных вариантах инфекции, вызванной ВГВ.**

**Таблица 3.**

Маркер	ОГВ	Перенесенный ГВ	Иммунитет после вакцинации	Фаза иммунной толерантности	ХГВ, НВеАг-позитив	ХГВ, НВеАг-негатив	Носительство ВГВ	Латентная ВГВ - инфекция
НВсАг	+	-	-	+	+	+	+	-
Анти-НВс	-	+	+	-	-	-	-	-
Анти -НВс- IgG	-/+	+	-	+	+	+	+	+/-
Анти -НВс- IgM	+	-	-	-	-	-	-	-
НВеАг	+/-	-	-	+	+	-	-	-
Анти -НВе	-/+	+	-	-	-	+	+	-

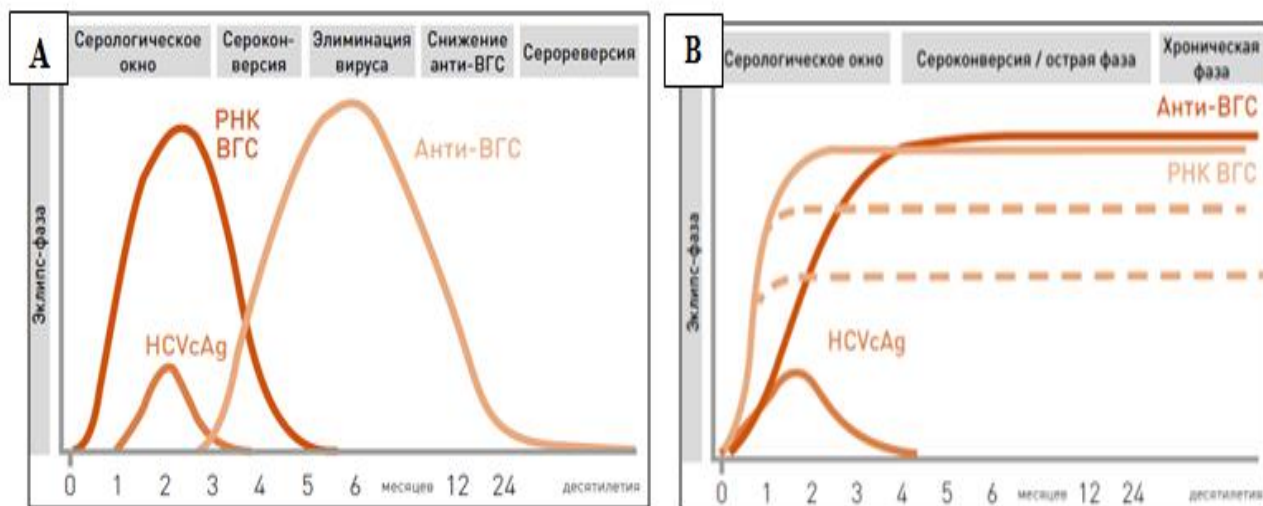
## 4.2. Подтверждающие тесты на HbsAg

Подтверждение положительного теста на HBsAg – тест на основе реакции нейтрализации, в котором требуется подтвердить, что выявленная антигенная реактивность образца нейтрализуется при повторном тестировании того же биологического образца на той же тест-системе при включении в лабораторный иммуноанализ этапа нейтрализации с добавлением к образцу специфического реагента, содержащего антитела к HBsAg. Результат считается подтвержденным, если добавление этого нейтрализующего реагента приводит к исчезновению реактивности теста по сравнению с контрольным образцом.

## 4.3. Динамика серологических маркеров ВГС-инфекции

Точная динамика вирусологических и иммунологических маркеров ВГС-инфекции недостаточно определена, особенно в течение первых месяцев инфекции вследствие индивидуальных различий в иммунном ответе конкретных пациентов, характеристик инфицирующего вируса и чувствительности применяемых тест-систем. Как показано на рисунке 3, после первоначальной эclipse-фазы длительностью 1–2 недели, когда не выявляются никаких вирусологических или серологических маркеров инфекции, естественное течение ВГС-инфекции характеризуется появлением РНК ВГС, затем сердцевинного антигена p22 Ag и отсутствием иммунного ответа с появлением антител в течение последующих 6–10 недель. Было показано, что у определенной доли пациентов в течение этого серологического окна может появляться свободный, то есть не связанный с антителами сердцевинный антиген ВГС (HCVcAg). После развития серологического ответа с продукцией антител, HCVcAg становится связанным с этими антителами, специфичными для ВГС.

Период окна. Тесты, разработанные исключительно для выявления антител к ВГС, неминуемо имеют период окна контагиозности в раннем периоде инфекции в течение которого антитела могут не выявляться. Этот период можно сократить, используя тест-системы, включающие прямое выявление HCVcAg (50–60 дней). Тестирование на РНК ВГС, как правило, не используется для выявления контакта с ВГС, даже несмотря на более короткий период окна (1–2 недели после начала острой инфекции), главным образом по причине высокой стоимости. Поступает все больше сообщений о скрытой ВГС-инфекции, то есть когда РНК ВГС выявляется в отсутствие каких-либо серологических маркеров (серонегативный ВГС), что может быть связано с наличием иммуносупрессии, например, в ВИЧ-инфицированных группах.



**Рисунок 3. Приблизительная динамика вирусологических и иммунологических маркеров ВГС-инфекции при (А) саморазрешающейся ВГС-инфекции и (В) хронической ВГС-инфекции**

#### **4.4. Тестирование на сердцевинный антиген ВГС (p22)**

Установить наличие вирусемической стадии инфекции возможно не только с помощью методик NAT, но и посредством тестирования на HCVcAg – нуклеокапсидный белок ВГС (p22), который выделяется в плазму крови во время сборки вируса и обнаруживается с самого начала и на всем протяжении ВГС-инфекции. Методы серологического тестирования на HCVcAg представляются не такими дорогостоящими и централизованными, как тесты NAT, однако данных об их применении в условиях с ограниченными ресурсами пока недостаточно. В настоящее время доступны несколько коммерческих тест-систем для изолированного выявления HCVcAg. Кроме того, поскольку HCVcAg начинает обнаруживаться раньше, чем антитела к ВГС, в серологических тест-системах четвертого поколения для выявления антигенов и антител ВГС также применяется тестирование на HCVcAg, используемый в качестве дополнительного маркера ВГС.

Поскольку HCVcAg появляется в крови раньше, чем антитела к ВГС (через 1–2 дня после появления РНК ВГС), а высокая специфичность тестов на HCVcAg избавляет от необходимости проводить дальнейшее подтверждающее тестирование, это открывает возможности в будущем использовать тесты на HCVcAg в качестве одноэтапного скринингового теста на ВГС.

#### **4.5. Подтверждающие тесты на антитела к ВГС**

Подтверждение положительного теста на антитела к ВГС – линейный иммунный анализ, который относится к серологическим тестам, используемым для подтверждения наличия антител к ВГС, обнаруженных с помощью других методик серологического анализа. Использование подтверждающих тестов

должно обеспечивать получение окончательного результата лабораторной диагностики, хотя они более дорогостоящие, чем другие тесты, и их результаты чаще бывают неопределенными. Подобные тесты подтверждают лишь серологический статус обследуемого и не могут использоваться для диагностики активной ВГС-инфекции в вирусемической стадии

### **Заключение**

Признавая огромное значение вирусных гепатитов, Всемирная ассамблея здравоохранения в 2015 году приняла резолюцию WHA69.22, призывая применять комплексный подход к профилактике вирусных гепатитов и борьбе с ними. Методы специфической лабораторной диагностики вирусных гепатитов все время совершенствуются, перечень маркеров инфицирования расширяется, и правильная интерпретация их сочетаний позволит врачам быстро оценить результаты лабораторных исследований и назначить больному лечение. В связи, с чем необходимо обеспечить качественную и своевременную диагностику вирусных гепатитов.

Данный документ согласован с самыми последними рекомендациями ВОЗ и опирается на данные о методах и стратегиях организации диагностики и тестирования на вирусные гепатиты, обеспечивая наличие и доступность качественных услуг по диагностике и тестированию.

Поскольку раньше в Казахстане не проводились исследования по референсному анализу методик серологической и молекулярно-генетической диагностики вирусных гепатитов применяемых на территории Республики Казахстан, разработанная методическая рекомендация будет служить в качестве методической помощи лабораториям при проведении диагностики вирусных гепатитов.

Филиал «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ» МЗ РК будет регулярно обновлять, и распространять рекомендации по существующим подходам к проведению тестирования на вирусные гепатиты, включая модели интегрированного и ориентированного на нужды людей предоставления услуг, а также оказание услуг по тестированию на вирусные гепатиты вне медицинских учреждений.



## Список использованных источников

1. Global, regional and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385:117–9. doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2.
2. Hope VD, Eramova I, Capurro D, Donoghoe MC. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol Infect*. 2014;142(2):270–86. doi:10.1017/S0950268813000940.
3. Отчет об отдельных инфекционных и паразитарных заболеваниях населения Республики Казахстан, форма №1 КООЗ МЗ РК
4. Руководство ВОЗ по тестированию на гепатиты В и С, февраль 2017 г.
5. Biswas R, Tabor E, Hsia CC, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003;43:788--98.
6. Клинический протокол РЦРЗ МЗ РК – 2015 «Острые вирусные гепатиты В, D и С у взрослых».
7. Клинический протокол РЦРЗ МЗ РК – 2017 «Хронический вирусный гепатит В у взрослых».
8. Сокурова А. М. Специфическая лабораторная диагностика вирусных гепатитов// ПЕДИАТР ТОМ V № 3 2014
9. МУ 3.1.2792–10 «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за гепатитом В».
10. Пименов Н.Н., Чуланов В.П., Комарова С.В. и др. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2012. — № 3. — С. 4–9.
11. Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О. и др. Протокол диагностики и лечения больных вирусными гепатитами В и С // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2010. — Т. 20, № 6. — С. 4–60.
12. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика). М. : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. 384 с.
13. AASLD/IDSA/IAS-USA. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. URL. [www.hcvguidelines.org](http://www.hcvguidelines.org). Accessed on January 29, 2014.
14. Aitken C.K. et al. Consecutive infections and clearances of different hepatitis C virus genotypes in an injecting drug user // *J. Clin. Virol*. 2008. Vol. 41, N 4. P. 293–296.
15. 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.

16. 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.
17. Candotti D., Lin C.K., Belkhiri 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. 61 (12): 1744–53.
18. Carman W.F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus // *J. Viral Hepat.* 1997. Vol. 4. P. 11– 20.
19. 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.
20. 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.* 2013.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Hughes S.A., Wedemeyer H., Harrison PM. Hepatitis delta virus // *Lancet.* 2011. Vol. 378, N 9785. P. 73-85.
26. 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.
27. Kao J. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers // *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2008. Vol. 4. P. 553–562.
28. Li L., Chen P.J., Chen M.H., Chak K.F. et al. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus // *Transfusion.* 2008 Jun. Vol. 48, N 6. P. 1198–1206.
29. 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.
30. Mederacke I., Bremer B., Heidrich B. et al. Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics // *J. Clin. Microbiol.* 2010. Vol. 48. P. 2022–2029.

31. К.К. Кюрегян, А. Дьяррассуба, М.И. Михайлов. Лабораторная диагностика вирусных гепатитов // инфекционные болезни: новости, мнения, обучение №2 2015
32. Pollicino T., Raimondo G., Navarra G. et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease // J. Hepatol. 2008. Vol. 5. P. 743–746.
33. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after // J. Hepatol. 2009. Vol. 50. P. 1043–1050.
34. Sagnelli E., Sagnelli C., Pisaturo M., Macera M. et al. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy // World J. Gastroenterol. 2014. Vol. 20, N 24. P. 7635–7643.
35. Seo D.H., Whang D.H., Song E.Y., Han K.S. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion // World J. Hepatol. 2015. Vol. 7, N 3. P. 600–606.
36. Tillmann H.L. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection // World J. Gastroenterol. 2007. Vol. 13. P. 125–140.
37. WHO: Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. Geneva. : World Health Organization, 2015.
38. Zachou K., Yurdaydin C., Drebber U. et al., for the HDT-1 Study Group. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis // Liver Int. 2010. Vol. 30. P. 430–437.

## Информация об авторах и рецензентах

**Название МР:** Серологическая диагностика 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 общественного здравоохранения	Заведующая референс лабораторией по контролю за вирусными инфекциями НПЦСЭЭиМ	gnusupbaeva@mail.ru	+77014945664
2	Тлеумбетова Н.Ж.		Врач –вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями НПЦСЭЭиМ	NN_Nazym@mail.ru	+77783308607
3	Муталиева А.С.	Магистр медицинских наук	Врач –вирусолог референс лаборатории по контролю за вирусными инфекциями НПЦСЭЭиМ	aknyr.kz@mail.ru	+77072410788

### 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