

полученных праймеров и зонда для мультиплексного анализа, что предполагается выполнить в дальнейшем.

ВЫВОДЫ

1. Был осуществлен дизайн праймеров и зонда TaqMan® для детекции норовирусов GI с применением ПЦР в режиме реального времени с учетом известных технических сложностей разработки тест-системы для детекции данного возбудителя.

2. В результате оптимизации разработанной тест-системы были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР-РВ – температурный режим и концентрация праймеров и зонда.

3. Результаты исследований на ограниченной выборке с экспериментальной тест-системой полностью сошлись с результатами для «золотого стандарта», показав валидность предлагаемого метода.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Global prevalence and genotype distribution of norovirus infection in children with gastroenteritis: A meta-analysis on 6 years of research from 2015 to 2020 / M. Farahmand, M. Moghoofoei, A. Dorost [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2021. – Vol. 32, № 1. – P. 2237–2255.
2. Single-step RT-PCR assay for dual genotyping of GI and GII norovirus strains / P. Chhabra, H. Browne, T. Huynh [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2021. – Vol. 134. №104689. – P. 145–159.
3. Норовирусная инфекция (обзор литературы) / Н.И. Хохлова, Д.В. Капустин, Е.И. Краснова [и др.] // *Журнал инфектологии*. – 2018. – Т. 10, № 1. – С. 5–14.
4. Эпидемиологическая характеристика норовирусной инфекции / А.А. Косова, В.И. Чалапа, Т. М. Итани, [и др.] // *Уральский медицинский журнал*. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 114–128.
5. Kulis-Horn R.K. Evaluation of a laboratory-developed test for simultaneous detection of norovirus and rotavirus by real-time RT-PCR on the Panther Fusion® system / R.K. Kulis-Horn, C. Tiemann // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 39, № 1. – P. 103–112.
6. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus / J. Vinjé // *Journal of Clinical Microbiology*. – American Society for Microbiology (ASM), 2015. – Vol. 53, № 2. – P. 373–381.
7. Etiological Role of Viruses in Outbreaks of Acute Gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005 / S. Svraka, E. Duizer, H. Vennema [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. – Vol. 45, № 5. – P. 1389–1394.
8. Vester B. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA/ B. Vester, J. Wengel // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43, № 42. – P. 13233–13241.
9. Redesigned Duplex RT-qPCR for the Detection of GI and GII Human Noroviruses / D. Liu, Z. Zhang, Q. Wu [et al.] // *Engineering*. – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 442–448.
10. Молекулярно-генетическая характеристика и филогенетический анализ возбудителей норовирусной инфекции человека на территории Свердловской области за 2022 год / Р.О. Быков, Т.М. Итани, В.И. Чалапа [и др.] // *Сборник статей VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов “Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения”*. – Екатеринбург, 2023. – С. 1921–1926.

Сведения об авторах

А.К. Патрушева* – студент магистратуры
В.И. Чалапа – научный сотрудник лаборатории
Т.М. Итани – ведущий научный сотрудник

Information about the authors

A.K. Patrusheva – Student
V.I. Chalapa – Researcher
T.M. Itani – Senior Researcher

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
AnaSPK@yandex.ru

УДК 616-036.22

ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ НОСИТЕЛЕЙ HBSAG

Сторожев Александр Анатольевич¹, Питерский Михаил Валерьевич¹, Кухаркин Владимир Николаевич², Альбрехт Ирина Львовна²

¹ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия

²ГАУЗ СО «ГКБ № 14»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. В настоящее время скрининговые лаборатории в основном проводят исследование образцов крови на маркеры вирусного гепатита В (ГВ) высоко специфичными серологическими методами, например, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Однако серологические тесты, такие как ИФА, могут демонстрировать

дискордантные результаты у инфицированных в период «серонегативного окна», при оккультной форме ГВ. Такие ошибки могут стать причиной развития посттрансфузионного гепатита и поражения печени у реципиентов, поэтому для скрининга крови и донорских органов на наличие ВГВ одного только теста на HBsAg недостаточно, необходимо также применение высокочувствительных методов выявления ДНК ВГВ. ПЦР является перспективным методом для преодоления недостатков серологических методов. **Цель исследования** – определить выявляемость ДНК ВГВ среди лиц с положительными результатами ИФА на HBsAg. **Материал и методы.** Для исследования в 2023 году был отобрано 120 HBsAg-положительных образцов плазмы крови жителей Орджоникидзевского района города Екатеринбург. Присутствие HBsAg определяли с помощью набора ГепатитИФА-HBsAg («Алкор Био», Россия). Выделение нуклеиновых кислот проводилось набором «АмплиСенс® РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (РТ-ПЦР) – «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). **Результаты.** Среди 120 HBsAg-положительных образцов ДНК ВГВ была выявлена в 87 (72,5%) образцах. Наблюдаются дискордантные результаты между ИФА на HBsAg и РТ-ПЦР на ДНК ВГВ в 17,1% случаев (18 образцов). **Выводы.** ДНК ВГВ характеризуется высокой частотой встречаемости среди лиц с положительными результатами ИФА на HBsAg.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, ВГВ ИФА, ПЦР, HBsAg

DETECTABILITY OF HEPATITIS B VIRUS DNA AMONG HBSAG CARRIERS

Storozhev Alexander Anatolievich¹, Pterskiy Mikhail Valerievich¹, Kuharkin Vladimir Nikolaevich², Albrekht Irina Lvovna²

¹FSRIVI «Virome» Rospotrebnadzor

²Municipal Clinical Hospital № 14

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Currently, screening laboratories mainly carry out the examination of blood samples for HB markers by highly specific serological methods, for example, using enzyme immunoassay (ELISA). However, serological tests, such as ELISA, can show discordant results in infected people during the "seronegative window", with the occult form of HBV. Such errors can cause the development of posttransfusion hepatitis and liver damage in recipients, therefore, for screening blood and donor organs for the presence of HBV, the HBV test alone is not enough, and the use of highly sensitive methods for detecting HBV DNA is also necessary. PCR is a promising method to overcome the disadvantages of serological methods. **The aim of the study** is to determine the detectability of HBV DNA among individuals with positive ELISA results on HBsAg. **Material and methods.** In 2023, 120 HBsAg-positive blood plasma samples from residents of Ordzhonikidze district of Yekaterinburg were selected for the study. The presence of HBsAg was determined using the «HepatitisEIA-HBsAg» (Alkor Bio, Russia). Nucleic acids were isolated using the «AmpliSens® RIBO-sorb» kit (FSRIVI CRIE of Rospotrebnadzor, Russia), real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) – «AmpliSens® HBV-FL» (FSRIVI CRIE of Rospotrebnadzor, Russia). **Results.** Among 120 HBsAg-positive DNA samples, HBV was detected in 87 (72.5%) samples. Discordant results were observed between ELISA on HBsAg and RT-PCR on HBV DNA in 17.1% of cases (18 samples). **Conclusion.** HBV DNA is characterized by a high frequency of occurrence among individuals with positive ELISA results for HBsAg.

Keywords: laboratory diagnosis, HBV, ELISA, PCR, markers of infection, HBsAg

ВВЕДЕНИЕ

В 2022 году в Свердловской области зарегистрировано 47 случаев ХГВ, показатель составил 1,12 на 100 тысяч населения, случаев заболеваемости острой формой не зарегистрировано [1]. В настоящее время скрининговые лаборатории в основном проводят исследование образцов крови на маркеры ГВ, вызываемого ВГВ, высоко специфичными серологическими методами, например, с помощью ИФА. Принятый в нашей стране лабораторный скрининг населения, медицинских работников и доноров крови включает в себя определение единственного серологического маркера – поверхностного антигена ВГВ (HBsAg) – и подтверждение его в случае положительного результата с помощью конфирматорного теста [2]. HBsAg появляется в крови примерно в течение шести недель (1-10 недель) после первого контакта с вирусом. Однако, после инфицирования может развиваться оккультная форма хронического гепатита В (ОХГВ), при которой HBsAg не определяется, а уровень виремии (если вирус обнаруживается в крови), как правило, низкий (менее 200 МЕ/мл) [3]. Таким образом, серологические тесты, например, ИФА, могут демонстрировать дискордантные результаты у инфицированных в период «серонегативного окна» и у больных ОХГВ поскольку в их крови маркеры инфекций отсутствуют.

Выявление HBsAg не всегда говорит об активном инфекционном процессе, и требуются дополнительные маркеры, подтверждающие репликацию ВГВ и высокую эпидемиологическую опасность для пациента. Таким маркером может выступать ДНК ВГВ в периферической крови [4]. ДНК ВГВ начинает обнаруживаться в крови в среднем через месяц после инфицирования и является первым диагностическим маркером ГВ, опережая появление HBsAg на 10–20 дней за исключением случаев неактивного носительства.

Невыявление HBsAg у больного ГВ представляет собой опасность как для здоровья пациента, так и реципиентов крови или органов. Поэтому для скрининга крови на наличие ВГВ одного только теста на HBsAg недостаточно, необходимо использование высокочувствительных методов выявления ДНК ВГВ [5]. ПЦР является перспективным методом для преодоления недостатков серологических методов. Вместе с тем, возможно развитие неактивного носительства ВГВ, характеризующееся наличием HBsAg в крови и низкий или не определяемый уровнем ДНК ВГВ [6].

Цель исследования – определить выявляемость ДНК ВГВ среди лиц с положительными результатами ИФА на HBsAg.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования в 2023 году был отобран 120 HBsAg-положительных образцов плазмы крови жителей Орджоникидзевского района города Екатеринбург, проходивших диспансеризацию или подготовку к госпитализации в ГАУЗ СО «Городская клиническая больница № 14». Средний возраст пациентов составил 55 (МКИ: 38,2 – 72,3) лет, среди них 45 мужчин и 58 женщин. Присутствие HBsAg определяли с помощью набора ГепатитИФА-HBsAg («Алкор Био», Россия). Заявленная аналитическая чувствительность набора составляет 0,05 МЕ/мл, диагностическая чувствительность 100%, диагностическая специфичность 99,5%.

Выделение нуклеиновых кислот проводилось набором «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (РТ-ПЦР) проводилась с использованием набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Заявленная чувствительность набора составляет 100 МЕ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявляемость ДНК ВГВ среди 120 образцов, содержащих HBsAg, составила 72,5% (87 проб, 95 % ДИ: 62,5% – 80,7%) образцов (рис. 1).



Рис. 1. Выявляемость ДНК вируса гепатит В среди носителей HBsAg. ДНК ВГВ+ – образцы, содержащие ДНК ВГВ, ДНК ВГВ– – образцы, не содержащие ДНК ВГВ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие ДНК ВГВ в плазме крови в основном совпадает с присутствием HBsAg, что согласуется с ранее опубликованным исследованием, в котором результаты ИФА и РТ-ПЦР совпадали в более половины случаев [7]. Несовпадение между результатами РТ-ПЦР и ИФА в 27,5% (33 образца) может быть вызвано поздней реконвалесценцией, а также неактивным носительством ГВ, характеризующимся наличием HBsAg в крови и низким или не определяемым уровнем ДНК ВГВ [6].

ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой частоте встречаемости ДНК ВГВ среди лиц с положительными результатами ИФА на HBsAg.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Свердловской области в 2022 году» : доклад Управления Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Свердловской области, Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» 2024 года. – 240 с.
2. Трехлетний опыт проведения скрининга HBV-инфекции у медицинского персонала с помощью маркеров HBsAg, анти-HBcore, aHBs / Л.Ю. Воеводская, Н.Д. Леонова, Т.В. Торовкова, А.Г. Золовкина // Журнал МедиАль. – 2019. – №1(23). – С. 36-37.
3. Guvenir, M. Hepatitis B Virus: From Diagnosis to Treatment / M. Guvenir, A. Arkan // Polish Journal of Microbiology. – 2020. – №69(4). – P. 391-399.
4. Жигалева О. Н. и др. Разработка набора реагентов с применением метода ПЦР для качественной идентификации ДНК вируса гепатита В // клиническая лабораторная диагностика. – 2023. – Т. 68. – №. 12. – С. 86-93.
5. Вальчугова, Л.М. Актуальность применения молекулярно-биологических методов (ПЦР) для выявления ДНК вируса гепатита В в серонегативной донорской крови при параллельном ИФА-скрининге на HBsAg / Л.М. Вальчугова, Ю.С. Вальчугова // Евразийский Союз Ученых. – 2019. – №5(60). – С. 4-6.
6. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В / В. Т. Ивашкин, Н. Д. Юшук, М. В. Маевская [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – Т. 3. – № 2. – С. 58-88.

Сведения об авторах

А.А. Сторожев* – младший научный сотрудник
М.В. Питерский – научный сотрудник
В.Н. Кухаркин – главный врач
И.Л. Альбрехт – начальник лабораторной службы

Information about the authors

A.A. Storozhev – Junior researcher
M.V. Piterkiy* – Researcher
V.N. Kuharkin – Chief Medical Officer
I.L. Albrecht – Head of the Laboratory Service

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

storogev_aa@niivirom.ru

УДК 616-093/-098

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДА И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ БИФИДО – И ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ОБРАЗЦАХ ФЕКАЛИЙ ДЕТЕЙ

Суслонova Анастасия Павловна¹, Корнилов Даниил Олегович², Тряпицын Михаил Андреевич², Симарзина Вероника Михайловна², Аминева Полина Геннадьевна^{1,4}, Зорников Данила Леонидович^{1,2}, Ворошилина Екатерина Сергеевна^{1,3}

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики,

²Лаборатория генетических и эпигенетических основ прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

³Медицинский центр «Гармония»

⁴Медицинский центр «Кволити Мед»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Бифидобактерии и лактобациллы — ключевые представители кишечной микробиоты детей. Определение содержания бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике традиционно проводили культуральным методом, в настоящий момент появился альтернативный подход - ПЦР в реальном времени. **Цель исследования** – сравнить результаты культурального метода и ПЦР в обнаружении бифидо- и лактобактерий в фекалиях детей. **Материал и методы.** 202 образца фекалий детей в возрасте от 0 до 14 лет, направленных для исследования на дисбактериоз кишечника в три разные лаборатории (кодированные как Л1, Л2, Л3), были одновременно исследованы культуральным методом и методом ПЦР. Для культивирования лактобактерий применяли лактобагар, бифидобактерий – бульон для бифидобактерий. ПЦР исследование проводили с использованием набора реагентов Энтерофлор Дети (ООО ДНК-Технология). **Результаты.** Бифидобактерии обнаруживали культуральным методом и методом ПЦР в 92,3%, 95,7% и 98,3% лабораторий 1, 2 и 3, соответственно. Доля дискордантных проб по лактобациллам составила 57,7%, 56,5% и 24,1% в лабораториях 1, 2 и 3, соответственно.