

DOI:10.26104/NNTIK.2022.93.65.022

Чолпонбекова Б.Ч., Юсупов Т.Т., Карабаев Б.Б.

**В ГЕПАТИТИН АНЫКТООЧУ ДОНОРДУК КАНДЫН
ИММУНОФЕРМЕНТТИК ЖАНА ИММУНОХИЛЮМИНЕСЦЕНТТИК
МЕТОДДОРУ МЕНЕН АНЫКТАЛГАН САЛЫШТЫРМА АНАЛИЗИ**

Чолпонбекова Б.Ч., Юсупов Т.Т., Карабаев Б.Б.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА ГЕПАТИТ В,
ВЫЯВЛЕННЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ И
ИММУНОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА**

B. Cholponbekova, T. Yusupov, B. Karabaev

**COMPARATIVE ANALYSIS OF DONOR BLOOD FOR HEPATITIS B
DETECTED BY ENZYME IMMUNOASSAY AND IMMUNE
CHEMILUMINESCENT METHODS OF ANALYSIS**

УДК: 631.867.5 (575.2) (04)

Вирустук гепатит азыркы мезгилде саламаттык сактоодо глобалдык көйгөй болуп эсептелет. Курч мүнөздөгү вирустук гепатиттер оорусунун Кыргыз Республикасындагы акыркы 40 жылдагы көрсөткүчтөрү жогору болуп, 100000 калкка 163,3-төн 1084,5-ке чейинки денгээлде сакталып турат. Кунүмдүк колдонулуп жүргөн эпидемиологиялык көзөмөлдөө системасы маалыматты толук камдуу чогултууну жана каттоону камсыз кыла албай, бул оорулардын таркалуусунун, өзгөчө өнөкөт вирустук гепатиттер, кан аркылуу таркалуучу вирустук гепатиттерден пайда болгон боордун цирроз жана рак ооруларынын жана алардан болгон өлүмдөрдүн чыныгы абалын көзөмөлдөөгө толук мүмкүндүк бере албай жатат. Макалa вирустук гепатиттерди (В) эпидемиологиялык көзөмөлдөө системасын мындан ары жакшыртуу максатында КР Республикалык Кан Борборунда донордук кандын ИФА жана ИХЛА методдору аркылуу аныкталуусунан салыштырма анализине арналды. Бул макала Жусуп Баласагын атындагы Кыргыз улуттук университетинин биология факультетинин биотехнология кафедрасынын магистрдик диссертациясынын алкагында жазылган. Бардык изилдөөлөр, анализдер жана жыйынтыктар Кыргыз Республикасындагы Республикалык кан борборунда жүргүзүлгөн.

Негизги сөздөр: донордук кан, вирус, гепатит В, маркерлер, диагностика.

Вирусный гепатит в настоящее время является глобальной проблемой здравоохранения. Заболеваемость острыми вирусными гепатитами в Кыргызской Республике за последние 40 лет высока и колеблется от 163,3 до 1084,5 на 100 000 населения. Существующая система эпидемиологического надзора не обеспечивает всестороннего сбора и регистрации данных, а также не в полной мере контролирует распространение этих заболеваний, особенно хронических вирусных гепатитов, цирроза и рака печени, вызванных гемотрансмиссивными вирусными гепатитами, и их смертность. Статья посвящена сравнительному анализу выявления маркеров гепатита В в донорской крови методами ИФА и ИХЛА в Республиканском центре крови Кыргызской Республики с целью дальнейшего совершенствования системы лабораторной диагностики за вирусными гепатитами В. Данная статья написана в рамках защиты магистерской диссертации на кафедре биотехнологии биологического факультета Кыргызского национального университета имени Жусупа Баласагына. Все исследования, проводились на базе лаборатории диагностики ВИЧ и гемотрансмис-

сивных инфекций Республиканского центра крови Министерства здравоохранения Кыргызской Республики.

Ключевые слова: донорская кровь, вирус, гепатит В, маркеры, диагностика.

Nowadays viral hepatitis is a global health problem. The incidence of acute viral hepatitis in the Kyrgyz Republic is high over the past 40 years, ranging from 163.3 to 1,084.5 for per 100,000 population. The current system of epidemiological surveillance does not provide comprehensive data collection and registration. Also it does not control the spread of these diseases fully, especially chronic viral hepatitis, cirrhosis and cancer of the liver caused by blood-borne viral hepatitis and their mortality. The article is devoted for the purpose of a comparative analysis of the detection of donor blood by ELISA and ICLA methods in the Republican Blood Center of the Kyrgyz Republic in order to further improve the epidemiological surveillance system for viral hepatitis B. This article was written as part of the defense of a master's thesis at the Department of Biotechnology of the Faculty of Biology of the Kyrgyz National University by Zhusup Balasagyn. All studies analysis and results were carried out at the Republican Blood Center in the Kyrgyz Republic.

Key words: donor blood, virus, hepatitis B, markers, diagnostics.

Актуальность темы: Основной проблемой трансфузиологии Кыргызстана является инфекционная безопасность донорской крови.

Как и другие республики Центральной Азии, Кыргызстан считается страной с относительно высоким уровнем заболеваемости вирусными гепатитами [1].

Многие инфекции, проходящие бессимптомно и сопровождающиеся вирусоносительством и следами пребывания патогенного вируса (так называемыми, вирусными маркерами) в кровяном русле, являются наиболее опасными при переливаниях крови. Для эффективной, быстрой и точной диагностики (ГТИ) в донорской крови необходимо выявить метод, который качественно и количественно будет превосходить другие методы [2].

Применение современных методов серологических исследований исключает заражение вирусными и бактериальными инфекциями, которые непосредственно могут передаваться при переливании инфици-

рованной крови. Качественно-диагностированная безопасная кровь спасает жизнь больного.

Материал и методы. Исследования, проводились на базе лаборатории диагностики ВИЧ и гемотрансмиссивных инфекций Республиканского центра крови Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Для сравнительного анализа донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции (гепатит В) было использованы иммунохемилюминесцентный (ИХЛА) и иммуноферментный (ИФА) методы анализа (рисунок 1).

В ИФА методе – принцип действия основан на твердофазном ИФА (одностадийный) «сэндвич» - вариант [3]. Для проведения серологических исследований вакутайнеры с образцами донорской крови центрифугировали в центрифуге (Nuve NF 400) при 4100 об/мин (15 мин).

За 30 мин до исследования вытащили из холодильника тест-систему на гепатит В (ДС-ИФА-НВsAg) и оставили при комнатной температуре 18-25⁰С.

Промывочный раствор в наборе реагентов содержит (ФСБ-Тх120,0 мл). Оттуда отлили 40,0 мл промывочного раствора в приготовленный цилиндр емкостью в 1 литр и добавили дистиллированную воду до 1 литра. Готовили рабочий раствор конъюгата по таблице для расходов реагентов.

В приготовленную плашку на 96 исследований внесли по 100 мкл контрольные образцы: в 4 лунки А1, В1, С1, D1 – К- (отр), Е1 – К+ (пол), F1, G1, H1 – К+ (слабопол). В остальные лунки внесли по 100 мкл сыворотки исследуемых образцов (рис. 2). Добавили по 50 мкл приготовленного рабочего раствора конъюгата, затем инкубировали в термошейкере (Thermo Shaker-BIOSAN) в течение 1 часа при 42⁰С – 500 об/мин. После инкубации установили плашку в отсек промывочного устройства вошера (Thermo SCIENTIFIC – WELLWASH) для промывания с установленной программой: 4 раза с дозированием 500 мкл, использовали приготовленный промывочный раствор. Далее удалили остатки влаги путем отстукивания по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге. После промывки во все лунки плашки внесли по 100 мкл приготовленного по таблице для расходов реагентов ТМБ – субстратного раствора. При этом происхо-

дит изменение окраски в лунках плашки. Выдерживаем 20 мин в защищенном от света месте при температуре от 18-25⁰С. После истечения времени, во все лунки внесли по 150 мкл Стоп – реагента и через 2-3 мин провели учет результатов на спектрофотометре (Thermo SCIENTIFIC- MULTISKAN FC) при длине волны 450/620 нм.

Во втором методе исследование вирусных маркеров проводили методом ИХЛА на анализаторе «Architect i2000SR». Для проведения серологических исследований вакутайнеры с образцами донорской крови для получения сыворотки центрифугировали в центрифуге (Nuve NF 400) при 4100 об/мин (15 мин) [4].

Для проведения исследования на анализаторе нужно провести ряд подготовительных этапов:

- проводим «Техническое обслуживание» анализатора, следуя инструкции.

- проверяем «Реагенты» и «Ресурсы».

Если реагент заканчивается, помещали во внутреннюю карусель анализатора готовые к использованию реагенты на гепатит В. Проверяем наличие жидкости Триггера и Пре-триггера и расходных материалов (реакционные ячейки, промывочный раствор буфера). Если они на исходе, также заменяли их.

Проводим ежедневный контроль анализатора, для этого использовали внутренние контрольные образцы (К -, и К+) на гепатит В «Architect НВsAg Qualitative П Controls». Устанавливаем данные контрольные образцы в штатив анализатора и вставляем в отсек прибора. После полученных результатов контролей, смотрим карту Леви-Дженинга, если полученные данные не выходят за контрольные пределы, мы проводим дальнейшее исследование образцов сывороток донорской крови.

В один блок для штативов поместили пять штативов по 5 пробирок достаточно отцентрифугированными образцами сывороток донорской крови. Итого 25 пробирок. С помощью сканера сканировали штрих код каждого исследованного образца и задали заказ на гепатит В с помощью компьютера. Далее вставили эти штативы с пробирками в групповой отсек анализатора для исследования. Анализатор забирает эти штативы и внутри прибора каждый штатив сканируется и закапываются образцы в реакционные ячейки.



Рис. 1. Лабораторное исследование методами ИХЛА на базе Республиканского Центра Крови МЗ КР.

Результаты. Сравнительный анализ донорской крови на гепатит В было исследовано двумя методами ИФА и ИХЛА.

На первом этапе исследования проводили методом **ИФА**: из **1043** образцов сывороток донорской крови **9** положительный и **1034** отрицательный.

На втором этапе – исследовали методом **ИХЛА**: из **1043** образцов сывороток донорской крови **11** положительный и **1032** отрицательный.

Отрицательные – это лица, у которых лабораторно установлено отсутствие маркеров инфекции.

Положительные – это лица, у которых выявлены положительные результаты тестов на инфекции с под-

тверждением согласно алгоритму, принятому регулирующими нормативными документами страны.

Неопределенный или сомнительный результат – результат, требующий повторного забора крови и цикла тестирования в соответствии с существующим алгоритмом.

Сомнительный (неопределенный) – причиной такого результата теста может быть наличие острых или хронических состояний (аутоиммунные заболевания, беременность, туберкулез, ревматизм, алкоголизм и другие причины) или этот результат свидетельствует о начальной стадии инфицирования. Требуется повторное обследование через 3-6 месяцев.

Таблица 1

Положительный результат на гепатит В (HBsAgQ2)

Тест HBsAgQ2	Кол-во	Пол.	Результаты	Дата
ИФА	1043	9	K<0.120 (Зн.ОП 0,037-0,057)	13.04-29.04.2022
ИХЛА	1043	11	0.13-0.17 S/CO Nonreactive	13.04-29.04.2022



Рис. 2. Лабораторное исследование методами ИФА на базе Республиканского Центра Крови МЗ КР.

Вывод. Сравнительный анализ донорской крови на гемотрансмиссивные инфекции (гепатит В) показало, что наиболее эффективным, точным методом является метод №2 (ИХЛА), которая обладает высокой пропускной способностью, имеет наличие программного обеспечения, позволяющего оценивать достоверность результатов, удобны в работе, широкий диапазон исследований. Стандартная скорость выполнения теста – 29 минут. Самое главное, исключается «человеческий фактор», что исключает ошибки.

Литература:

1. Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Михайлов М.И., Зверев В.В. Оценка доли гепатита в этиологической структуре острых вирусных гепатитов в отдельных регионах Кыргызстана». Клиническая лабораторная диагностика, 2019. - 12. - 64 с.
2. Белякова Вера Владимировна. «Совершенствование лабораторного тестирования для обеспечения вирусной безопасности аллогенных гемокомпонентов». / Диссертация на соис. уч. ст. канд. биол. наук. - Москва, 2014.
3. Джуманова Р.Г., Джумабаев М.Н., Калиев Р.Р. "О дисфункции эндотелия у больных хроническим гепатитом и циррозом печени". Известия вузов Кыргызстана (2017) 6: 43-46 с.
4. Суранбаева Г.С., Мурзаева А.Т., Нурматов З.Ш., Суранбаев С.Т., Усманов Р.К. Усовершенствование учета и регистрации хронических вирусных гепатитов в КР. / Известия вузов Кыргызстана. (2011) 6: 111-112 с.