

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ГЕМАТОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Туполева Татьяна Алексеевна

СТРАТЕГИЯ ПОВЫШЕНИЯ ВИРУСНОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
КОМПОНЕНТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

14.01.21 Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:

Савченко Валерий Григорьевич

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Москва, 2019 г.

Оглавление

Введение.....	4
Основная часть	14
Глава 1. Обзор данных литературы. Вирусные гепатиты В и С	14
1.1 Вирусы, вызывающие гепатит у человека	14
1.2 Вирус гепатита В	16
1.3 Вирус гепатита С	24
1.4 Лабораторная диагностика вирусных инфекций.....	32
1.4.1 Иммуноферментный анализ (ИФА)	35
1.4.2 Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)	36
1.4.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	38
1.5. Частная вирусологическая диагностика.....	44
1.5.1 Лабораторная диагностика вирусного гепатита В.....	44
1.5.2 Лабораторная диагностика вирусного гепатита С.....	46
1.6 Риск трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС	47
1.7. Латентные формы вирусных гепатитов	52
1.7.1. Латентная форма вирусного гепатита В (ЛГВ).....	52
1.7.2. Латентная форма вирусного гепатита С (ЛГС)	62
1.8. Вирусные гепатиты у пациентов с заболеваниями системы крови.....	66
Глава 2. Материалы и методы.....	72
2.1. Дизайн исследования	72
2.2. Материал исследования	74
2.3. Методы исследования	77
2.4. Статистическая обработка данных	85
Глава 3. Результаты.....	87
3.1. Разработка требований к обеспечению качества ПЦР-исследований	87
3.2 Лабораторные факторы риска неполного выявления инфицированных вирусами гепатитов В и С компонентов крови доноров	89
3.3.Скрининг образцов крови доноров на анти-НВс как инструмент повышения безопасности трансфузий.....	103

3.4 Построение математических моделей и расчет эпидемиологических показателей по результатам проспективного исследования.....	113
3.5 Лабораторные маркеры вирусов гепатитов у пациентов с заболеваниями системы крови	120
3.6 Проведение эпидемиологического расследования случаев возможного инфицирования реципиента компонентов донорской крови вирусом гепатита В и/или С	125
Обсуждение.....	135
Заключение	150
Выводы	152
Список сокращений	154
Список литературы	156
Приложения	211
Приложение 1	211
Приложение 2	212
Приложение 3	214

Введение

Актуальность темы исследования

Актуальность проблемы вирусных гепатитов у реципиентов компонентов крови определяется полиэтиологичностью, высокой заболеваемостью, трудностью дифференциальной диагностики, недостаточностью профилактических мер. Вирус гепатита В (ВГВ) является наиболее распространенной причиной цирроза и первичного рака печени. ВГВ чрезвычайно контагиозен. При вирусном гепатите С хронизация наблюдается в 85% случаев [160, 161, 166, 397]. Хотя заражающая доза у вируса гепатита С (ВГС) намного выше, чем у ВГВ, а средства этиотропной терапии разрабатываются в последнее время довольно успешно, вирусный гепатит С по-прежнему остается серьезной гемотрансфузионной проблемой.

Благодаря национальному проекту в сфере здравоохранения, в рамках которого проводится массовая вакцинация против ВГВ в России, заболеваемость острыми формами гепатита заметно снизилась и в 2011 г. составляла 2,7 на 100 000 населения по сравнению со значениями 1999 г. (43,8 на 100 000 населения), однако заболеваемость хроническим гепатитом В выросла с 1999 по 2010 гг. с 9 до 14,4 на 100 000 населения [9]. На фоне снижения заболеваемости в Российской Федерации острыми формами гепатита С продолжает нарастать заболеваемость хроническим гепатитом С, при этом наблюдаются значительные колебания этого показателя по федеральным округам и отдельным субъектам Федерации. Регистрируемый в Российской Федерации показатель заболеваемости хроническим гепатитом С не отражает истинной заболеваемости, поскольку диагностика вирусного гепатита С основана на выявлении антител к вирусу. Необходимо внедрение прямых методов диагностики заболевания – выявление РНК вируса [44].

Высокая распространенность вирусных гепатитов в гематологическом стационаре обусловлена спецификой контингента больных [11]. Характер течения

болезни, длительность процесса, многократные госпитализации с применением инструментальных методов обследования, тактика и лечения с использованием иммуносупрессивных и гепатотоксических препаратов, многочисленные трансфузии компонентов и препаратов крови, – всё это позволяет отнести гематологических больных к группе высокого риска заболевания вирусными гепатитами. Риск трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС сохраняется, несмотря на системный подход к обеспечению безопасности компонентов крови, включающий селекцию безвозмездных добровольных доноров; применение современных технологий в производстве, таких как лейкоредукция и инаktivация патогенов; а также ограничительную тактику трансфузий, предполагающую недопущение клинически необоснованного применения компонентов крови. Риск трансфузионного инфицирования определяется, очевидно, недостаточным количеством детектируемых маркеров при лабораторном обследовании крови доноров, наличием негативного окна в ранние фазы заболевания, присутствием латентных форм вирусных гепатитов. Для диагностики инфекций, вызванных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и ВГС, открытых в конце XX века, используются комбинированные тесты, выявляющие одновременно как вирусные антигены, так и противовирусные антитела. Почему в XXI веке, несмотря на фундаментальные открытия в области вирусологии, рутинная диагностика ВГВ-инфекции традиционно базируется только на определении вирусного антигена (HBsAg), открытого еще в 1965 г., и не включает определение противовирусных антител?

Степень разработанности темы исследования

С кровью донора могут передаваться все инфекционные агенты, которые в ней находятся. ВГВ и ВГС являются наиболее изученными из них. Доказана опасность их трансфузионной передачи, созданы и непрерывно совершенствуются тесты, предназначенные для их идентификации. Все образцы крови доноров при каждой донации подлежат обязательному контролю на

наличие маркеров ВГВ и ВГС, но, несмотря на все меры безопасности, риск инфицирования реципиентов компонентов крови сохраняется.

В Российской Федерации обследование доноров крови на инфекционные маркеры регламентировано Приказом Минздрава РФ №364, согласно которому обязательным является проведения исследования на наличие сифилиса, поверхностного антигена ВГВ (HBsAg), антител к ВГС (анти-ВГС), вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типа (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) [48]. При латентной форме хронического вирусного гепатита В ДНК вируса находится в гепатоцитах, в плазме крови она содержится в очень низкой концентрации, а HBsAg не выявляется, что не позволяет осуществлять полную выбраковку инфицированных компонентов донорской крови тех случаях, если исследование ограничено регламентированными маркерами. При серопозитивном варианте латентной формы ВГВ-инфекции в крови циркулирую только антитела к ядерному белку вируса (анти-HBc), возможно, в сочетании с антителами к поверхностному антигену ВГВ (анти- HBs); при серонегативном варианте заболевания все антитела отсутствуют. Распространенность латентной ВГВ-инфекции среди доноров крови и ее компонентов на территории Российской Федерации достигает 2% [31]. Таким образом, для максимального выявления инфицированных ВГВ лиц среди доноров крови и ее компонентов необходимо дополнительное исследование образцов их крови на наличие антител к ядерному белку вируса.

Терапия заболеваний системы крови может приводить к глубокому угнетению гуморального и клеточного иммунитета, что обуславливает снижение минимальной заражающей дозы вируса и увеличение числа латентных форм вирусных инфекций. Реактивация латентных форм вирусных инфекций у таких пациентов в отдаленные сроки – не редкость и может приводить к летальному исходу. Для пациентов с заболеваниями системы крови характерны, как длительная, на протяжении всего времени лечения, иммуносупрессия, так и высокая потребность в гемокомпонентой терапии (в особенности в концентратов тромбоцитов), что диктует особые требования к безопасности донорской крови, предназначенной для этих пациентов. Таким образом, распространенность

вирусных гепатитов В и С среди доноров, в том числе и латентных форм инфекции, вышеперечисленные особенности больных заболеваниями системы крови и недостаточный набор маркеров вирусов гепатита В и С, на наличие которых исследуют образцы крови доноров, и, следовательно, возможность неполного выявления компонентов крови доноров, представляющих инфекционную опасность, определяют необходимость использования адекватного современного лабораторного инструментария для повышения вирусной безопасности гемотрансфузий.

Цель исследования

Разработать стратегию повышения вирусной безопасности трансфузий компонентов крови.

Задачи исследования

1. Разработка порядка обследования донорской крови и выбраковки компонентов крови по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры.
2. Анализ динамики выявления регламентированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров с 1999 по 2016 гг. и пациентов гематологического стационара с 2003 по 2016 гг.
3. Обоснование введения тестирования на наличие антител к ядерному антигену ВГВ образцов крови доноров.
4. Оценка частоты встречаемости маркера острой ВГВ-инфекции в образцах крови доноров, в которых выявлены антитела к ядерному и поверхностному антигенам ВГВ.
5. Определение критериев пулирования образцов крови доноров для проведения тестирования на наличие вирусных нуклеиновых кислот с точки зрения риска пропуска образцов с низкими концентрациями.

6. Анализ случаев обнаружения маркеров активной ВГВ- и ВГС-инфекции у ранее неинфицированных пациентов и проведение эпидемиологического расследования.
7. Разработка процедур и временных регламентов обследования больных при поступлении в гематологический стационар и во время лечения с целью выявления латентных форм заболевания и возможных новых случаев инфицирования.

Научная новизна

В работе впервые представлено решение актуальной проблемы - создание специальной трансфузиологии для больных заболеваниями системы крови за счет оптимизации лабораторного обследования доноров крови и ее компонентов на маркеры ВГВ и ВГС с применением современных высокочувствительных методов.

В результате выполнения настоящих исследований получены новые результаты, имеющие важное теоретическое и практическое значение. Оценена динамика частоты обнаружения регламентированных маркеров вирусов гепатитов В и С в образцах крови доноров и пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за последнее 16-18 лет. Разработан новый порядок обследования доноров крови и ее компонентов на наличие инфекционных маркеров. Показано, что компоненты крови доноров, содержащие анти-НВс и анти-НВs в защитном титре, в том числе и в высоком (более 100 мМЕ/мл), могут быть небезопасны. Выявлено, что концентрация ДНК ВГВ в образцах крови доноров в 66,67% случаев находится в диапазоне низких значений, а в 20% – на уровне чувствительности тест-систем. При внедрении в практику рутинного скрининга образцов крови доноров на наличие анти-НВс возможно проводить тестирование на ДНК в пулах из шести проб без угрозы неполного выявления инфицированных компонентов крови. Данное положение подтверждено отсутствием случаев появления маркеров вирусов гепатитов В и С у ранее неинфицированных реципиентов, ассоциированных с гемотрансфузиями, после введения нового порядка обследования доноров. Для уточнения наличия ВГВ-

инфекции у пациентов при первичном обращении необходимо исследовать кроме ДНК ВГВ также наличие антител к ядерному и поверхностному антигенам вируса, поскольку отсутствие данной информации не позволяет отличить реактивацию от свежего инфицирования и усложняет проведение расследования случаев возможного трансфузионного инфицирования реципиентов компонентов крови. Впервые разработана карта инициации эпидемиологического расследования и карта эпидемиологического расследования в рамках функционирования лабораторной информационной системы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная тактика лабораторного исследования донорской крови и, следовательно, производства вирусбезопасных компонентов крови способствует снижению риска возникновения посттрансфузионных вирусных инфекций у реципиентов, что приведет к увеличению эффективности лечения, продолжительности жизни и сокращению сроков пребывания в стационаре.

Основные положения диссертационной работы внедрены в практику лабораторного скрининга образцов крови доноров и пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Создан новый порядок обследования донорской крови и выбраковки компонентов по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры, введенный с 01.03.2014 года Приказом №61 от 03.04.2014 по ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

С ноября 2013 г. в практику ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России внедрено расследование случаев вероятного трансфузионного инфицирования вирусами гепатитов В и С, разработаны и внедрены в практику стандартная операционная процедура «Проведение эпидемиологического расследования случая возможного трансфузиологического инфицирования реципиента трансфузий компонентов донорской крови вирусом гепатита В и/или С» и регистрационная карта расследования случаев вероятного трансфузионного

инфицирования вирусами гепатита В и С пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии Минздрава России.

Разработана схема обследования пациентов при поступлении в гематологический стационар и во время лечения с целью выявления латентных форм заболевания и возможных новых случаев инфицирования.

В ходе проведения исследования после внедрения в рутинную практику нового порядка обследования донорской крови не было зарегистрировано случаев доказанного трансфузионного заражения ВГВ и ВГС ранее неинфицированных пациентов.

Материалы диссертационной работы используются для научных консультаций, при обучении ординаторов, аспирантов, медицинского персонала на семинарах, рабочих местах, циклах повышения квалификации.

Методология и методы исследования

Проведено аналитическое обсервационное эпидемиологическое исследование, включающее когортное ретроспективное и проспективное исследование.

В работе были использованы методы иммуноферментного и иммунохемилюминисцентного анализа, полимеразной цепной реакции.

Статистическая обработка данных произведена методами описательной и индуктивной статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Скрининговое тестирование на наличие антител к ядерному антигену вируса гепатита В образцов крови доноров рекомендовано в качестве рутинного теста, повышающего вирусную безопасность гемотрансфузий, поскольку обеспечивает дополнительное выявление инфицированных вирусом гепатита В лиц, а их отстранение не отражается на числе донаций.
2. Использование компонентов крови, содержащих антитела к ядерному антигену вируса гепатита В небезопасно даже при наличии антител к

поверхностному ядерному антигену вируса в высоком титре, поскольку в них обнаруживается маркер острой ВГВ-инфекции.

3. В комплексе с исследованием образцов крови на наличие антител к ядерному антигену вируса гепатита В показано проведение тестирования вирусных нуклеиновых кислот в пулах из 6 проб, поскольку это не приводит к снижению эффективности выявления инфицированных ВГВ компонентов крови.
4. Создан двухэтапный порядок проведения эпидемиологического расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования пациентов вирусами гепатитов В и С в рамках функционирования лабораторной информационной системы путем прослеживания пар «донор-реципиент».
5. При поступлении пациентов в гематологический стационар с целью выявления латентных форм вирусного гепатита, кроме регламентированных маркеров (HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС), необходимо исследование на наличие антител к ядерному и поверхностному антигенам вируса гепатита В.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы, вошедшие в диссертацию, доложены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины», посвященной 55-летию ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России» 6-7 октября 2015 г.; 23, 24, 25, 27 Региональных и 34 Международном Конгрессах международного общества по переливанию крови (International Society of Blood Transfusion - ISBT), Амстердам 2-5 июня 2013 г., Кулала Лумпур 1-4 декабря 2013, Лондон 27 июня - 1 июля 2015 г., Дубай 3-8 сентября 2016 г., Копенгаген 17 - 21 июня 2017 г.; на 3 - 5 Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и Службе крови» Санкт-Петербург, 13-14 ноября 2014 г.; 20-21

октября 2016 г., 29-30 ноября 2018 г.; VI съезде гематологов и трансфузиологов республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» Минск 24-25 мая 2007 г.; на гематологической школе «Инфекции при гемобластозах. Вирусные инфекции на фоне программной терапии гемобластозов и ТКМ», 13-14 февраля 2014 г.; 6-9 Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Молекулярная диагностика», Москва 28-30 ноября 2007 г., 24-26 ноября 2010 г., 18-20 марта 2014 г., 18-20 апреля 2017 г.; 12-ой и 13-ой Российской конференциях «Гепатология сегодня», Москва, 19-21 марта 2007 г., 17-19 марта 2008 г.; III и IV Конгрессах гематологов России 14-16 апреля 2016 г. и 12-14 апреля 2018 г.; конференции «Организация трансфузиологической помощи в многопрофильном стационаре», Ярославль, 27 апреля 2016 г.; 20 научно-практической конференции «Новое в трансфузиологии: нормативные документы и технологии» 18-20 мая 2016 г. Алушта; Научно-практической конференции в рамках II Совещания Экспертного Совета Национального гематологического общества по трансфузиологии, Москва, 24 апреля 2017 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», посвященная 85-летию Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, Санкт-Петербург, 6-7 июня 2017 г.; 1 Конгрессе трансфузиологов России, Владивосток, 1-2 октября 2018 г.

Публикации

Результаты исследований опубликованы в 18 печатных работах, из них 12 – включенных в текущий перечень ВАК (рецензируемых научных журналах).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 218 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 6-ти глав результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, указателя

литературы (71 отечественный и 349 зарубежных источников). Диссертация иллюстрирована 21 рисунком, 21 таблицей и содержит 3 приложения.

Автор выражает глубокую благодарность академику В.Г.Савченко, д.б.н. Ф.П.Филатову, д.м.н. Т.В.Голосовой за научную консультацию при подготовке диссертации, к.м.н. Т.В.Гапоновой, д.м.н. Г.М.Галстяну, д.б.н. А.Б.Сударикову, д.м.н. Т.Ц.Гармаевой, к.т.н. С.М. Куликову; а также коллегам и соавторам исследований: к.б.н. Д.С.Тихомирову, А.А.Гуляевой, Е.Н. Игнатовой, Е.Н.Овчинниковой, к.б.н. Н.Г.Ярославцевой, Т.Ю.Романовой, Р.Р.Абакарову, О.Н.Мисько, сотрудникам отделения клинической трансфузиологии – к.м.н. В.В.Журавлеву, к.м.н. М.Х.Азимовой, отделения заготовки крови и ее компонентов – А.В.Булгакову, А.А.Ахремцовой; и всем сотрудникам ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России – за помощь и поддержку.

Основная часть

Глава 1. Обзор данных литературы. Вирусные гепатиты В и С

Вирусные инфекции, вызывающие преимущественное поражение печени, несмотря на их разнообразие, характеризуются общими особенностями: это путь заражения через кровь (в первую очередь, донорскую), весьма сходная клиническая картина и множество инаппарантных, латентных и хронических форм.

1.1 Вирусы, вызывающие гепатит у человека

Известны, по крайней мере, девять различных вирусов гепатита, два из которых передаются преимущественно энтеральным путем – вирус гепатита А и вирус гепатита Е, а семь – парентеральным – вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита F, вирус гепатита G, SEN-вирус и ТТ-вирус [34,176]. Хотя вирусы гепатитов А и Е передаются преимущественно фекально-оральным путем, зафиксированы спорадические случаи передачи их при переливании крови [116, 149, 192, 283]. В настоящее время исследование крови доноров на маркеры вируса гепатита А не регламентировано [244]. Большинство зарубежных заготовителей и переработчиков плазмы введено тестирование пулов плазмы, которая предназначена для фракционирования, на наличие РНК этого вируса [45]. В ФБГУ РМНПЦ «Росплазма» ФМБА России с 2012 г. внедрено исследование РНК вируса гепатита А [45]. В Европе в настоящее время исследуются методы реализации ПЦР-скрининга вируса гепатита Е [145, 250]. Вирус гепатита D является сателлитом вируса гепатита В, который поддерживает формирование инфекционных частиц, необходим для сборки вирионов, и в отсутствие, которого инфекция протекает абортивно [336]. Сообщалось о существовании нового вируса, вероятно вызывающего гепатит (вируса гепатита F) [171, 172], однако данные о выделении из фекалий больных посттрансфузионным гепатитом вирусных частиц 27-37 нм диаметром, возможно,

вызывающих эту форму гепатита, пока не получили подтверждения [34]. Вирус гепатита G, по данным литературы [34], редко встречается в виде моноинфекции. В настоящее время общепринятого мнения о роли вируса гепатита G в патологии человека нет. Вопрос о причастности вирусов TT и SEN к возникновению гепатита также остается открытым [41]. В то же время, вирусные гепатиты В и С входят в перечень социально значимых заболеваний и перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих [46]. Кроме перечисленных, поражать клетки печени могут герпесвирусы: цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), герпесвирус человека 6 типа, реже вирус простого герпеса [176]. Все они могут попадать в организм реципиента гемотрансфузий.

С кровью могут передаваться любые инфекционные агенты, содержащиеся в ней. При гемотрансфузиях может происходить заражение вирусами гепатитов как с парентеральным (В, С, D), так и с энтеральным (А, Е) путем передачи [154, 357]. Перечень вирусов, передающихся с кровью, всегда может быть расширен за счет вирусов, опасность которых сегодня еще не ясна. В настоящее время наиболее опасны для пациентов с заболеваниями системы крови вирусы гепатитов В и С в силу высокой частоты встречаемости в популяции и тяжести вызываемых ими заболеваний.

Проблема вирусных гепатитов, по-прежнему, остается одной из центральных для здравоохранения всего мира [41]. Значительный объем информации о вирусных гепатитах В и С, накопленный в последние годы, позволяет сделать некоторые обобщения, изложенные в данном обзоре.

До рассмотрения методов, используемых для обнаружения различных антигенов, антител и нуклеиновых кислот вирусов гепатитов В и С, которые циркулируют в крови инфицированных лиц, необходимо понимание биологических и молекулярных характеристик, которые сопровождают эти инфекции [209].

1.2 Вирус гепатита В

Начало современного периода изучения вирусного гепатита В связано с обнаружением в 1965 г. поверхностного антигена гепатита В (HBsAg) – основного маркера вирусного гепатита В [108]. За это открытие американский исследователь Б. Бламберг получил Нобелевскую премию в 1976 г. [215]. Принципиально новая информация об этом заболевании была получена после обнаружения Д. Дейном в 1970 г. непосредственно возбудителя гепатита В (частицы Дейна) и его дальнейшего исследования.

ВГВ принадлежит к семейству *Hepadnaviridae*. Это -- гепатотропные ДНК-вирусы, способные заражать млекопитающих и обмениваться с хозяином большинством генетических структур [315]. ВГВ -- наименьший из всех ДНК-содержащих вирусов, поражающих человека, имеет очень компактный геном [178].

Вирионы имеют сферическую форму, их диаметр 42 нм, обладают липидной оболочкой, которая содержит поверхностный протеин - HBsAg (австралийский антиген) [107], состоящий из полипептидов Pre-S1, Pre-S2 и S (рисунок 1).

Pre-S регионы HBsAg выполняют важные функции. Pre-S1 “распознается” рецепторами гепатоцита, недавно определен основной рецептор для крепления Pre-S1 [403]. К Pre-S1 вырабатываются вируснейтрализующие антитела, нарушение их синтеза способствует хронизации инфекции. Антитела к Pre-S2 могут иметь значение для элиминации вируса. В зависимости от размера области Pre-S HBsAg называют L (Pre-S1, Pre-S2 и S), M (Pre-S2 и S) и S. Количество молекул L, M и S в оболочке вирионов снижается в порядке нарастания их величины. Основой дрожжевых вакцин является S-белок [400]. Белок оболочки содержит основную группоспецифическую антигенную детерминанту *a*. Он также содержит две дополнительные субдетерминанты *d/y* и *w/r*. Таким образом, в результате их комбинации образуются следующие 4 антигенных фенотипа: *adw*,

adr, *ayw*, *ayr*. Именно с антителами к групповой детерминанте α , в основном, связаны протективные свойства [243].

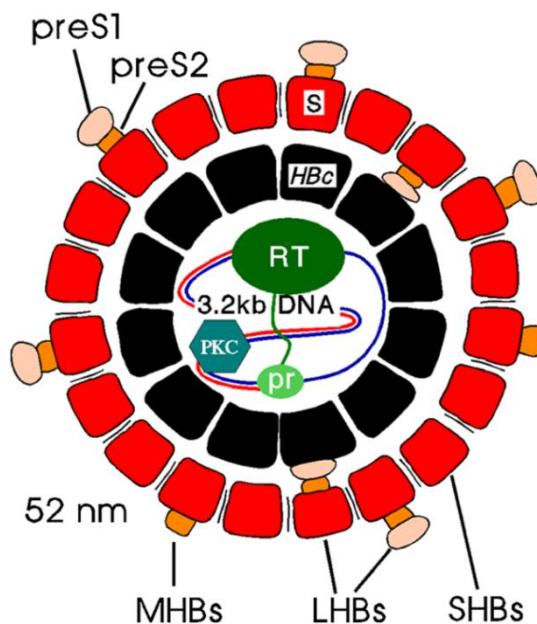


Рисунок 1. Структурные компоненты ВГВ [398]

Для вакцинопрофилактики существенное практическое значение имеют варианты вируса с мутациями антигенных детерминант, которые не нейтрализуются антителами к обычному антигену [34]. К изменениям последовательностей аминокислот в HBsAg и, как следствие, конформационным изменениям α детерминанты (рисунок 2), приводят замены в S-гене, что влияет на характер взаимодействия с нейтрализующими антителами [393].

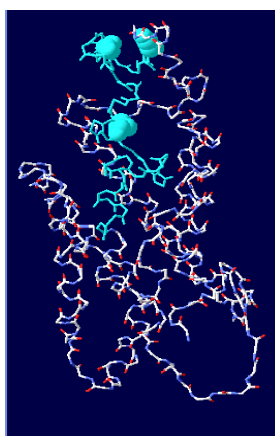
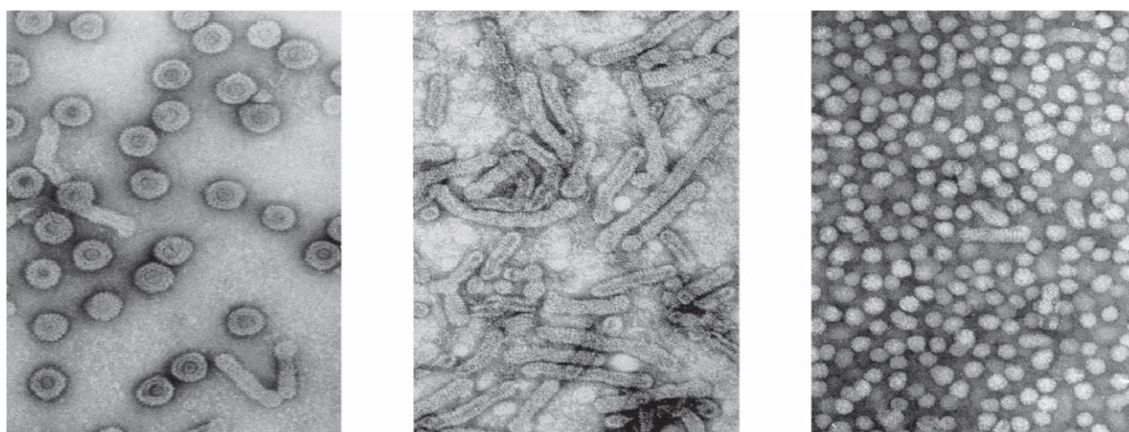


Рисунок 2. Третичная структура S-белка HBsAg. Голубым цветом помечены участки α - детерминанты, которые подвергаются изменениям в случае мутаций [222]

Вирусные штаммы, несущие такие замены, могут не детектироваться некоторыми коммерческими наборами реагентов. Продуктом участка S-гена между 124-147 позицией аминокислотных остатков является α детерминанта, которая формирует 3 петли, удерживающиеся цистеиновыми мостиками [29].

При ВГВ-инфекции – помимо инфекционных частиц (частиц Дейна) – в большом количестве синтезируются структуры HBsAg – сферические и филаментозные (рисунок 3) [204]. Они лишены ДНК ВГВ и нуклеокапсида (core-частиц), имеют размер от 17 до 25 нм (в среднем – 20 нм), и число их более чем в 100 раз превышает число вирионов (в 10^3 - 10^5 раз при концентрации вируса в крови 50-300 мг/мл) [185].



А. Вирусные частицы ВГВ В. Частицы HBsAg (слева – филоментозные, справа – сферические)

Рисунок 3. Электронно-микроскопические снимки вируса гепатита В (А) и двух форм его основного свободного продукта HBsAg (В). Примерное соотношение числа частиц в 1 мл сыворотки ВГВ-инфицированного пациента с высоким уровнем виремии – 10^9 : 10^{10} : 10^{13} [189]

Подобно оболочке, нуклеокапсид вируса состоит из единственного структурного протеина С (core). Этот белок способен самостоятельно структурироваться в икосаэдр. Обычно нуклеокапсид содержит вирусную нуклеиновую кислоту и обратную транскриптазу, а также белки-шапероны хозяина, в том числе белок теплового шока 90 [219]. Обратная транскрипция, в процессе которой синтезируется цепь ДНК на матрице вирусной РНК, происходит

в цитоплазме пораженного гепатоцита. Таким образом, незрелые нуклеокапсиды содержат вирусную РНК, а в зрелом капсиде РНК заменена путем обратной транскрипции на ДНК. Обратная транскриптаза сохраняется в течение всего периода созревания нуклеокапсида вириона и может играть определенную роль в завершении формирования двух-цепочечной вирусной ДНК во время начала нового раунда инфекции.

В течение многих лет считалось, что pre-core образуется в результате посттрансляционной модификации и выделяется из зараженной клетки в виде растворимого белка, называемого HBeAg, который легко обнаруживается при помощи серологического анализа [266, 295, 298]. Наличие HBeAg являлось характерным маркером активной репликации вируса. В то же время, HBeAg не является существенным для вирусной репликации, и мутации, которые блокируют pre-core трансляцию и синтез HBeAg, не являются редкостью у хронических носителей. Если носители ВГВ перестают экспрессировать HBeAg, они могут продолжать продуцировать вирус [280]. Многие пациенты, у которых HBeAg уже не выявляется в крови, по-прежнему, страдают от прогрессирующего хронического гепатита В, поскольку вирус может быть не подвержен иммунному действию Т- и В-клеток даже в отсутствие HBeAg [189].

Организация генома. Гепаднавирусы имеют частично двухцепочечный ДНК-геном (примерно 3 200 пар оснований), который организован в кольцо с помощью короткого, сплоченного перекрытия между 5'-концами двух нитей. Геном содержит четыре частично перекрывающиеся открытые рамки считывания, что обеспечивает его высокую информационную емкость: pre-S/S, pre-C/C, Р и Х (рисунок 4).

Три поверхностных белка вируса кодируются открытой рамкой считывания pre-S/S: L, М и S, которые соответствуют HBsAg. Открытая рамка считывания pre-C/C кодирует ядерный антиген (HBcAg) и растворимый антиген *e* (HBeAg). Вирусная полимераз, кодируемая геном Р одновременно с терминальным белком, обладает ДНК-полимеразной активностью, обратной транскриптазной

активностью и активностью РНК-азы Н. Еще одна открытая рамка считывания кодирует регуляторный Х белок [186].

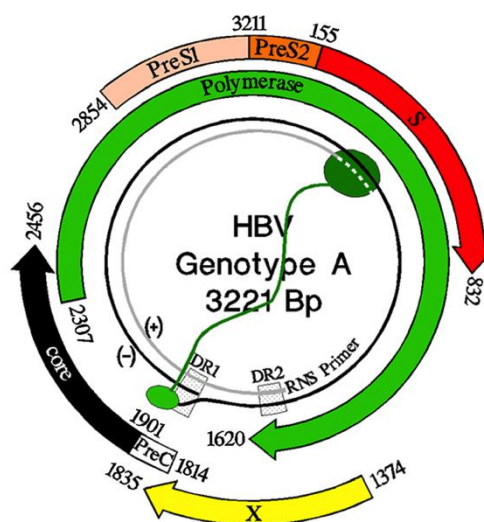


Рисунок 4. Гены (открытые рамки считывания), кодирующие белки вируса, в ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ [398]

Ряд исследователей [95, 100, 114, 127, 128, 142, 157, 175, 177, 179, 220, 237, 249, 361, 372, 380] предполагает, что Х белок за счет воздействия на многие внутриклеточные процессы может влиять на выживаемость клеток, а также репликацию вируса. Экспрессия данного гена необходима для эффективной репликации вируса и в культуре клеток [115, 351, 401], хотя не все исследования подтвердили это наблюдение [106]. Показано, что ген Х повышает опухолевую инвазию клеток куриного эмбриона как *in vivo*, так и *in vitro* путем индукции экспрессии циклооксигеназы-2 с последующей активацией 1 матричной металлопротеиназы мембранного типа [247]. Ген Х повышает метастатический потенциал опухолевых клеток, увеличивая их способность разрушать внеклеточный матрикс, прохождение через эндотелиальный барьер и выход в кровяное русло.

Изучен контроль экспрессии вирусных генов ВГВ при использовании линий клеток как печеночного, так и внепеченочного происхождения [274, 371]. ВГВ человека хорошо реплицируются в клеточных линиях печени, в том числе HepG2

[191] и LMN [200], в отличие от клеточных линий внепеченочного происхождения, где репликация не происходит. Гепатотропность ВГВ связана с наличием в клетках печени факторов транскрипции, особо важных для транскрипции именно прегеномной матричной РНК [368], единственной вирусной РНК, необходимой для репликации генома. В результате культуральных исследований был сделан вывод, что репликация ВГВ происходит в гепатоцитах. Другие типы клеток могут быть инфицированы, но в них не происходит репликация вируса до образования ДНК в обнаруживаемых концентрациях. Кроме того, нет доказательств того, что патологические изменения других тканей являются результатом инфицирования ВГВ [176].

Цикл репликации ВГВ можно схематически представить следующим образом [186]: 1) взаимодействие Pre-S1 региона HBsAg вируса с рецепторами гепатоцита; 2) проникновение ядерного нуклеокапсида в цитоплазму и транспорт его до ядерной мембраны; 3) далее геном ВГВ проникает в ядро гепатоцита, где происходит его переход в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК; 4) в ядре при помощи РНК полимеразы II хозяина осуществляется транскрипция во все матричные РНК, а также в прегеномную РНК; 5) матричные РНК перемещаются в цитоплазму для трансляции всех пяти вирусных белков; 6) синтез нового поколения вирусной ДНК из прегеномной РНК происходит при помощи вирусной обратной транскриптазы внутри нуклеокапсидов после их сборки; 7) возврат небольшой части нуклеокапсидов в ядро для поддержания стабильного запаса ковалентно замкнутой кольцевой ДНК; 8) покрытие в эндоплазматической сети большинства нуклеокапсидов поверхностным белком вируса и последующее освобождение зрелых вирионов. ВГВ в силу определенного сходства с ретровирусами был классифицирован как *pararetrovirus*. В самом деле, ВГВ, хотя и ДНК-содержащий вирус, он реплицируется с участием обратной транскрипции прегеномной РНК. Как и у ретровирусов, ДНК ВГВ может интегрироваться в геном клеток хозяина, но, в отличие от первых, эта интеграция не играет ключевой роли в репликативном цикле ВГВ и большей частью касается сегментов вирусного генома. Встроенный геном ВГВ сохраняется в клетках печени, даже

если в крови не определяется HBsAg. Наряду с интегрированной формой, может одновременно существовать внутрипеченочная длительная персистенция невстроенного генома вируса в виде стабилизированной хроматином вирусной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК [252]. В случае инфицирования ВГВ наблюдается длительная персистенция молекулы вирусной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК с длительным периодом полувыведения [252, 420]. Сама по себе кольцевая частично замкнутая ДНК не реплицируется. Считается [396], что в инфицированных клетках содержится в среднем от $<0,01$ до >50 копий на клетку данной ДНК (в среднем, приблизительно, 1,5 копии на клетку). В течении одного дня формируются и освобождаются из клетки от 1-10 до 10^{10} - 10^{12} вирионов, когда инфицировано от 5% до 40% из 2×10^{11} гепатоцитов печени [293]. Существует разница в эффективности репликации между определенными мутантами ВГВ и предшествующими штаммами в нескольких линиях клеток гепатомы, что указывает на множество независимых факторов преимущественной репликации для некоторых мутантных штаммов ВГВ у хронических носителей [363].

Известно 8 генотипов ВГВ (А, В, С, D, Е, F, G, H) и 24 субгенотипа (A1-5, B1-5, C1-5, F1-4), поражающих человека [348].

Заражение ВГВ происходит с кровью, слюной, спермой и другими выделениями от больных острой и хроническими формами гепатита. ВГВ передается при гемотрансфузиях, использовании нестерильного медицинского инструментария, при гомо- и гетеросексуальных контактах, от инфицированных матерей новорожденным. Кроме того, небольшие раны и тесный контакт кожи и слизистых оболочек могут привести к передаче ВГВ, если у человека в крови имеет место высокая виремия. Опасность такой передачи высока, когда концентрация ВГВ превышает 10^7 вирусов на миллилитр плазмы, и её практически не существует, когда виремия на два порядка меньше [189].

Lewellys Barker и Roderick Murray еще в 1951-54 гг. изучали заражающую дозу ВГВ путем инъекции так называемым «добровольцам» (заключенным) 1 мл различных разведений плазмы крови больного острым гепатитом [84]. Они обнаружили, что инфицирование этой плазмой в разведении $1:10^4$ может

приводить к развитию клинической картины гепатита. В 1970 г., когда стали доступны лабораторные тесты для выявления австралийского антигена, они вновь проанализировали те же образцы. Было обнаружено, что разведение плазмы до $1:10^7$ вызывало клинически бессимптомную ВГВ-инфекцию [84]. Позже было показано, что достаточно менее десяти вирусных частиц, если они вводятся внутривенно, чтобы обнаружить ВГВ у реципиента. Эти выводы подтверждаются наличием очень редких неумышленных случаев передачи ВГВ от доноров крови на ранней стадии инфекции, когда HBsAg и даже ДНК вируса еще не выявляются [189].

Ежегодно около 50 млн человек в мире инфицируются ВГВ [34] и более 350 млн являются носителями этого вируса [348]. В эпидемиологических исследованиях показано, что у 240 млн. человек длительность персистенции HBsAg была более 6 месяцев [397]. Растёт число больных циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой, этиологически связанных с ВГВ. Все выше изложенное позволяет рассматривать хронический гепатит, обусловленный ВГВ, как серьезную медицинскую и социальную проблему [42]. Ежегодно погибает примерно 100 тыс. человек от молниеносных форм, 500 тыс. – от цирроза и 300 тыс. от – гепатоцеллюлярной карциномы. Австралия и страны Западной, Северной и Центральной Европы являются низко эндемичными: население имеет антитела к белкам ВГВ в 4-6%. Япония и страны Юго-Восточной Азии, Среднего Востока, Южной и Восточной Европы, центральной и северной части Африки относятся к средне эндемичным районам (маркеры ВГВ выявляются у 20-40% населения). Страны же экваториальным и тропическим климатом в Африке и Южной Америке являются гиперэндемичными районами (70-90% населения инфицировано ВГВ). В этих странах ВГВ является основной причиной развития гепатоцеллюлярной карциномы [34, 211]. В России заболеваемость вирусным гепатитом В составляет, в среднем, около 18 на 100 тыс., но колеблется от 130 в Туве и Якутии до 8 на 100 тыс. в Центральной России [34].

У взрослых острый гепатит В в 5-10% случаев переходит в хроническую форму. Фульминантные формы вирусного гепатита В со смертельным исходом

встречаются в 1% случаев, в половине случаев инфекция протекает инapparантно [243]. Благодаря цитотоксическому действию Т-лимфоцитов, которые узнают антигены вируса на мембранах инфицированных гепатоцитов, происходит их повреждение [34]. Гепатоциты защищены от вируса благодаря гуморальному иммунитету, а благодаря клеточному иммунитету организм избавляется от инфицированных клеток печени. Ряд факторов обеспечивает переход острой формы инфекции в хроническую, в их числе – нарушение клеточного иммунитета, дефекты образования альфа-интерферона, интерлейкина-2 и другие [34]. Интерферон необходим для защитных механизмов макроорганизма и является основным терапевтическим средством, но при хроническом гепатите его продукция нарушена. Для терапии применяются также нуклеозидные аналоги – ламивудин, адефовир, дипивоксил, энтекавир, телбивудин и др. [42].

1.3 Вирус гепатита С

Открытие ВГС стало беспрецедентным событием в вирусологии: в 1989 г. он был идентифицирован не как полноценная вирусная частица (вирион), а как молекула РНК [8, 144].

ВГС имеет сферическую форму, диаметр его 55-60 нм. Это РНК-содержащий вирус [34, 90]. ВГС относится к роду *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*, наиболее родственными ему являются вирусы гепатита G, желтой лихорадки и Денге [286]. В состав вирусной частицы входят нуклеокапсид и оболочка, которая образована из мембраны клетки-хозяина и вирусных гликопротеинов E1 и E2. Геном представлен линейной одноцепочечной РНК позитивной полярности, длиной около 9 600 нуклеотидных оснований [35].

На 5'- и 3'-концах молекулы РНК имеются нетранслируемые регионы, которые ограничивают одну открытую рамку считывания, которая кодирует единственный полипротеин. Клеточные и вирусные протеазы расщепляют этот полипротеин на 3 структурных и 7 неструктурных белков (рисунок 5). Структурные белки составляют нуклеокапсид (С-белок, core – сердцевина) и

оболочку/суперкапсид вируса (envelope – оболочка). На поверхности С-белка существуют высококонсервативные В-клеточные эпитопы, которые важны для выявления антител к вирусу. Неструктурные белки не включены в вирион. Они выполняют функции различных ферментов (протеазы, РНК-зависимой РНК-полимеразы, геликазы), участвуя в репликации вируса. Для них приняты следующие обозначения p7, NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Nonstructural) [72, 118, 235, 236, 251, 264, 379, 391, 404, 405].

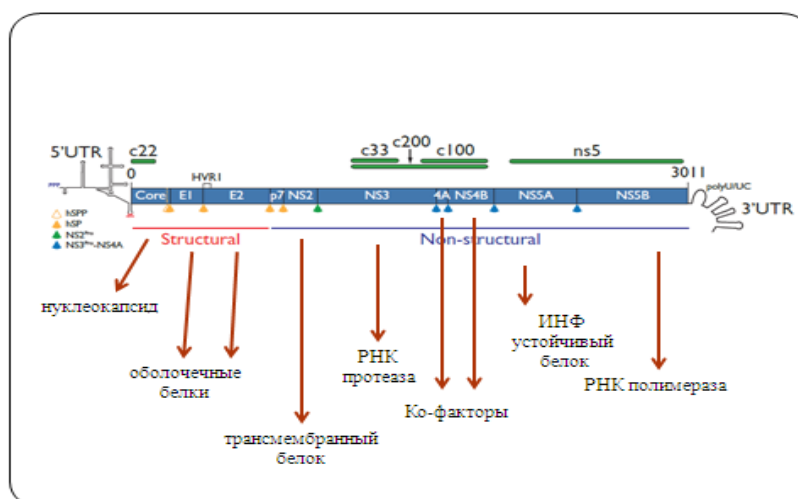


Рисунок 5. Организация генома вируса гепатита С [176]

На каждом из концов РНК имеется нетранслируемый участок – UTR (Untranslated Region; 329-341 нуклеотидов). Нуклеотидная последовательность 5'-UTR, длиной 341 нуклеотид, высококонсервативна и не содержит кэп-структуры. Вторичная структура 5'-UTR состоит из четырех основных доменов и псевдоузла, что было показано при помощи компьютерного моделирования структуры и последующего биохимического картирования. Трансляцию генома ВГС по кэп-независимому механизму определяет наличие внутреннего сайта посадки рибосомы [35, 379, 391]. 3'-UTR необходим для связывания с РНК-зависимой РНК-полимеразой вируса, что обеспечивает инициацию репликации вирусного генома. РНК ВГС может сохранять инфекционность только при наличии обоих концов - 3' и 5', что было показано в эксперименте *in vivo* на модели шимпанзе. Изменения в 3'-UTR влияют на эффективность трансляции, зависящей, в свою очередь, и от генотипа ВГС. Восприятие регуляторных клеточных сигналов обеспечивается именно нетранслируемыми участками,

которые играют важную роль в репликации ВГС [119]. Поэтому, наряду с неструктурными белками, они представляют интерес как потенциальные мишени для антивирусной терапии.

Клеточные сигнальные пептидазы и вирусные сериновые протеазы расщепляют вирусный протеин на отдельные белки. Клеточная сигнальная пептидаза катализирует расщепление структурных белков в цистернах эндоплазматического ретикулума. Заякоревание этих белков в мембране и последующее отщепление сигнальной пептидазой обеспечивается наличием гидрофобных доменов на С-концевой части. Автокаталитическое расщепление участка между NS2 и NS3 происходит при помощи протеазы NS2 и N-концевой части NS3. Расщепление остальных неструктурных белков осуществляется индивидуальной вирусной сериновой протеазой, локализованной на N-концевой трети белка NS3 [87, 334].

Строение и функции вирусных белков. Структурный белок капсида С (core protein) - высококонсервативный и иммуногенный белок, содержит несколько линейных В-клеточных эпитопов рядом с N-концом. С-белок локализован в цитоплазме и на мембранах эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Основная функция С-белка – это формирование вирусного капсида, что предполагает его олигомеризацию [406]. Описано влияние С-белка на апоптоз, однако окончательная роль этого белка не выяснена. Также, С-белок вместе с gas-онкогеном способен трансформировать клетки грызунов в раковые. У трансгенных мышей, если С-белок экспрессируется в клетках печени, развивается гепатоцеллюлярная карцинома. Следовательно, С-белок обладает онкогенными свойствами и способен влиять на нормальные клеточные функции, а именно, на клеточную пролиферацию и смерть. Кроме того, он ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Таким образом, С-белку принадлежит важная роль в патогенезе вирусного гепатита С [137, 140, 276, 284].

Оболочечные белки ВГС, гликопротеины E1(gp35) и E2(gp70) относятся к семейству трансмембранных белков с N-концевым внешним и С-концевым гидрофобным доменами. Эти белки играют ключевую роль в заякоривании и

удерживании оболочечных белков в мембране эндоплазматического ретикулума (локализация в клетке ограничена одной органеллой), а также, в образовании димера E1/E2, поскольку белки способны к олигомеризации. Разрезание клеточными сигнальными пептидазами полипротеина ВГС в сайтах C/E1, E1/E2, E2/p7 и p7/NS2 происходит с различной скоростью и не полностью в сайте E2/p7, что приводит к формированию белков E1 и E2, причем последний существует в двух формах: E2 и гибрид E2-p7. Экспрессия вирусных гликопротеинов на поверхности клетки незначительна, что объясняет «ускользание» инфицированных клеток от иммунологического распознавания [155].

Участок высокой вариабельности, обнаруженный на N-конце E2 (HVR1), содержит иммуногенные эпитопы, индуцирующие изолят-специфические нейтрализующие антитела, что позволяет вирусу избегать иммунного ответа [35]. В пределах субтипов одного генотипа степень различия бывает до 80% за счет вариабельности аминокислотных последовательностей HVR1, что приводит к ослаблению как В-, так и Т-клеточного иммунитета. Антитела к этому участку изменяют свою специфичность на протяжении хронической инфекции. Ближе к С-концу E2 за HVR1 находится другой участок высокой вариабельности – HVR2, который обладает уже 100% изменчивостью. HVR2 вместе с HVR1, возможно с помощью внутримолекулярных взаимодействий, могут модулировать связывание E2 с клеточными рецепторами [155]. Для понимания сложного многостадийного процесса взаимодействия ВГС с клеткой – мишенью необходимы дальнейшие исследования.

Функцией неструктурных белков NS2 и NS3 в основном является протеолитический процессинг неструктурных белков ВГС. Они образуют две функциональные протеазы (NS2-NS3 и NS3). Исследования показали важную роль NS2 в регуляции процесса фосфорилирования NS5-белка ВГС, но основная функция не известна [193, 206].

Область, кодирующая NS3-белок, наиболее изучена. Белок NS3 (70кДа) обладает тремя каталитическими функциями: сериновая протеаза, нуклеотид трифосфатаза (NTPase) и РНК-хеликаза. Кроме того, NS3 обладает другими

свойствами при взаимодействии с клетками хозяина. Например, ингибирование передачи посредством протеинкиназы А сигнала к трансдукции или клеточной трансформации [111, 342]. Показано, что протеаза играет ключевую роль в процессинге полипротеина ВГС, в связи с чем, является важной мишенью для антивирусной терапии [89, 174, 257, 369]. Протеолитическая активность протеазы NS3 поддерживается кофактором NS4A (маленький белок 8кДа, 54 азотистых оснований), для чего белки образуют стабильный комплекс: N-конец NS3 и центральная часть NS4A. Участие кофактора NS4A не необходимо для расщепления полипротеина между NS5A и NS5B, но при его отсутствии менее эффективно [88, 163, 194, 201, 213, 234, 241].

Определена третичная структура свободного хеликазного домена NS3. Хеликаза NS3 состоит из двух структурно связанных субдоменов. Первый субдомен имеет функцию нуклеотидтрифосфотазы (NTPase), второй несет функцию связывания РНК. Нуклеотидтрифосфотазный (NTPase) домен, возможно, имеет множественные функции: NTPase-активность, связывание РНК, кроме того разматывание участков РНК со сложной вторичной структурой посредством гидролиза связей между нуклеотидами с последующим их восстановлением. Точная роль хеликазного домена NS3 в процессе вирусной репликации до конца не ясна. Тем не менее, он является потенциальной мишенью для создания противовирусных препаратов, как и другие ферменты ВГС [83, 228, 239, 289, 370].

Белок NS4B (27кДа) гидрофобный. Его С-конец ориентирован в сторону цитозоля, а его N-конец обращен в просвет цистерн эндоплазматического ретикулума. С помощью компьютерного анализа предсказано наличие в структуре NS4B четырех трансмембранных сегментов. В течении долгого времени функция этого белка была не ясна. Выдвинута гипотеза о его участии в образовании, так называемых, «мембранных сетей» в эндоплазматическом ретикулуме, которые удерживают все структурные и неструктурные белки ВГС и реплицирующуюся вирусную РНК [73, 97, 262, 402, 410]. Кроме того, этот неструктурный белок оказывает влияние на репликацию ВГС путем регуляции

комплекса NS5B-NS3. Вопрос об онкогенности NS4B до сих пор обсуждается. Ингибирование транспорта из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи происходит за счет NS4A-4B, что приводит к снижению на мембране количества основного комплекса гистосовместимости первого класса и уменьшению секреции цитокинов, влияющих на иммунный ответ во время ВГС-инфекции [183, 184].

Поскольку неструктурные белки и РНК ВГС были обнаружены в клетках печени инфицированных пациентов и экспериментально инокулированных шимпанзе, предположено, что печень является местом репликации вируса [104]. Помимо клеток печени, ВГС может также реплицироваться в моноклеарных клетках периферической крови как в естественных условиях, так и в экспериментально инфицированных В- и Т-клеточных линиях. Лимфотропизм вируса ответственен за многочисленные иммунологические нарушения, в частности, криоглобулинемию II и III типа, наблюдаемую у более чем 50% больных хроническим вирусным гепатитом С [168].

Полный цикл репликации ВГС в культуре клеток представлен на рисунке 6:

- 1) проникновение в клетку хозяина и освобождение в цитоплазме геномной РНК из вирусной частицы;
- 2) трансляция РНК, обработка полипротеина и формирование комплекса репликазы с внутриклеточными мембранами;
- 3) синтез промежуточной минус-цепи РНК на матрице плюс-нити;
- 4) производство новой плюс-нити молекулы РНК, которая, в свою очередь, может быть использована для синтеза новых минус нитей с целью экспрессии полипротеина или упаковки в патогенные вирионы;
- 5) освобождение вируса из инфицированных клеток [90].

Вирус обладает большой вариабельностью всех кодируемых регионов вирусного генома, причем рассматривают ее на трех уровнях: первый уровень – генотипы (гомология менее 72%), второй уровень – субтипы (гомология 72-86%), третий уровень – изоляты (гомология 86-99%), среди которых различают квазивиды. Квазивиды – это генетически близкородственные варианты одного и того же изолята ВГС, которые возникают в результате мутаций в ходе репликации вируса в организме хозяина.

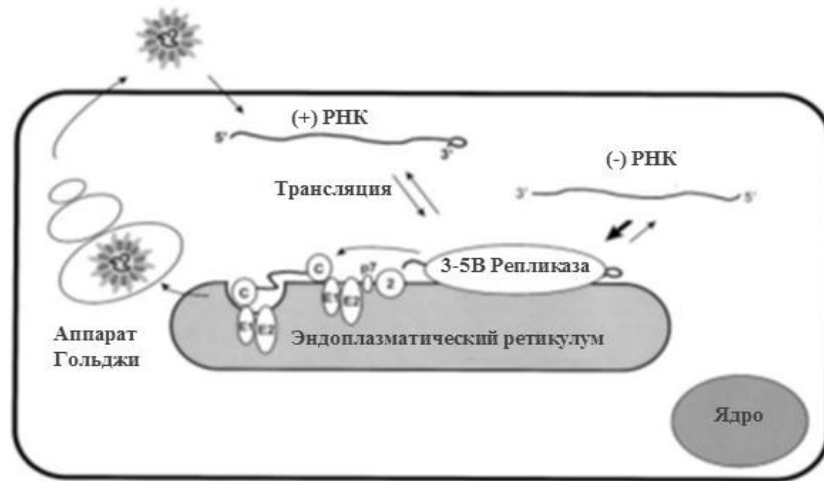


Рисунок 6. Модель цикла репликации вируса гепатита С [90]

У инфицированного ВГС пациента одновременно может находиться множество квазивидов ВГС. Их существование объясняет появление постоянно меняющихся антигенных структур вируса, циркулирующих в организме человека и обеспечивающих феномен «ускользание» ВГС от нейтрализующего действия антител, индуцируемых ВГС в организме человека. Образование новых антигенных вариантов постоянно соревнуется с выработкой вируснейтрализующих антител. В настоящее время выделяют, как минимум, шесть генотипов ВГС, пронумерованных от 1 до 6 в порядке их открытия, и более 100 субтипов, обозначаемых прописными латинскими буквами (a, b, c и т.д.) [19]. Показано, что наибольшее распространение в мире имеет генотип 1b. На данный момент генотипы ВГС имеют четкое географическое распределение. В России преимущественно распространены типы 1b и 3a, встречаются также 1a и 2a [34, 50, 207].

ВГС распространен повсеместно, и около 170 миллионов человек, 3% населения мира, инфицированы ВГС [354]. Это главная причина хронической болезни печени по всему миру, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному [74, 190]. Природный резервуар вируса неизвестен. На основании анализа эволюции предположили, что вирус попал в человеческую популяцию не ранее 300 лет назад [34]. Антитела к белкам ВГС в европейских странах обнаружены в 0,23-2,2%, в США – 1-3%, в Японии – 1,15%, Юго-Восточной Азии – 2,6%, Южной Америке – 4,4%, Африке – 2,2%. В Российской Федерации официальная

регистрация вирусного гепатита С началась в 1994 г. после разработки в 1989 г. за рубежом, а в 1991 г. в России, иммуноферментных тест-систем для индикации антител к ВГС. В последние годы имеет место снижение заболеваемости острым гепатитом С до 1,7 на 100 000 населения, при росте заболеваемости хроническими формами [19].

ВГС был обнаружен в асцитической жидкости в 100%, в слюне – 50%, в сперме – 25%, моче – 8%. Две трети случаев посттрасфузионных гепатитов были связаны с ВГС. От матерей-вирусоносителей новорожденные заражаются в 10%, что значительно реже по сравнению с ВГВ [296]. Эти данные свидетельствуют о том, что для заражения ВГС необходима большая заражающая доза, чем при ВГВ. Факторами риска являются: переливания компонентов крови - 55%, наркомания – 20%, гемодиализ – 12%, половые контакты со многими партнерами – 7%; профессиональная деятельность (медицинские работники) – 6% [34].

Клиническое течение острого гепатита С более легкое, чем гепатита В и лишь в четверти случаев сопровождается желтухой. Фульминантные формы встречаются крайне редко. Летальный исход не превышает 1%. Инаппарантные формы составляют 40-70% [34]. Гепатит С признан одной из главных причин хронических заболеваний печени, куда включены цирроз и гепатокарцинома. В 80% случаев острый гепатит переходит в хроническую форму, что объясняется повышенной частотой мутаций вируса, интерференцией вирусных белков с факторами врожденного и адаптивного иммунитета хозяина [214, 223]. В многочисленных исследованиях [21, 34, 68, 70, 123, 225] показано, что, течение, исходы и результаты лечения ВГС-инфекции зависят от генотипа вируса. Обладающие высокой репликативной способностью генотипы 1b и 4a являются наиболее опасными. При генотипе 2a уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) у больных ниже, чем при других генотипах вирусов [34].

Для лечения гепатита С используют сочетание пегилированного рекомбинантного интерферона-α и рибавирина; при этом стойкий вирусологический ответ наблюдается не более, чем у 50% пациентов [300]. В 2011 г. Федеральная служба по контролю за качеством пищевых продуктов и

лекарственных препаратов США одобрила применение новых ингибиторов протеазы ВГС – боцепривира и телапривира [19]. Это препараты прямого противовирусного действия на основе ингибиторов ферментов ВГС – NS3 и NS5B, а также блокаторов белка NS5A. Терапия с применением новых препаратов позволяет достигнуть хороших результатов лечения у большинства пациентов, но ее крайне высокая стоимость сегодня делает лечение недоступным большинству больных [340].

1.4 Лабораторная диагностика вирусных инфекций

Современная клиническая лабораторная диагностика является быстро развивающейся областью медицины вообще и вирусологии в частности. Первые упоминания о диагностике вирусных инфекций датируются 1948 г., когда Weller и Enders показали рост вирусов человека в культуре клеток различных тканей. [395] Этот и другие важные этапы становления лабораторной диагностики вирусных инфекций представлены в таблице 1.

Важность быстрого и точного определения вирусного агента при инфекционном поражении или при дифференциальной диагностике различных заболеваний невозможно переоценить. Высокая вероятность корректной идентификации этиологического агента зависит от множества факторов: характера и качества взятия исследуемого клинического материала, количества образца, время и условий транспортировки в лабораторию.

Согласно базовым принципам клинической вирусологии, поиск инфекционного агента следует начинать с пораженного органа, то есть в случае ВГВ и ВГС – с клеток печени. Однако биопсия печени – травматическая процедура, выполнение которой может осложниться кровотечением. Другим материалом для обнаружения вирусного агента может служить периферическая кровь. Этот материал является наиболее предпочтительным, так как одновременно может быть использован и для детекции противовирусных антител, вырабатываемых организмом в ответ на внедрение вируса.

Таблица 1. Этапы становления лабораторной диагностики вирусных инфекций [176]

Год	Событие
1892	Выявлены внутриядерные и цитоплазматические включения в клетках тканей, поражённых натуральной оспой [198]
1929	Описан способ фиксации комплемента для детекции антител к вирусам натуральной оспы, осповакцины и ветряной оспы/опоясывающего лишая [96]
1948	Впервые получен рост вирусов, патогенных для человека, в культуре клеток различных органов и тканей [395]
1956	Выявление вируса гриппа в смывах носоглотки с помощью окрашивания антител флуоресцентными метками [187]
1975	Открытие и развитие методов получения моноклональных антител в качестве диагностических реагентов [240]
1985	Открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР) [342]
1992	Модификация ПЦР: разработка метода детекции продуктов амплификации в режиме реального времени [205]
2002	Разработка систематического подхода к открытию новых вирусов [195, 288, 394]
2007	Описание мультиплексной ПЦР-тест системы для диагностики вирусных инфекций дыхательных путей [267]

На современном этапе развития вирусологической диагностики у лабораторного работника в арсенале имеется большое количество различных методов:

- серологические (иммуноферментный анализ, иммунохемилюминисцентный анализ, иммуноблот, метод авидности антител, реакция иммунофлуоресценции, реакция пассивной гемагглютинации);
- вирусологические (методы, основанные на заражении клеточных культур вирусосодержащим материалом);

- морфологические (цитологические, гистологические);
- молекулярные.

Все методы можно разделить на две основные группы:

1. Прямые методы, в которых происходит непосредственное определение вируса или его компонентов – белков, антигенов и генома.
2. Непрямые методы, в которых мишенью служат антитела, синтезирующиеся клетками иммунной системы в ответ на вирусную инфекцию.

Любой метод детекции/идентификации вируса имеет свои достоинства, недостатки и ограничения. Для прямых методов, в случае, когда вирус размножается в пределах одного органа или системы, не представляется возможным определить присутствие вируса в крови, которая является основным материалом для исследования. Если исследование проводится в постинфекционный период, когда активная репликация вируса уже прекращена, результат будет отрицательным. Существует ограничение чувствительности тестов.

При выполнении непрямых методов тоже возникает ряд сложностей. При диспротеинемии ограничения бывают как при гиперпродукции глобулинов, так и, наоборот, при низкой продукции антител. В случае нарушения гуморального звена иммунитета антитела либо не нарабатываются в диагностическом титре, либо при гиперпродукции их специфичность сильно снижена. Определенная часть человеческой популяции может не вырабатывать антител в ответ на присутствие вирусного агента в организме. Кроме того, при переливании плазмы или применении препаратов иммуноглобулина, результаты серологических исследований могут быть искажены за счет донорских антител. Такая иммунотерапия, в частности, сильно влияет на определение уровня IgG к белкам ВГВ.

На протяжении последних 50 лет культуральный метод являлся «золотым стандартом» диагностики вирусных инфекций. Однако не все вирусы поддаются культивированию. Этот метод достаточно трудоёмок и требует больших

финансовых затрат. С развитием иммунологических и молекулярно-биологических методов он постепенно вытесняется на второй план в рутинной диагностике, оставляя за собой область фундаментальной, экспериментальной вирусологии. Наиболее часто используемыми методами диагностики вирусных инфекций являются сегодня иммуноферментный анализ, иммунохемилюменесцентный анализ и метод полимеразной цепной реакции. Рассмотрим более подробно именно их.

1.4.1 Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА – вид иммунохимического анализа, основанный на высоко специфической иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, для выявления которого используют фермент или ферментзависимое вещество [26].

К настоящему времени разработано более 30 различных вариантов проведения ИФА. Наиболее распространенным вариантом является твердофазные ИФА, впервые описанные в начале 1970-х гг., используют антигены и/или антитела, сорбированные на поверхности и связывающиеся с комплементарными анализитами. В зависимости от определяемой мишени, в реакционную смесь вводят известные (иногда искусственно полученные рекомбинантные) антигены вируса или антитела против вирусных антигенов. Известный компонент комплекса переводится в нерастворимое состояние путем пассивной адсорбции на твердой поверхности полистироловых планшетов. Первый этап реакции – сорбция антигенов или антител на твердый носитель. В прямом варианте на твердой фазе сорбируют специфические антитела и после удаления избытка добавляют материал, содержащий антиген. После отмывания несвязавшегося антигена вносят глобулины, меченные пероксидазой или щелочной фосфатазой. Далее добавляют субстрат (обычно тетраметилбензидин), после чего начинается цветовая реакция (изменение окраски реакционной массы), интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации искомого компонента в сыворотке. Реакцию останавливают стоп-реагентом (обычно серная кислота),

изменяя pH среды. При непрямом варианте существует дополнительный этап – введение меченых антивидовых антител. Конкурентный метод основан на конкуренции известного и исследуемого антигена за участки связывания с антителами. Результаты иммуноферментного анализа регистрируют с помощью специального устройства (ридера). Схематично этот процесс представлен на рисунке 7.

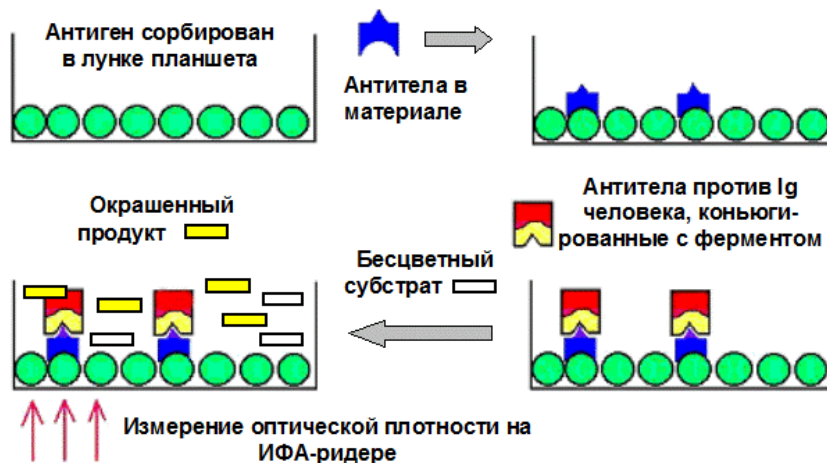


Рисунок 7. Схема ИФА [216]

Метод получил широкое распространение благодаря простоте выполнения, невысокой стоимости реагентов и универсальности. Он может быть использован для выявления антител и как свободных, так и мембранных антигенов. Так же он легко поддается автоматизации.

1.4.2 Иммунохемилюминесцентный анализ (ИХЛА)

ИХЛА являются вариантом ИФА. Хемилюминесцентный анализ – это совокупность методов определения соединений и макромолекул, основанных на влиянии анализируемого вещества на интенсивность (спектр) хемилюминесценции. Хемилюминесценция – выделение света при химической реакции – является редким и очень интересным явлением. В подавляющем большинстве случаев при химической реакции свободная энергия выделяется в виде тепла. Аналогично этому можно превратить некоторую часть свободной энергии химической реакции в энергию световых колебаний без повышения

температуры. Регистрация хемилюминесценции осуществляется визуально, фотоэлектрическим или фотографическим методом [3].

Для вирусологической диагностики данный метод реализуется следующим образом: парамагнитные микрочастицы сенсibiliзируются антителами к исследуемым белкам, или антигенами, если мишенью исследования служат антитела [22]. Далее исследуемый образец сыворотки или плазмы, смешивают с этими микрочастицами и конъюгатом – акридин-меченым антителами к мишени, в результате чего начинается реакция с выделением света. После промывки реакционной смеси, к ней добавляются пре-триггерный и триггерный растворы. Световое излучение измеряется с помощью оптической системы и выражается в относительных световых единицах. Существует прямая зависимость между количеством мишени в образце и световыми единицами, зарегистрированными оптической системой. Результат исследования образца вычисляется с помощью сравнения хемилюминесцентного сигнала в реакции со значением порогового сигнала, определяемого по текущей калибровочной кривой прибора. Если хемилюминесцентный сигнал в образце выше или равен значению порогового сигнала, образец считается реактивным, то есть содержащим мишень. Схема метода представлена на примере выявления суммарных антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена p24 представлена на рисунке 8.

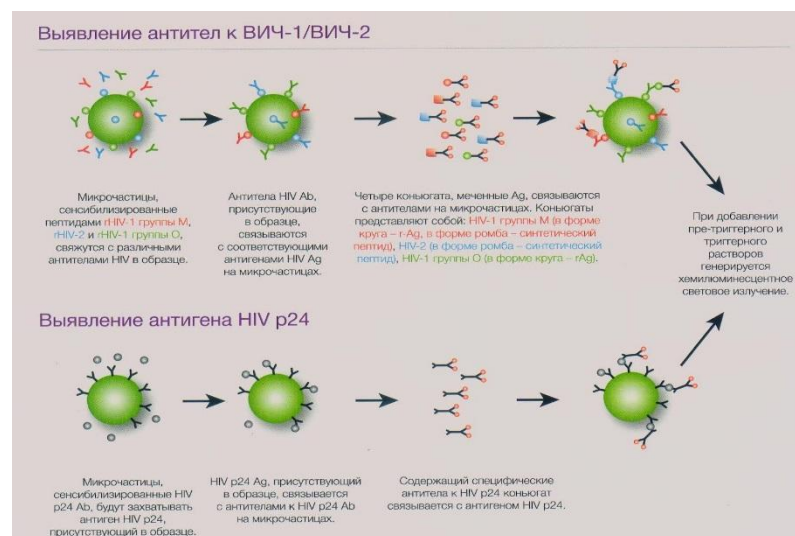


Рисунок 8. Схема ИХЛА [165]

1.4.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР прочно занимает одну из лидирующих позиций среди методов диагностики вирусных инфекций. Она была разработана американским ученым Кэри Муллисом в 1983 г., за что он в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии. Суть метода состоит в синтезе коротких участков ДНК путем достраивания особым термостабильным ферментом (полимеразой) специфических праймеров– олигонуклеотидов, комплементарных определенному участку генома. Таким образом, можно выявить присутствие определенного участка генома в исследуемом образце. Благодаря этому данная методика нашла применение в различных областях человеческой деятельности, использующих молекулярную биологию: в генетике, криминалистике, медицине и конечно, лабораторной диагностике. В отличие от иммунологических и микроскопических методов, чувствительность метода ПЦР может, теоретически, достигать 1-ой целевой молекулы (копии генома) на реакцию, а её специфичность составляет 100%. Очевидно, что в реальных условиях такая чувствительность практически не достижима. Заявленная аналитическая чувствительность доступных на рынке тест-систем обычно составляет 50 международных единиц (МЕ) в миллилитре исследуемого образца, но может достигать и менее десятка условных единиц в миллилитре. Отсутствие лабораторных стандартов считается основным недостатком метода, что объясняет дискордантные результаты, полученные в разных лабораториях [341].

Существует много вариантов метода ПЦР: классическая ПЦР с детекцией продуктов электрофоретическим методом в агарозном геле, с детекцией в режиме реального времени, транскрипционно-опосредованная амплификация, амплификация на фиксированном молекулярном зонде и так далее [26].

Материалом для исследования могут служить практически любые биологические жидкости и ткани: цельная кровь и ее компоненты (плазма, сыворотка, лейкоциты и другие ядродержащие клетки), моча, смывы и аспираты из бронхов и легких, слюна, спинномозговая жидкость, биоптаты органов и тканей и т.д. Ингибирующие полимеразу вещества, такие как гепарин,

соли тяжелых металлов и различные биополимеры, могут влиять на достоверность полученного результата.

Поскольку полимеразы осуществляют синтез ДНК на ДНК-матрице, то для детекции РНК (например, при диагностике РНК-содержащих вирусов) необходим еще один дополнительный этап – обратная транскрипция, при которой на матрице РНК происходит синтез комплементарной нити ДНК. Данный феномен был открыт при изучении ретровирусов, в которых был обнаружен особый фермент – обратная транскриптаза. После получения комплементарной ДНК проводят амплификацию по вышеописанной схеме.

Детекция ампликонов (малых участков ДНК, полученных в результате амплификации) в агарозном геле связана с рядом трудностей. Во-первых, ампликоны могут попадать в окружающую среду, возникает риск контаминации и получения ложноположительных результатов, поэтому работа с ними требует отдельного помещения. Во-вторых, такой вариант требует специального оборудования. Для устранения подобных трудностей был разработан другой метод проведения ПЦР – это ПЦР в режиме реального времени [205]. Отличие метода состоит в том, что продукты амплификации детектируются непосредственно в ходе проведения реакции. Для снятия сигнала накопления продуктов используются флуоресцентные красители, которые обеспечивают флуоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР-продукта. Механизмы генерации флуоресценции различаются в зависимости от используемых реагентов. Наиболее часто используемым методом является технология Taqman, принцип которой представлен на рисунке 9.

В реакционную смесь добавляют праймеры, комплементарные участку амплификации и содержащие на одном конце флуорофор, а на другом гаситель. При отжиге праймеров и последующем достраивании праймеров полимеразой происходит отщепление флуорофора и гасителя от праймера маяка. При удалении флуорофора в пространстве от гасителя, влияние последнего ослабевает, в результате чего происходит свечение. Это происходит только в присутствии

мишени, что свидетельствует об эффективной амплификации, а, следовательно, о присутствии целевой матрицы ДНК.

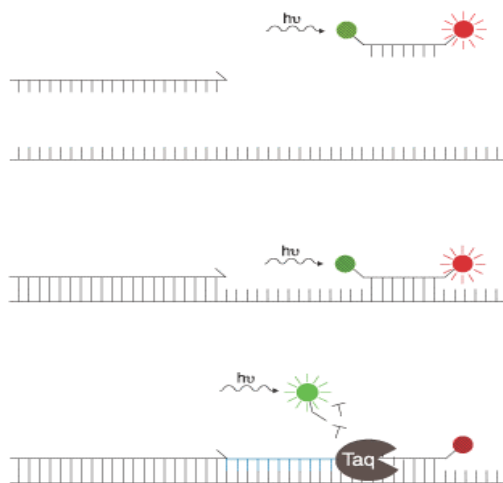


Рисунок 9. Принцип метода ПЦР в режиме реального времени, технология Taqman [218].

Кинетическая кривая ПЦР в координатах "Уровень флуоресценции — цикл амплификации" имеет сигмовидную форму, представленную на рисунке 10.

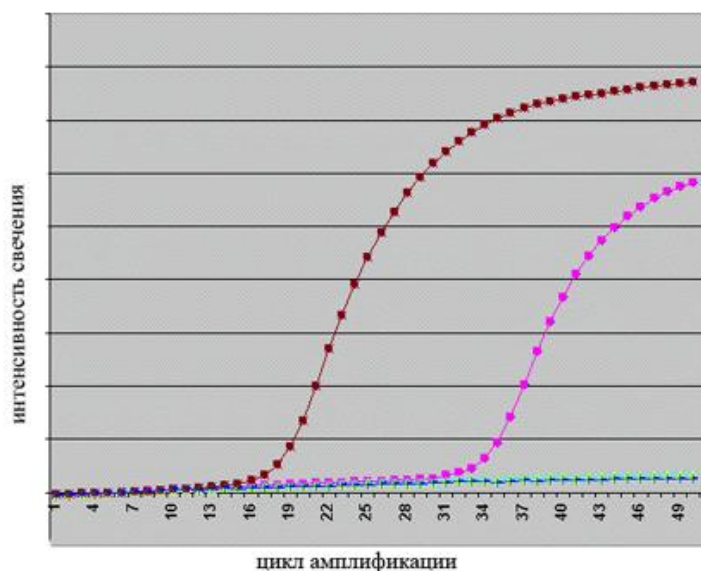


Рисунок 10. Кинетическая кривая ПЦР в координатах [217].

В ней можно выделить три участка кривой: 1) стадию инициации – ПЦР продукты еще не детектируются флуоресцентной меткой; 2) экспоненциальную стадию – наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции

от цикла ПЦР; 3) стадию плато – происходит насыщение и изменение концентрации не сильно влияет на интенсивность свечения.

Анализируя кривую накопления флуоресцентного сигнала, можно судить о количестве матрицы, исходно находящейся в исследуемом образце, то есть о вирусной нагрузке. Главными преимуществами перед обычным вариантом ПЦР являются отсутствие стадии электрофореза, следовательно, исследователи получали выигрыш во времени и снижалась возможность контаминации продуктами амплификации, и возможность количественной оценки вирусной нагрузки.

В 1984 г. были опубликованы первые работы, посвященные ПЦР [341], в 1988 г. Ло и соавт. [259] сообщили о контаминации ПЦР-смеси для детекции ДНК ВГВ и получении ложноположительных результатов. С 1990 по 2002 гг. частота контаминации составляла 2% (1,8-2,1%) [112]. В результате многоцентровых исследованиях по контролю качества ПЦР диагностики вирусов гепатитов и микобактерий туберкулеза было показано, что доля ложноположительных реакций колебалось от 9% до 57% [109, 292, 318, 414]. Основная причина получения ложных результатов – это несоблюдение правил работы в ПЦР-лабораториях. Контаминация может происходить на разных этапах, первым из которых является сбор исследуемого материала [64]. Это основополагающий этап, но он, как правило, осуществляется вне диагностической лаборатории. ПЦР-исследование проводится в четыре этапа: 1) первичная обработка биологического материала; 2) выделение нуклеиновых кислот (НК); 3) приготовление реакционных смесей и проведение амплификации; 4) детекция продуктов реакции.

На первом этапе регистрируют и разаликвочивают исследуемые материалы. Если контаминация была этом этапе, то при повторных исследованиях этот образец останется позитивным. Выявить такую контаминацию сложно. Только несовпадение результатов лабораторных исследований при повторных анализах последующих биопроб от пациентов, которые находятся под динамическим

наблюдением, заставляет задуматься о возможной контаминации на первом этапе проведения реакции и выявить ее.

При контаминации на втором этапе при повторном выделении образец будет отрицателен. Это самый опасный этап с точки зрения контаминации, особенно при ручном выделении нуклеиновых кислот. Использование автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот существенно снижает риск загрязнения проб.

Несоблюдение правил работы, особенно смены перчаток, может приводить к контаминации на третьем и четвертом этапах. При использовании ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» два последних этапа объединяются в один. Исключить контаминацию на всех этапах ПЦР, кроме выделения нуклеиновых кислот, позволяет четкое соблюдение санитарных норм и требований методических рекомендаций [39, 40]. Тотальная контаминация распознается легко, поскольку все образцы в постановке, в том числе и отрицательные контроли, реактивны (рисунок 11). Контаминация от пробы к пробе, загрязнение только нескольких образцов, представляет сложность для оператора. Следует обращать внимание на наличие проб с высокой и низкой концентрацией мишени, даже если они находятся не рядом только рядом друг с другом.

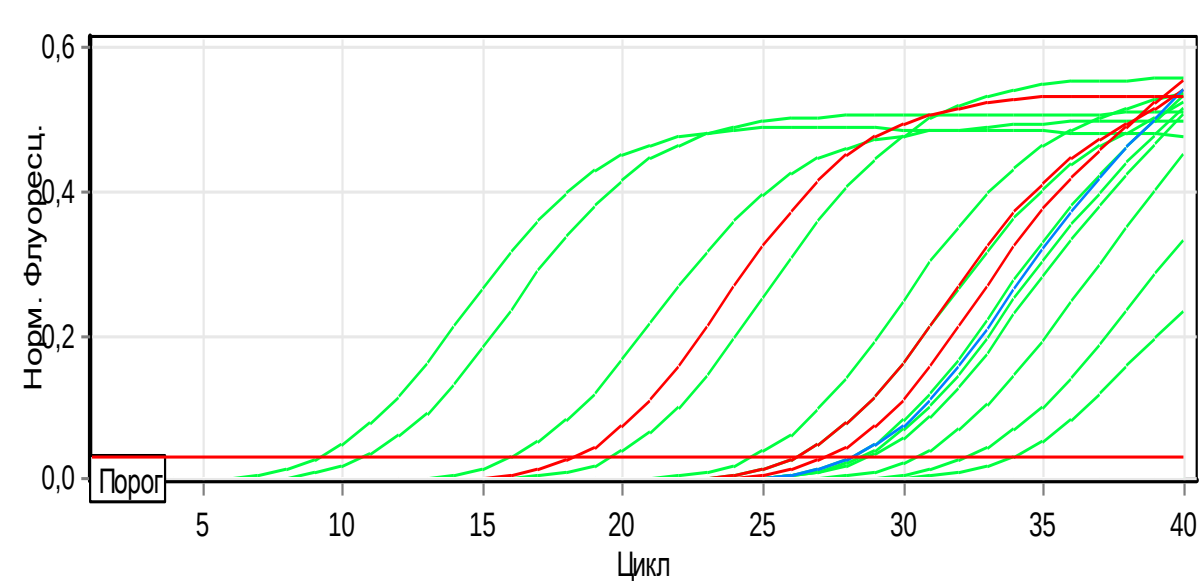


Рисунок 11. Тотальная контаминация [64].

Не следует упускать из поля зрения и возможность получения ложноотрицательных результатов ПЦР в образцах с очень высокой концентрацией нуклеиновых кислот. Такой случай представлен на рисунке 12, когда результат реакции прибором автоматически определен как отрицательный, однако при просмотре кривых накопления продуктов амплификации над пороговой линией визуализируется нехарактерная кривая.

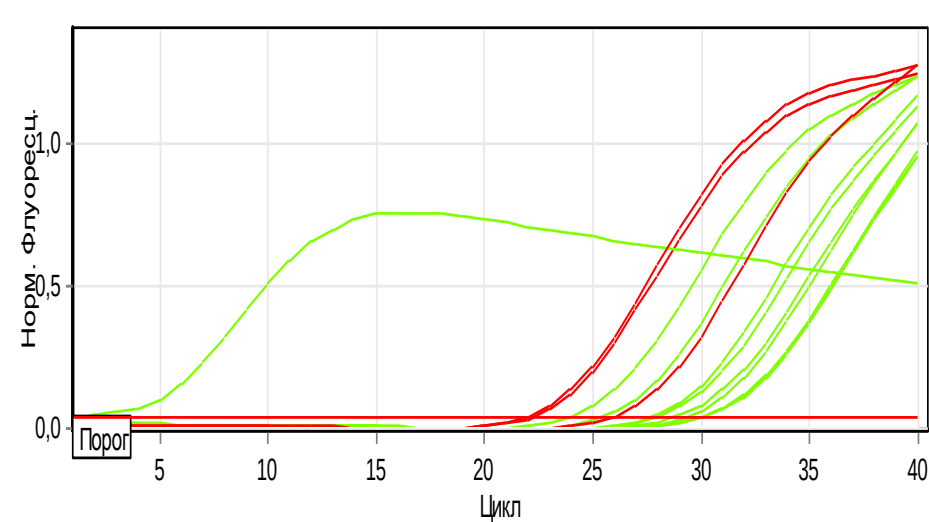


Рисунок 12. График по каналу регистрации ДНК ВГВ [64]

Современные подходы к диагностике вирусных инфекций предъявляют определенные требования к лабораторным методам. Они должны обладать высокой чувствительностью, позволяющей выявлять вирус на ранней стадии, быстротой получения результатов и иметь количественную оценку. Кроме того, важна высокая степень воспроизводимости полученных результатов. Выполнение этих требований возможно только при наличии стандартов и внешней оценки качества лабораторных исследований. Внешняя оценка качества исследований выполняется с 1995 г. в рамках «Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований» (ФСВОК), основной целью которой является оказание помощи диагностическим лабораториям в обеспечении качества исследований за счет совершенствования внутрилабораторных систем управления качеством, предоставления контрольных образцов, компьютерных программ и методических пособий. Лаборатории, участвующие в ФСВОК,

получают объективные данные о качестве выполняемых исследований, позволяющие принимать решения о совершенствовании внутрилабораторной системы обеспечения качества. Росздравнадзор уже в 2005 г. создал «Системы сертификации процессов выполнения лабораторных исследований» [60]. Применение в клинической практике высокоинформативных лабораторных технологий поставило вопрос о пересмотре организации лечебно-диагностического процесса в формате доказательной медицины. Учитывая значимость результатов лабораторного тестирования, обязательным условием функционирования современной лаборатории является система управления качеством.

Одно из принципиальных требований к работе лабораторий Службы Крови – адекватное качество исследований, соответствие ГОСТ Р ИСО 15189-2006 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности», введенному с 1 января 2008 [16] и в связи с реализацией Постановления Правительства Российской Федерации от 16 апреля 2012 г. N 291 «О лицензировании медицинской деятельности» и планируемым к введению с 1 июня 2016 года новым ГОСТ Р ИСО 15189» [47].

1.5. Частная вирусологическая диагностика

1.5.1 Лабораторная диагностика вирусного гепатита В

При обследовании пациента на наличие ВГВ-инфекции проводят определение широкого спектра маркеров этого вируса – антигенов и антител: HBsAg, анти-HBs, HBeAg, анти-HBe и анти-HBcIgM; качественное и количественное определение вирусной ДНК. Профиль маркеров инфекции, вызванной ВГВ, показан на рисунке 13.

Зная комбинацию серологических и молекулярного маркеров ВГВ, можно определить стадию вирусного процесса, дифференцировать острую (наличие HBsAg, анти-HBcIgM, HBeAg, ДНК ВГВ) инфекцию от хронической, переход в

фазу выздоровления (анти-HBs, анти-HBe). Уровень вирусной репликации оценивают двумя способами: непрямым (определение HBsAg и HBeAg) и прямым (определение концентрации вирусной ДНК).

На основании приведенного профиля (рисунок 13) можно сделать заключение, что HBsAg может быть обнаружен в крови лишь через месяц после первичного инфицирования ВГВ, после чего он выявляется в среднем в течение 63 дней. Определение ДНК вируса позволяет сократить негативное окно, период, когда у инфицированного пациента не обнаруживают никакие маркеры ВГВ, до 15 дней. ДНК вируса сохраняется в определяемой концентрации в крови более трех месяцев [385]. Позже более эффективным для лабораторной диагностики оказывается определение другого маркера ВГВ, анти-HBc, который можно выявить уже через 2-3 месяца от момента инфицирования.

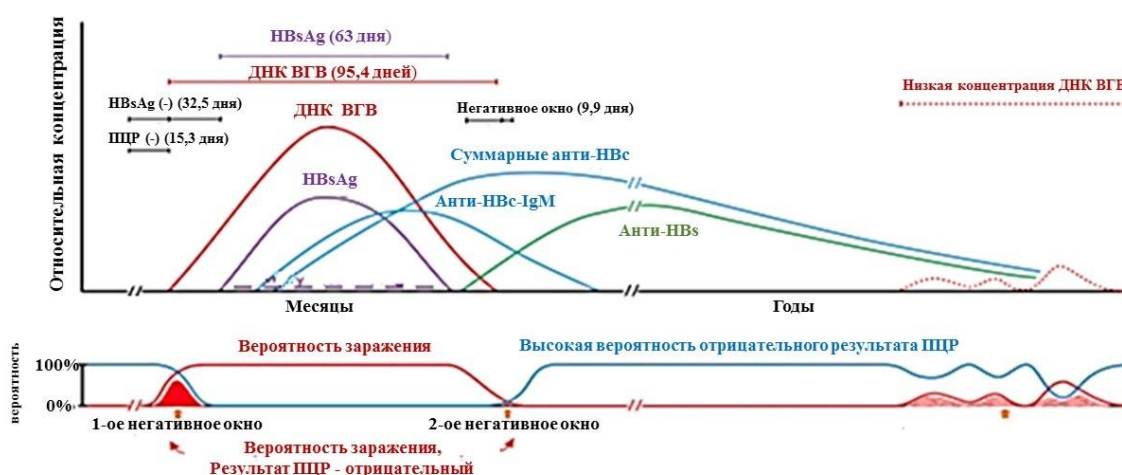


Рисунок 13. Временной профиль маркеров ВГВ-инфекции [385].

Ядерный антиген (core) ВГВ (HBcAg) образует капсид вируса и является мощным иммуногеном. Антитела к HBcAg появляются первыми и продолжают персистировать наиболее долго после завершения инфекционного процесса. Антитела к ядерному антигену вируса класса IgM присутствуют как при остром гепатите, так и при вспышках активности при хроническом гепатите В.

Одними из самых важных серологических маркеров ВГВ являются HBeAg и анти-HBe. Наличие полных частиц Дейна всегда сопровождается HBeAg,

свидетельствующим об активной репликации ВГВ и высокой инфекциозности крови, причем высокие титры HBeAg соответствуют и высокой ДНК-полимеразной активности [94]. HBeAg обнаруживается в крови уже при первых клинических проявлениях острого гепатита В всего на неделю позже HBsAg. При остром гепатите В циклического течения HBeAg циркулирует коротковременно. Анти-HBe появляются после второй недели желтушного периода и являются благоприятным признаком исхода заболевания [59]. Сероконверсия HBeAg-анти-HBe знаменует снижение активности инфекционного процесса [37, 59]. Анти-HBe могут циркулировать в течении 2-5 лет, реже несколько месяцев. О переходе в хроническую форму вирусного гепатита В свидетельствует присутствие HBeAg в крови больных более 8 недель [59], при этом анти-HBe могут образовываться через много лет после появления анти-HBc или вовсе отсутствовать. Появление анти-HBe в остром периоде при тяжелых формах инфекции имеет неблагоприятное прогностическое значение и обусловлено мутациями в pre-core зоне с образованием «е-негативного» штамма ВГВ [59, 227, 345]. Тест на анти-HBs использую наряду с анти-HBc для определения, приобрел ли пациент иммунитет в результате перенесенной инфекции или у HBsAg-отрицательного пациента имеется хронический гепатит В. Кроме того, наличие изолированных анти-HBs свидетельствует об эффективной вакцинации [1].

1.5.2 Лабораторная диагностика вирусного гепатита С

В отличие от ВГВ количество лабораторных маркёров ВГС ограничено. Профиль маркеров ВГС представлен на рисунке 14. При диагностике ВГС-инфекции в первую очередь проводят исследование на суммарные антитела к различным белкам вируса: core, NS3, NS4 и NS5, методом ИФА, которые появляются через 7-8 недель [121, 136]. Более ранним серологическим маркером ВГС является ядерный антиген, поэтому для обследования доноров крови и ее компонентов рекомендовано использование комбинированных тестов, позволяющих одновременно выявлять ядерный антиген и суммарные антитела к белкам вируса [81, 90, 176, 409, 418]. Тест-системы последнего поколения

демонстрируют достаточно высокую чувствительность (до 97%) и позволяют получить положительный сигнал в период от 4 до 8 недель от момента заражения [176].

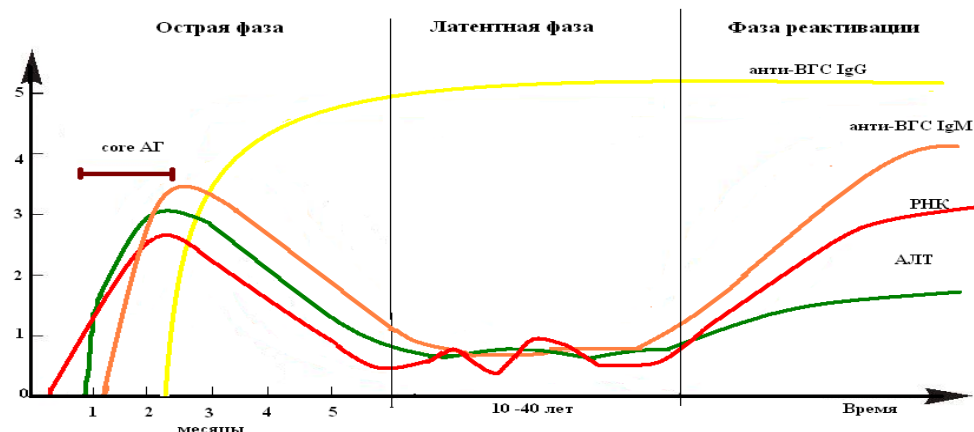


Рисунок 14. Временной профиль маркеров ВГС-инфекции.

РНК ВГС обнаруживается в плазме крови в среднем к 10-му дню после заражения и является первым маркером острого вирусного гепатита С, что позволяет диагностировать заболевание до появления специфических антител [32]. На основании результатов тестирования РНК ВГС и спектра антител можно определить стадию вирусного процесса.

В качестве подтверждающего теста используют иммуноблот (RIBA) [409], с помощью которого могут быть выявлены антитела к белкам ВГС по отдельности. Иммуноблот – это референсный тест, позволяющий уменьшить количество ложноположительных результатов, полученных в скрининговых методах.

1.6 Риск трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС

За последние 20 лет достигнуты значительные успехи в повышении вирусной безопасности донорской крови, о чем свидетельствует сокращение остаточного риска трансфузионного инфицирования. Благодаря совершенствованию процедуры отбора доноров и тестирования их крови на

инфекционные маркеры, а также медикопрофилактической работе, кровь во многих странах стала безопаснее, чем когда-либо [419].

Работы по расчету риска передачи с кровью ВГВ, ВГС, ВИЧ и человеческого Т-лимфотропного вируса 1 типа появились в конце XX века [208, 333, 349]. Остаточный риск трансфузионного инфицирования в 9 странах Европы, по данным Р.М. Roger и соавт. [338], в расчете на 1.000.000 кроводач составлял для ВГВ – 6,92 (1,15-40,8), для ВГС – 15,0 (0,62-36,9) и ВИЧ – 0,58 (0,00-1,27). В РФ в 2000 г., на основании анализа данных инфицированности вирусными агентами крови доноров за 4 года (1996-1999 гг.), было выявлено, что на каждые 100 кроводач приходится 1 случай возможной передачи ВГВ или ВГС [15]. Риск контаминации препаратов плазмы при отрицательных результатах исследования исходного сырья на регламентированные вирусные маркеры был рассчитан в 2004 г., и составил для «Плазмы для фракционирования» 1:288 по HBsAg, 1:186 по анти-ВГС, 1:2472 по анти-ВИЧ 1; для «Криопреципитата» – 1:151, 1:184, 1:7330, соответственно [25]. В более поздних работах остаточный риск трансфузионного инфицирования ВГС составил 940, 1600 и 630 на 1 миллион кроводач, трансфузий и единиц плазмы, соответственно [30]. В последнее время проблеме остаточного риска трансфузионного инфицирования посвящен ряд работ отечественных авторов [6, 11, 17], причем в России этот показатель в несколько десятков раз выше, чем в США: для вируса иммунодефицита человека, ВГВ и ВГС в 80, 35 и 61 раз, соответственно [17].

До 1970 г. около 6% реципиентов множественных трансфузий приобретали ВГВ-инфекцию. С тех пор в мире достигнуты огромные успехи в обеспечении вирусной безопасности гемотрансфузий. От уровня несколько инфекционных агентов на 1000 донаций, сегодня риск по ВГВ снизился до 1: 500000 – 1: 1000000. Кровь стала более чем в 1000 раз безопаснее по сравнению с данными пятидесятилетней давности. Такой успех был достигнут за счет многих факторов, в их числе: повышение чувствительности тестов для выявления поверхностного антигена ВГВ; тестирование в некоторых странах антител к ядерному антигену вируса; улучшение процедуры отбора доноров; программы вакцинации против

вирусного гепатита В; и, наконец, введение исследования на наличие нуклеиновой кислоты ВГВ [290]. Тем не менее, нулевой риск инфицирования при переливании компонентов и препаратов донорской крови остается пока недостижимой целью.

Тестирование всех кроводач на наличие анти-НВс, введенное в ряде стран Западной Европы и США с 1980 г. в качестве суррогатного маркера вирусного гепатита ни А ни В, значительно снизило число новых случаев посттрансфузионного гепатита В [189, 290]. Однако, существует мнение о некорректном отстранении доноров крови и ее компонентов за счет ложноположительных реакций, особенно в странах с низкой распространенностью вирусного гепатита В. Так, введение такого тестирования привело к потере 2% доноров в Германии, 2,5% – в Новой Зеландии и 6-7% – в Швейцарии. С целью уменьшения потерь среди потенциальных доноров предложено исследовать анти-НВс-положительные образцы крови на наличие анти-НВс, и в случае, если титр анти-НВс выше 100 мМЕ/мл и не выявлена ДНК ВГВ при индивидуальном тестировании с чувствительностью теста не менее 12 МЕ, допускать такие компоненты крови до клинического применения. В Японии применяют компоненты крови, содержащие анти-НВс и анти-НВс в высоком титре (>200 мМЕ/мл), но отрицательные по ДНК ВГВ в индивидуальной постановке [347, 408]. После введения в практику в Японии данного алгоритма не было отмечено случаев посттрансфузионного гепатита В [158, 188, 275, 344, 347]. ВОЗ, также, рекомендует считать пригодными для клинического применения компоненты крови, позитивные по анти-НВс и содержащие анти-НВс в титре >100 мМЕ/мл [54, 197]. Нет доказательств, насколько надежно защищает реципиента высокий титр анти-НВс от инфицирования ВГВ. Кроме того, остается неясным, имеет ли значение объем переливаемых компонентов крови, содержащих анти-НВс, и иммунный статус реципиента.

Возможные причины наличия изолированных антител к ядерному антигену ВГВ в крови следующие: 1) поздняя острая инфекция, когда НВсAg уже не

определяется, а низкий уровень ДНК ВГВ может иметь место непродолжительное время; 2) хроническая инфекция – с концентрацией HBsAg ниже определяемого; 3) инфекция вызванная мутантным по S гену вирусом [76, 202, 271, 395]. Таким образом, анти-НВс могут определяться у больных хроническим вирусным гепатитом В и у выздоравливающих. Показана существенная роль тестирования на анти-НВс в выявлении доноров с латентным течением вирусного гепатита В, в крови которых ДНК ВГВ содержится в концентрации ниже детектируемого значения [360].

Карантинизация плазмы в течение 15 недель позволяет выявить при контрольном исследовании 95% доноров, находящихся в момент кроводачи в серонегативном периоде заболевания, составляющем 7-8 недель. ПЦР тестирование пулов плазмы снижает риск передачи и ВГС, поскольку РНК ВГС может быть определена в плазме через 1-2 недели от момента заражения, а через 6 недель достигает высоких концентраций [121, 136].

С внедрением молекулярных методов в США, по данным Stramer S.L. [358], остаточный риск посттрансфузионного инфицирования существенно снизился: до 1: 2000000 донаций для ВИЧ и ВГС, и до ~1 на 300000 – для ВГВ. Самые низкие показатели остаточного риска трансфузионного инфицирования до внедрения ПЦР-тестирования были характерны для Франции: для ВГС этот показатель составлял приблизительно 1:1500000 кроводач. Однако после введения исследования молекулярных вирусных маркеров в 2001-2003 гг. остаточный риск трансфузионного инфицирования ВГС во Франции был уже ~1 на 10000000 донаций [309].

В Службе крови РФ до 2013 г. использование молекулярных методов было ограничено и носило рекомендательный характер. Только с введение новых санитарных правил по профилактике ВГС-инфекции стало обязательным обследование при каждой донации на наличие РНК ВГС доноров крови и ее компонентов [52].

В развитых странах уже много лет ПЦР-тестированию подвергаются минипулы и большие производственные пулы плазмы. Конечно, использование такого формата исследования молекулярных маркеров вирусов является выгодным экономическим решением, поскольку снижение стоимости диагностики, что влечет и снижение стоимости заготавливаемых компонентов крови. Однако вопрос обеспечивает ли такой подход должный уровень вирусной безопасности, остается актуальным.

Множество работ в последнее десятилетие посвящено особенностям патогенеза инфекций, вызванных ВГВ и ВГС [80, 102, 139, 360, 378]. Отмечено, что присутствие в крови различных компонентов вирусов и антител к вирусным белкам носит транзиторный характер. Основным лабораторным маркером ВГВ является HBsAg, который периодически может не определяться в крови больных хроническим гепатитом В даже в фазе обострения [360]. Кроме того, широкое распространение латентных форм вирусных гепатитов В и С представляет важную проблему для здравоохранения [31, 125]. Такие формы инфекции, кроме причинения ущерба здоровью нации в целом, влияет и на качество заготавливаемой донорской крови и её компонентов. Латентный гепатит В встречается повсеместно, но данные по его распространенности среди различных категорий лиц, часто контрастные из-за различной чувствительности и специфичности используемых для диагностики методов. Установлено, что ВГВ передается при переливании крови и трансплантации печени от доноров с латентной формой ВГВ-инфекции и осложняет развитием классической клинической формы вирусного гепатита В у вновь инфицированных лиц. Распространенность латентной ВГВ-инфекции в России составляет от 0,9% до 5,6 %, в то время как в США, Канаде, странах Западной Европы она не превышает 1,2% [31]. В исследовании De Marco и соавт. [156], частота встречаемости латентной ВГС-инфекции в группе лиц без патологии печени и повышения сывороточных концентраций аминотрансфераз, среди которых были и доноры крови, составила 3,3%.

1.7. Латентные формы вирусных гепатитов

1.7.1. Латентная форма вирусного гепатита В (ЛГВ)

Естественное течение хронического гепатита В схематично делится на пять необязательно последовательных фаз: фаза иммунной толерантности; иммуноактивная HBeAg-позитивная фаза; неактивное носительство вируса гепатита В (ВГВ); HBeAg-негативная фаза; HBsAg-негативная фаза [160]. Последняя из них – ЛГВ при которой отсутствуют клинические проявления заболевания. Согласно мнению экспертов, ЛГВ – это «наличие вирусной ДНК в печени (независимо от присутствия ДНК ВГВ в сыворотке крови) у HBsAg-негативных лиц» [325]. Таким образом, эта «фаза» с низким уровнем репликации ВГВ, когда ДНК ВГВ выявляется в печени в низких концентрациях (<200 МЕ/мл) и может не обнаруживаться в сыворотке, в то время как могут присутствовать антитела к ядерному белку (анти-HBc) и/или поверхностному (анти-HBs) белку ВГВ [325].

Интерес к проблеме ЛГВ возник с момента открытия инфекционной природы «сывороточного» гепатита, но стал центральным вопросом гепатологии только в 1999 г., после опубликования результатов тестирования геномов ВГВ в биоптатах печени от большого числа HBsAg-негативных пациентов с хроническими заболеваниями печени. Это исследование показало, что ЛГВ может ускорять прогрессию цирроза у больных хроническим вирусным гепатитом С. Кроме того, латентное течение вирусного гепатита В не связано с наличием генетических мутаций ВГВ [122]. Однако существует и противоположное мнение, что наличие ЛГВ может быть связано как с массовой вакцинацией, так и с мутациями в S-гене [392].

Растущий интерес к проблеме ЛГВ наглядно представлен на рисунке 15, где ключевым моментом в изучении ЛГВ является 1999 г. [327]. За последующие пятнадцать лет стало известно [33, 238, 268], что ЛГВ обусловлена подавлением репликативной активности вируса, причем причины такого подавления еще не до конца выяснены, но очевидно, что в этот процесс вовлечены иммунный надзор и

эпигенетические механизмы хозяина, а иммуносупрессивные состояния (в основном на фоне иммуносупрессивной или химиотерапии) приводят к его реактивации и развитию острого гепатита. ЛГВ может способствовать прогрессии фиброза, цирроза печени и развитию гепатоцеллюлярной карциномы. С другой стороны, ЛГВ сохраняет большую часть прямых трансформирующих свойств явной ВГВ-инфекции, например, способность интегрироваться в геном хозяина и синтезировать про-онкогенные белки [327].

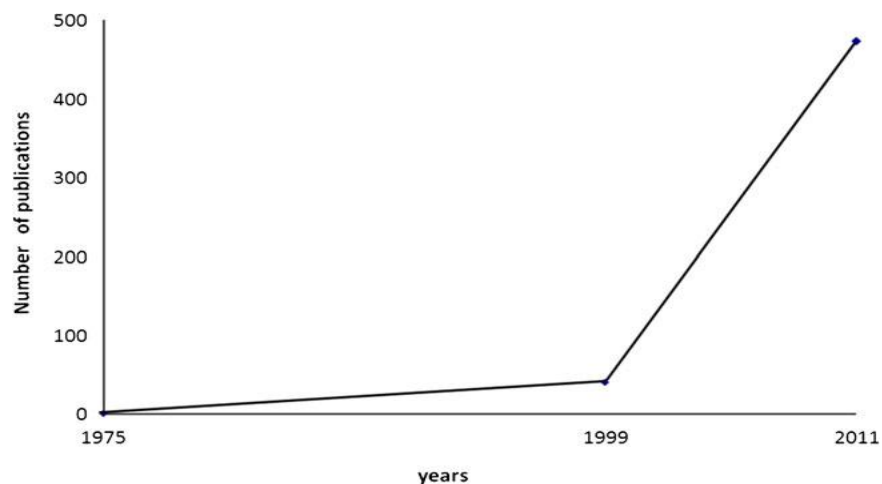


Рисунок 15. Рост числа публикаций, посвященных ЛГВ, с течением времени [327]

В ряде случаев HBsAg невозможно выявить с помощью коммерческих тест-систем, несмотря на наличие эписомальных, свободных геномов ВГВ на внутрипеченочном уровне, либо за счет генетически измененных вариантов ВГВ в гене S и нарушения синтеза S белков (S-ускользающих мутантов), либо за счет мутаций ВГВ с повреждением репликативной активности [330]. В большинстве случаев ЛГВ вызвана вирусом, геномы которого репликативно компетентны и сопоставимы с генетической гетерогенностью изолятов вируса от лиц с HBsAg-позитивной инфекцией [314]. Считается, что ЛГВ является следствием сильного подавления репликации ВГВ и экспрессии его генов за счет других механизмов, а не мутаций. Прежде чем обсуждать эти механизмы, важно учитывать, что ЛГВ часто связана с наличием антител к белкам ВГВ (ядерному и поверхностному: анти-HBc и анти-HBs), но более чем у 20% лиц с латентным течением инфекции отсутствуют все маркеры ВГВ в сыворотке крови [375]. В соответствии с

вышеизложенным, можно выделить серопозитивный (анти-HBc и/или анти-HBs положительный) и серонегативный (анти-HBc и анти-HBs отрицательные) варианты ЛГВ. При серопозитивной форме ЛГВ HBsAg может перестать определяться либо после быстрого разрешения острой формы инфекции, или через много лет хронической ВГВ-инфекции. При серонегативной форме ЛГВ все маркеры ВГВ либо постепенно перестают детектироваться, либо отсутствуют с начала инфекции, что было подтверждено в эксперименте на сурках [314]. Таким образом, ЛГВ развивается по сложному сценарию с различными вирусологическими и иммунологическими профилями.

В настоящее время нет доступных экспериментальных систем для адекватного изучения ВГВ-инфекции – комплексного события, характеризующегося наличием различных и часто нестабильных фаз [159]. И хотя наши знания ограничены, существует много свидетельств, что именно факторы хозяина вовлечены в индукцию и поддержание латентных форм. Еще одно доказательство этого – исследование *in vitro*, показавшее, что изоляты ВГВ, выделенные из ткани печени больного ЛГВ, полностью восстанавливают репликацию, транскрипцию и синтез белков в культуре клеток [314]. Многочисленные клинические исследования [375, 389, 420] показали, что любые условия, вызывающие иммуносупрессию (гематологические злокачественные новообразования, химио- или иммунотерапия и т.д.), могут спровоцировать реактивацию ЛГВ с появлением типичного серологического профиля активной инфекции. Этого достаточно для утверждения о причастности иммунного надзора организма больного к развитию ЛГВ. Кроме того, CD4 и CD8 – клеточные ответы длительной памяти против антигенов ВГВ обнаруживаются и через несколько лет после выздоровления от острого гепатита В. В латентной фазе инфекции вирус синтезирует незначительное количество антигенов, которые не обнаруживаются с помощью имеющихся лабораторных методов, но их достаточно для поддержания ВГВ-специфического Т-клеточного ответа [302, 335]. В печени у лиц с латентной формой инфекции обнаружены как молекулы ковалентно замкнутой кольцевой ДНК и значительные количества матричной РНК ВГВ, так и все вирусные

транскрипты [273, 316, 399]. Следовательно, клиническое разрешение болезни свидетельствует не о полной эрадикации ВГВ, а лишь о способности иммунной системы пациента держать под контролем репродукцию вирусов, оставшихся в печени [327].

У пациентов с ЛГВ отображаются разные профили ВГВ-специфического Т-клеточного ответа в зависимости от наличия или отсутствия анти-НВс [417]. Циркулирующие ВГВ-специфические Т-клетки обнаружены у серонегативных (анти-НВс отрицательных) и серопозитивных (анти-НВс положительных) пациентов с латентной формой инфекции в сравнимых количествах, но продукция интерферона γ этими клетками у серонегативных значительно слабее, чем у серопозитивных лиц. Доказательства получены в эксперименте на сурках [285], и была выдвинута гипотеза, что эти особенности клеточно-опосредованных иммунных реакции у серопозитивных и серонегативных пациентов с ЛГВ отражают различные механизмы передачи ВГВ. На той же модели показано, что воздействие низкой заражающей дозы ($<10^3$ вирионов) приводит к хронической инфекции при отсутствии вирусных маркеров в сыворотке крови. У сурка с первично латентной формой ВГВ-инфекцией не формировался защитный иммунитет. Авторы [285] предположили, что Т-клеточный ответ генерируется только после инфицирования более высокими дозами вируса. Исследование ВГВ-специфического иммунного ответа у доноров крови с латентной формой гепатита В в значительной степени подтвердило это наблюдение: зафиксирован мощный, ВГВ-мультиспецифический Т-клеточный ответ, причем количественно сильнее, чем у неактивных носителей и даже у пациентов с разрешившейся формой заболевания [101]. Эти данные привели к выводу, что иммунная система хозяина может подавлять репликацию ВГВ, что объясняет очень низкую, в ряде случаев не выявляемую, вирусную нагрузку и отсутствие обнаруживаемого HBsAg [101]. Соответствующие доказательства роли иммунной системы хозяина в управлении латентной ВГВ-инфекцией получены в исследованиях у ВИЧ-инфицированных пациентов [148]. У этих пациентов ВГВ-виремия в значительной степени связана

с малым количеством CD4. У пациентов, имеющих более 500 CD4 клеток/мм³, не наблюдали латентного течения вирусного гепатита В. Таким образом, дефицит клеточного иммунитета, обусловленный снижением количества CD4 клеток при ВИЧ-инфекции, может привести к потере контроля над активностью ВГВ и активации репликации вируса до обнаруживаемых значений. Исследование экспрессии цитокинов у ВИЧ-инфицированных лиц с ЛГВ показало снижение количества интерлейкинов 8 и 10, секреторных вариантов рецепторов Fas и FasL [270]. Поскольку при латентном течении инфекции значительно снижены секреторные варианты рецепторов Fas, следовательно, понижено и ингибирование апоптоза, который, в свою очередь, ответственен за частичный клиренс вируса [270]. Не только адаптивный, но и врожденный иммунный ответ может играть роль в контроле вирусной репликации. Эксперименты на трансгенных мышах и шимпанзе [199] показали, что воспалительные цитокины, такие как интерферон типа 1 и фактор некроза опухолей α , могут эффективно подавлять репликацию вируса через нецитотоксические иммуно-опосредованные механизмы. Клетки печени сами способны обеспечивать первичный иммунный ответ на ВГВ-инфекцию путем продукции интерферонов типа 1, которые подавляют репликацию вируса [265]. Следовательно, врожденный иммунный ответ также контролирует активность ВГВ, особенно при серонегативном варианте ЛГВ.

Кроме рассмотренных выше иммунологических факторов, существуют и эпигенетические факторы, влияющие на формирование латентной ВГВ-инфекции. Молекулы ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ накапливаются в ядре инфицированных гепатоцитов в виде стабильной минихромосомы, упакованной в нуклеосомный массив гистонов и негистоновых белков, аналогично хроматину клеток хозяина [252]. Подобная нуклеосомная организация вирусного генома описана для нескольких ДНК-вирусов, таких как полиома вирусы, вирусы герпеса, обезьяний вирус 40 и вирусы папилломы человека и крупного рогатого скота [255]. ВЭБ и другие герпесвирусы, например, широко используют

эпигенетические модификации гистонов в качестве механизма контроля транскрипции во время их латентного статуса [105, 365].

Разработан чип на основе ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ [153, 252, 313]. Используя данный чип, удалось обнаружить, что несколько клеточных факторов транскрипции, а также различные хроматинмодифицирующие ферменты могут связывать ковалентно замкнутую кольцевую ДНК ВГВ в клетках, когда происходит репликация ВГВ [99, 153]. Предварительные данные анализа ткани печени пациентов с ЛГВ показали, что подавление транскрипции/репликации вирусных эписом в печени происходит на уровне организации хроматина [327]. Интерферон α способен ингибировать управляемую ковалентно замкнутой кольцевой ДНК транскрипцию геномных и субгеномных РНК. В дополнение к посттрансляционной модификации гистонов, метилирование регионов ДНК ВГВ, богатых сгруппированными последовательностями остатков цитозина с гуанином (CpG-островков), может также способствовать регулированию экспрессии генов вируса [230, 252, 388].

В отсутствие обнаруживаемого HBsAg в сыворотке крови при ЛГВ интерес исследователей был ориентирован на мутации в поверхностном гене и его регуляторных регионах. Мутации в ключевых иммунодоминантных регионах поверхностного белка способны уменьшить иммунное узнавание вируса, делеции в области preS1 нарушают упаковку вируса, структурные изменения геномных регуляторных областей, приводят к уменьшению экспрессии HBsAg, влияют на посттрансляционное производство белков ВГВ [164, 325, 330]. Однако мутации не обнаружены в изолятах ВГВ, полученных от большинства лиц с ЛГВ; при этом их находили в изолятах от больных с активной ВГВ-инфекцией, в том числе и с высокой вирусной нагрузкой [101, 312, 314, 387].

При сочетанной вирусной инфекции активность ВГВ может быть снижена. В частности, ВГС подавляет репликацию ВГВ до концентрации, которая определяет развитие латентной формы гепатита. В исследовании *in vitro* было показано, что ядерный белок ВГС тормозит репликацию ВГВ [328], и ЛГВ наиболее распространена именно у ВГС-инфицированных пациентов [330, 375].

Тем не менее, вопрос о взаимодействии между этими вирусами сохраняется. Эксперименты проводились с полноразмерным геномом ВГВ и репликоном ВГС (это исследование не ограничено одним белком ВГС), не было отмечено взаимовлияния между этими вирусами [98]. В настоящее время нельзя сделать окончательный вывод о роли ВГС в индукции латентного течения вирусного гепатита В. У ВИЧ-инфицированных лиц часто наблюдается как явная, так и латентная ВГВ-инфекция, но нет никаких доказательств возможного прямого влияния ВИЧ на ВГВ. Другие инфекционные агенты также могут препятствовать репликации ВГВ. Показано, что *Schistosoma mansoni* способна значительно подавлять репликацию ВГВ у трансгенных мышей [277].

Нет стандартных, валидированных методик для обнаружения ЛГВ. «Золотой стандарт» при этом – анализ ДНК из тканей печени с использованием высокочувствительных и специфичных методов, то есть, ПЦР, причем олигонуклеотидные праймеры должны быть специфичны для различных регионов генома ВГВ при сохранности общих нуклеотидных последовательностей всех генотипов [325]. Однако образцы ткани печени редко доступны, поскольку биопсия печени может привести к осложнениям. Анализ образцов сыворотки или плазмы крови является наиболее распространенным подходом к выявлению инфицированных ВГВ лиц. Чтобы повысить чувствительность теста, рекомендуется выделение ДНК из 1 мл сыворотки (или плазмы) и серийное тестирования собранных образцов с учетом пульсационного профиля виремии [325]. Существует мнение [124, 210, 325], что серологический анализ на анти-НВс должен быть использован для выявления потенциальных лиц с ЛГВ, особенно среди доноров крови, тканей и органов, когда реципиенту предполагают проведение иммуносупрессивной терапии.

Известны случаи передачи ВГВ от донора с ЛГВ при трансплантации печени наивным по ВГВ реципиентам с развитием *de novo* гепатита [141, 330]. Это очевидно, поскольку гепатоциты являются резервуаром ковалентно замкнутой кольцевой ДНК вируса. Реже ВГВ передается при трансплантации

почек, сердца и костного мозга [330]. Рекомендовано проведение профилактики вирусного гепатита В у HBsAg-отрицательных пациентов, которым планируется пересадка печени от анти-HBc-позитивных доноров: в первую очередь – это вакцинация, а при ограничении времени – с помощью специфического иммуноглобулина, ламивудина или их сочетания. Такая профилактика эффективна у реципиентов в предотвращении заражения ВГВ [143], но не позволяет избежать реактивации уже имеющейся инфекции [141]. Отмечены случаи развития гепатита В у пациентов после трансплантации печени, которые уже были инфицированы до трансплантации, и/или получили новый орган от носителя ВГВ. В «новой» печени присутствовали геномные последовательности ВГВ [147]. Есть свидетельства быстрой прогрессии гепатита В после трансплантации органов и тканей у лиц с ЛГВ [373].

Хорошо известный феномен – реактивация ВГВ у больных с заболеваниями иммунной системы или у получающих иммуносупрессивную и/или химиотерапию [390]. Интерес к этому явлению растет благодаря новым мощным иммуномодулирующим препаратам. Часто ВГВ активизируется у HBsAg-позитивных лиц на фоне иммуносупрессии и характеризуется молниеносным течением гепатита [245, 246, 263, 272]. Применение ингибиторов гистондеацетилазы может приводить к реактивации ВГВ [196, 337], что подтверждает участие эпигенетических механизмов в борьбе с этим вирусом. Реактивация вируса у пациентов с латентной формой ВГВ-инфекции наблюдается реже, чем в случае HBsAg-позитивного гепатита В, и зависит от ряда факторов. Заболевания системы крови, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток и применение ритуксимаба повышают риск реактивации ЛГВ [301, 330, 407]. Пациенты с ЛГВ могут менять ВГВ-серологический профиль в случае ослабления иммунитета. На фоне иммуносупрессивной терапии перестают выявляться антитела к HBsAg. В двух исследованиях показано, что после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов происходила повторная сероконверсия HBsAg, хотя клинически типичный острый гепатит развивался редко [297, 386], поэтому большинство таких случаев могло быть пропущено.

Хорошо зарекомендовала себя профилактическая терапия аналогами нуклеозидов с целью предотвращения реактивации инфекции у HBsAg-положительных пациентов, перенесших иммуносупрессивное лечение. Подобная терапия в случае подозрения на латентную ВГВ-инфекцию при отсутствии HBsAg и возможном наличии анти-HBc по-прежнему остается предметом дискуссии. Европейской ассоциацией по изучению печени рекомендовано мониторирование у таких пациентов концентраций АЛТ и ДНК ВГВ в крови и проведение терапии аналогами нуклеозидов в случае подтверждения реактивации ЛГВ до повышения активности АЛТ [159]. Подобная тактика позволяет предотвратить повреждение печени и развитие гепатита. Современные противовирусные препараты позволяют эффективно лечить различные формы вирусного гепатита, в том числе, и возникающие вследствие реактивации ЛГВ, однако эффективность такой терапии зависит от сроков начала лечения [151, 343].

У лиц, переболевших острым гепатитом, в печени присутствуют геномы ВГВ при отсутствии клинических и биохимических признаков ее повреждения [329, 330]. Только при гистологическом исследовании ткани печени спустя несколько десятилетий после разрешения острого гепатита были обнаружены признаки некроза и воспаления [103, 413]. В эксперименте показано, что после выздоровления от острого гепатита у сурков на протяжении всей жизни сохранялось небольшое количество реплицирующегося вируса [285]. ЛГВ может способствовать или ускорять прогрессирование вирусного гепатита С и связанных с ним хронических заболеваний печени, приводя к наиболее тяжелым формам [330, 374]. Показана связь между фазами подъема активности АЛТ и появлением циркулирующих ДНК ВГВ у пациентов с хроническим гепатитом С, что предполагает активную роль репликации ВГВ в повреждение клеток печени [138, 226]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что в условиях иммунной компетенции латентная ВГВ-инфекция не сопровождается повреждением ткани печени, но при наличии дополнительных факторов, таких как ВГС-инфекция и злоупотребление алкоголем, заболевание прогрессирует и усугубляется с течением времени [331]. Еще в 1990-х гг. установлено негативное влияние ЛГВ на

вирусологический ответ у пациентов с хроническим гепатитом С во время терапии интерфероном [330, 374]. Принимая во внимание гипотезу, что ЛГВ не в состоянии вызывать тяжелого повреждения печени, трудно дать объяснение данным, свидетельствующим, что именно с этой формой гепатита связано прогрессирование фиброза и цирроза печени у пациентов с криптогенным заболеванием печени [330, 374]. Правда, часть таких случаев касается ранее продуктивной ВГВ-инфекции в виде клинически выраженного гепатита с последующим переходом в латентную форму.

ВОЗ включила ВГВ в «Группу 1» канцерогенов человека, классифицируя его как один из самых важных онкогенных агентов после курения табака [315]. Многие эпидемиологические и молекулярные исследования, проведенные с 1980-х гг., почти единогласно свидетельствуют о важнейшей роли персистенции ВГВ в развитии гепатоцеллюлярной карциномы даже при латентной инфекции [117, 315]. ЛГВ является фактором риска развития гепатоцеллюлярной карциномы как у ВГС-инфицированных, так и у лиц, у которых маркеры ВГС не выявляются [356]. Эксперименты на животных показали, что сурки и суслики после инфицирования соответствующими *hepadnaviruses* находятся в группе высокого риска развития гепатоцеллюлярной карциномы, в том числе и после клиренса вируса с исчезновением HBsAg и сероконверсией [315]. В основе развития гепатоцеллюлярной карциномы лежат сложные и многофакторные патогенетические механизмы, и ВГВ участвует во многих из них. В частности, хроническая ВГВ-инфекция оказывает про-онкогенное воздействие посредством прямых и косвенных механизмов. Косвенные механизмы - это склонность индуцировать непрерывные или периодические фазы некроза/воспаления печени, что содействует переходу хронического гепатита в цирроз с последующим развитием гепатоцеллюлярной карциномы. Прямые канцерогенные механизмы обусловлены способностью ВГВ интегрироваться в геном гепатоцита и экспрессировать онкогенные вирусные белки. Последние данные указывают на связь между ВГВ-инфекцией, в том числе ЛГВ, и таких злокачественных новообразований, как внутрипеченочная холангиокарцинома и неходжкинские

лимфомы [180, 269, 304, 339, 367]. Онкогенные механизмы ВГВ в этих случаях еще не полностью выяснены, но происхождение опухоли из гепатоцитов и холангиоцитов и предполагаемый лимфотропизм ВГВ обеспечивают некоторую теоретическую основу этой гипотезы.

Таким образом, изучение ЛГВ имеет фундаментальное значение и для общего понимания ВГВ-инфекции. Особенно актуально изучение проблем диагностики ЛГВ у доноров крови и ее компонентов, которая не выявляется регламентированными в Службе крови тестами.

1.7.2. Латентная форма вирусного гепатита С (ЛГС)

В 2004 г. была впервые описана новая форма ВГС-инфекции у пациентов с персистирующим повышением функциональных тестов печени, при этом у них были отрицательные результаты исследования анти-ВГС и РНК вируса в сыворотке крови [133]. Несмотря на отсутствие иммунологических маркеров ВГС, 57% таких пациентов имели РНК ВГС в печени, и такая клиническая ситуация получила название «латентной формы ВГС-инфекции». У большинства пациентов с ЛГС в гепатоцитах были обнаружены «минус» нити РНК, комплементарные геномной, что указывает на активную репликацию вируса. Описаны два различных клинических варианта ЛГС. Первый, когда при нормальных значениях печеночных ферментов в сыворотке крови определяются анти-НСV и отсутствует РНК ВГС (бессимптомные носители ВГС), причем почти 90% таких пациентов имеют вирусную РНК в печени и в мононуклеарных клетках периферической крови [126, 173, 323]. Второй вариант наблюдается у анти-ВГС-негативных лиц после спонтанного разрешения ВГС-инфекции или проведения противовирусной терапии [135, 305, 307, 324]. В этих случаях РНК ВГС обнаруживается в печени и мононуклеарных клетках периферической крови спустя годы после нормализации значений печеночных ферментов и отсутствии РНК ВГС в сыворотке крови. При втором клиническом варианте ЛГС сохраняется постоянное воспаление ткани печени вплоть до некроза. Таким образом, существует два типа ЛГС: 1) среди лиц с нормальными значениями ферментов

печени, но при наличии анти-ВГС; 2) среди лиц с повышенными значениями ферментов печени, но в отсутствии анти-ВГС.

У пациентов с нарушенной функцией печени РНК ВГС была выявлена в гепатоцитах и 70% случаев в моноклеарных клетках периферической крови, при этом в плазме крови молекулярные и серологические маркеры ВГС отсутствовали [133]. Таким образом, РНК ВГС, обнаруженная в биоптатах печени и моноклеарных клетках периферической крови, стала доказательством наличия латентной ВГС-инфекции у больных с повышенными сывороточными концентрациями печеночных ферментов при отсутствии маркеров ВГС в плазме крови в целом ряде исследований [110, 150, 152, 167, 221, 415]. Было показано, что ВГС реплицируется в моноклеарных клетках периферической крови [134]. Латентная инфекция была обнаружена у пациентов, находящихся на гемодиализе [85, 86], в семейном окружении больных ЛГС [129] и у здоровых субъектов с нормальными сывороточными значениями АЛТ и без клинических признаков заболевания печени [156].

Bartolomé и соавт. [91] предположили наличие вирусных частиц у пациентов с ЛГС в сыворотке крови в малом количестве, ниже порогового уровня чувствительности современных тест-систем. После концентрации методом ультрацентрифугирования 2 миллилитров сыворотки крови пациентов с ЛГС в 60% случаев удалось обнаружить вирусную РНК. Известно, что часть вирионов ВГС представлена в виде так называемых липовирусных частиц, т.е. связанных с липопротеинами низкой плотности, богатых триглицеридами – аполипопротеинами В и Е [282]. В исследовании было показано, что такие вирусные частицы обладают повышенной вирулентностью как *in vitro* [282], так и на моделях животных [258, 355]. Bartolomé с соавт. показали, что плотность вирусных частиц у пациентов с ЛГС [91] соответствует плотности липовирусных частиц, получаемых от пациентов с классическим течением хронического гепатита С [91, 291] и, следовательно, кровь пациентов с латентной формой ВГС-инфекции представляет инфекционную опасность.

Т-клеточный ответ аналогичен у пациентов с ЛГС и после проведения противовирусной терапии или спонтанного выздоровления лиц, в крови которых выявляются анти-ВГС [306, 308, 322]. У лиц, подвергающихся воздействию малых количеств вируса, это семейное окружение больных латентной или явной формой ВГС-инфекцией, был обнаружен ВГС-специфический Т-клеточный ответ [321]. Внутрисемейное распространение латентной ВГС-инфекции происходит так же часто, как и распространение хронического гепатита С [129]. Спорадическое появление минимальных количеств РНК ВГС стимулирует клеточный иммунный ответ, что объясняет наличие более устойчивого и активного Т-клеточного ответа у пациентов с латентной формой инфекции в сравнении с больными хроническим вирусным гепатитом С [322, 382]. В тоже время, клеточный ответ при ЛГС не приводит к элиминации вируса из организма, но может являться причиной подавления репликации ВГС вплоть до необнаруживаемых молекулярными методами значений в крови.

Неизвестно, как ВГС сохраняется в организме людей, у которых анти-ВГС не выявляются современными скрининговыми тестами [320]. Антитела к белкам ВГС, как правило, появляются в течение 4-12 недель после контакта с вирусом, причем самыми ранними и чаще обнаруживаемыми являются антитела к ядерному белку и неструктурному белку 3 (NS3). Анти-ВГС обнаруживаются на всем протяжении ВГС-инфекции, но в случае клинического выздоровления происходит снижение их титра [366, 375, 381]. У иммунокомпетентных лиц первичный ЛГС, скорее всего, формируется при инфицировании малыми дозами вируса, а антитела не обнаруживаются из-за низких концентраций [320]. Исключение составляют лица с иммунодефицитом, иммуносупрессией или страдающие от сопутствующей хронической инфекции.

Изолированную реактивность к отдельным белкам вируса наблюдали в образцах крови ВГС-инфицированных доноров при дополнительных исследованиях спектра анти-ВГС [162, 352]. Антитела к одному из антигенов ВГС были выявлены в последовательных образцах крови донора, полученных на начальных этапах сероконверсии анти-ВГС, и у лиц из групп риска по ЛГС-

инфекции [317]. В 80% случаев ранняя фаза инфекции остается недовыявленной. Скрининговая стратегия определения анти-ВГС не позволяет выявить латентные формы инфекции. Обнаружение РНК вируса в биоптате печени по-прежнему является «золотым стандартом» диагностики ЛГС. Вирусную РНК выявляли в мононуклеарных клетках периферической крови, а также в концентрированной сыворотке более 50% пациентов [91, 133]; у значительной части этих больных находили антитела к ядерному антигену ВГС (в некоммерческом иммуноферментном тесте) [131, 319]. Castillo I. с соавт. [132] показали, что у 36 из 37 пациентов, образцы крови которых были отрицательны при тестировании на наличие анти-ВГС и РНК ВГС, а биоптаты печени содержали РНК ВГС, в течение 55 месяцев транзиторно или постоянно удавалось выявлять РНК ВГС в сыворотке крови после концентрирования методом ультрацентрифугирования или исследуя мононуклеары периферической крови. Эти данные подтверждаются и другими авторами [130, 305].

При латентной ВГС-инфекции фиброз печени обнаруживается почти у 5% [113, 162], а воспаление и некроз ткани печени - у 35% пациентов [133, 299]. ЛГС может прогрессировать вплоть до серьезного повреждения печени [150, 167]. Препараты интерферона с рибавирином показали свою эффективность при лечении больных ЛГС, что ранее было доказано при хроническом гепатите С [75]. Тем не менее, не все пациенты отвечают на противовирусное лечение [135, 305, 307, 323].

В первоначальных исследованиях латентной инфекции был обнаружен только генотип 1b ВГС [113, 150, 221], что неудивительно, принимая в расчет то обстоятельство, что этот генотип наиболее распространен в Испании, где были выполнены эти работы [93, 332]. Более поздние исследования, выполненные по всему миру, показали, что ЛГС вызывают также генотипы 1a, 2a, 3a и 3b [110, 152, 156, 221]. Таким образом, наличие латентной инфекции не связано с генотипом вируса.

В литературе нет материалов, посвященных реактивации ЛГС при отсутствии антител к белкам вируса, за исключением случаев трансплантации и

ретрансплантации печени [152]. Пациенту 29-лет с диагнозом «цирроз неизвестной этиологии» была трансплантирована печень. Через десять месяцев была проведена повторная трансплантация в связи с печеночной недостаточностью, вызванной холестазом также неизвестной этиологии средней тяжести. У пациента отсутствовали маркеры ВГС в сыворотке и плазме крови, но вирусная РНК была обнаружена в образцах ткани печени двух эксплантов. Кроме того, филогенетический анализ показал, что РНК ВГС, изолированная из двух образцов печени, относилась к генотипу 1a [125].

De Marco с соавт. [156] обнаружили РНК ВГС в мононуклеарных клетках периферической крови у 9 из 276 (3,3%) здоровых молодых людей при нормальных значениях ферментов печени, в то время как встречаемость анти-ВГС среди населения Италии составляет 2,7%. Среди включенных в исследование были доноры крови. Таким образом, распространенность ЛГС может быть недооценена. Необходимы дальнейшие исследования латентной ВГС-инфекции, чтобы определить глобальную распространенность, потенциальный риск передачи с кровью доноров, способность вызывать внепеченочные заболевания и долгосрочные осложнения – особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [125], к которым в первую очередь относятся больные заболеваниями системы крови.

Многообразие функций печени объясняет степень ущерба организму в случае ее повреждения. Кроме вирусов и других микроорганизмов, в этиологии гепатитов большое значение имеют токсические вещества различного происхождения (в том числе лекарственные препараты). Нередко гепатиты возникают вторично, как один из симптомов основных заболеваний, в том числе заболеваний системы крови.

1.8. Вирусные гепатиты у пациентов с заболеваниями системы крови

У онкогематологических пациентов основное заболевание часто осложняется гепатитами, которые могут возникать как следствие проводимой

химиотерапии за счет токсического действия препаратов и как результат вирусной инфекции. Такие больные являются группой риска в отношении развития вирусного гепатита, поскольку получают множественные трансфузии от большого числа доноров, подвергаются многочисленным медицинским манипуляциям и инвазивным исследованиям, а также контактируют с больными вирусными гепатитами В и С [12]. Кроме того, пациенты гематологических стационаров находятся в состоянии иммунодефицита, что является следствием основного заболевания и проводимой терапии. На таком иммунном фоне возможна реактивация и эндогенных вирусных инфекций. Многолетними исследованиями, проведенными в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, установлено, что каждый четвертый больной уже инфицирован ВГВ или ВГС перед поступлением в гематологический стационар [15, 61]. При обследовании лиц с заболеваниями системы крови на серологические маркеры ВГВ показано, что, как минимум, один из них определяется часто: при лейкозах – 81,7%; анемиях – в 73,4%; гемофилии – в 93,5% случаев [13]. По данным зарубежных авторов, частота инфицирования ВГС у таких пациентов была 48-94% [169, 203, 287]. К 2006 г. эти показатели мало изменились. Частота инфицирования ВГВ и ВГС трансфузионнозависимых пациентов составляла 73,0%, из них больных острыми лейкозами – 78,6%, неходжкинскими лимфомами – 66,7%, миелодиспластическим синдромом – 50%, а гемофилией – 100%. При этом у них отсутствовали типичные проявления ВГВ- и ВГС-инфекций [43]. При госпитализации в гематологическое отделение в 2004 – 2006 гг. маркеры ВГВ и ВГС были выявлены у 14,7% и 7,2% больных, причем за время госпитального лечения и наблюдения эти показатели увеличивались в среднем в 7 и 4 раза, соответственно [11]. Гармаева Т.Ц. [12] показала, что инфицирование ВГВ у пациентов с заболеваниями системы крови ассоциировано с увеличением риска летального исхода, причем у больных апластической анемией и острыми лейкозами эта взаимосвязь более выражена.

Несмотря на высокую инфицированность ВГВ, желтушные формы острого гепатита развиваются у гематологических больных относительно редко. По данным большинства авторов [13, 18, 43, 65, 92, 260, 261], в 75% случаев инфекция протекает в субклинической или клинически проявляющейся, но безжелтушной, форме; не отмечено преобладания тяжелых форм при типичных вариантах ВГВ-инфекции. В то же время есть сообщения о тяжелом течении острых вирусных гепатитов, иногда с развитием печеночной комы, у больных с заболеваниями системы крови [20, 224]. Только в 10-11,9% случаев ВГВ-инфекция проявляется как острая и завершается заменой HBsAg и HBeAg на соответствующие антитела (сероконверсия). Характерным и закономерным является хронизация инфекций у больных гемобластозами [13, 20, 65, 261]. По мнению ряда авторов [66, 67, 311], ВГС-инфекция у большинства гематологических больных также может протекать бессимптомно. Кроме того, у них формируется депрессивное состояние иммунокомпетентной системы, обусловленное основным заболеванием и поддерживаемое применением цитостатических препаратов, что создает благоприятные условия для репликации и персистенции вирусов гепатита [36, 51, 224, 261].

Латентная форма ВГВ-инфекция может стать причиной тяжелых или даже фатальных осложнений терапии, поэтому для принятия решения об индукции иммуносупрессии необходим анализ на анти-НВс. Это впервые было показано в 1975 г. Zuckerman и соавт. [182], но и сегодня вопрос о возможности проведения терапии, в том числе препаратами направленного действия, остается предметом дискуссии [189].

Документированы случаи реактивации гепатита С с появлением в сыворотке крови РНК ВГС у анти-ВГС позитивных пациентов с ослабленным иммунитетом, получающих длительные курсы химиотерапии, либо иммуносупрессивную терапию, в том числе тех, кто подвергся трансплантации печени, почек или костного мозга [248, 256, 278, 279, 383, 416].

Особый интерес представляет взаимовлияние вирусов при сочетанной инфекции. Некоторые авторы считают, что ВГС ингибирует ВГВ [253, 281, 346,

377]; другие описывают взаимное ингибирование, которое может меняться с течением времени [294, 326]. По данным итальянских ученых [181], из 36 пациентов, инфицированных ВГВ и ВГС, 44% имели только ДНК ВГВ, 14% - ДНК ВГВ и РНК ВГС, 25% - только РНК ВГС и 17% были негативны по молекулярным маркерам этих вирусов. Пациенты, имеющие в сыворотке крови антитела к белкам в ВГВ, достоверно чаще бывают РНК ВГС негативными в присутствии ДНК ВГВ, т.е. ВГВ вызывает супрессию ВГС [232]. Суперинфекция ВГС может вызвать подавление репликации ВГВ [353], что связывают с доминантной ролью ВГС в модуляции иммунного ответа [376]. Присоединение вируса гепатита D к ВГВ-инфекции приводит к ингибированию репликации ВГС [170]. Суперинфицирование ВГВ и вирусом гепатита A пациентов с хроническим гепатитом C увеличивает число острых фульминантных форм заболевания, поэтому, рекомендовано вакцинировать против гепатитов В и А больных хроническим вирусным гепатитом С [254, 384]. Сочетанная инфекция увеличивает риск хронизации и малигнизации [376].

Определённая роль в качестве возможных триггеров, способствующих развитию хронических гепатитов, отводится не только ВГВ и ВГС с низкой репликативной активностью, но и герпесвирусам, которые в течении ряда лет могут латентно персистировать «незамеченными» в лимфоцитах периферической крови [2, 231]. Кроме того, зафиксированы случаи выраженных (даже фульминантных) форм гепатитов, вызванных цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна-Барр [303, 412]. Эти гепатотропные вирусы могут быть переданы реципиенту с кровью донора [5, 10, 81]. В этиологической структуре посттранфузионных гепатитов доля цитомегаловирусной инфекции составляет 2-10% случаев [238]. Голосова Т.В. и соавт. [13, 14] отмечают наличие гепатита, вызванного цитомегаловирусом, у 3-5% реципиентов гемотрансфузий. Аналогичные результаты приводила и Гусак Е.Н. [18].

По данным японских исследователей, у больных заболеваниями системы крови тяжелое поражение печени в подавляющем большинстве случаев (75%) ассоциируется с инфекцией, вызванной ВГВ и 8,2% с инфекцией, вызванной ВГС

[231]. При острых лейкозах серьезная дисфункция печени превалирует среди других осложнений: 63,6% против 10,9% - соответственно ($p < 0,05$) [231]. Однако не существует единого мнения о роли герпетических инфекций в развитии патологии печени [38, 69, 231]. Наличие герпесвирусной инфекции выявлено у 29,5% пациентов с криптогенным гепатитом. В мононуклеарах периферической крови каждого четвертого такого пациента была обнаружена ДНК ВЭБ, при этом преимущественно в виде моноинфекции, редко – в сочетании с ВГВ и цитомегаловирусом. В 9% образцов была выявлена ДНК цитомегаловируса. У каждого пятого (20,5%) из обследованных обнаружены серологические маркеры активной ВЭБ-инфекции. При исследовании биопсийного материала печени было также показано, что поражение печени могут вызывать не только вирусы гепатитов, но и герпесвирусы. Чаше других маркеров в биоптатах печени зарегистрирована ДНК ВГВ – 48,2%. ДНК ВЭБ выявлена в 37,5% исследуемых образцов. Частота индикации ДНК цитомегаловируса (17,9%) превысила процент выявления РНК ВГС (14,3%). Таким образом, более чем у половины пациентов с поражением печени неясного генеза были обнаружены те или иные активные вирусные инфекции или их сочетания, в том числе и герпесвирусные. Только расширенное серологическое и молекулярное тестирование в большинстве случаев позволило установить вероятный этиологический агент, вызвавший поражение печени [63].

Частота встречаемости маркеров вирусных инфекций в образцах крови больных заболеваниями системы крови сохраняется высокой. Проблема вирусных гепатитов в гематологии сегодня особенно актуальна, поскольку терапия основного заболевания позволяет больным доживать до отдаленных осложнений. Значительный прогресс в лечении онкогематологических больных связан с появлением новых таргетных препаратов, широким внедрением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Выживаемость пациентов с заболеваниями системы крови за последние 20 лет увеличилась в 3-5 раз, поскольку большинство таких заболеваний стали химиотерапевтически излечимыми [49]. Программное лечение заболеваний системы крови включает адекватное трансфузионное

обеспечение и вирусная безопасность компонентов крови должна соответствовать современным требованиям. На лабораторную службу возложена задача наиболее полного выявления инфицированных лиц, как среди пациентов, так и среди доноров. Выполнение этой задачи возможно только благодаря внедрению в практику лабораторного обследования комплекса современных высокочувствительных методов диагностики.

Сегодня еще не решен вопрос о возможности ПЦР-тестирования образцов крови доноров в формате минипулов, какова может быть величина пула, чтобы не допустить до клинического применения компоненты крови, содержащие единичные вирусные частицы. Кроме того, в литературе нет конкретных экспериментальных данных, подтверждающих, что использование компонентов крови, содержащих антитела к ядерному и поверхностному антигенам ВГВ, не представляет опасность для реципиента. Необходимо изучение качества используемых тест-систем и количества исследуемых маркеров вирусов, поскольку риск передачи ВГВ и ВГС с компонентами крови доноров находится в зависимости от их лабораторного обследования.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Дизайн исследования

На первом этапе настоящего исследования была разработана система управления качеством молекулярно-биологических исследований.

Проведено аналитическое эпидемиологическое исследование, включающее наблюдательное когортное ретроспективное и контролируемое проспективное когортное исследования (рисунок 16).

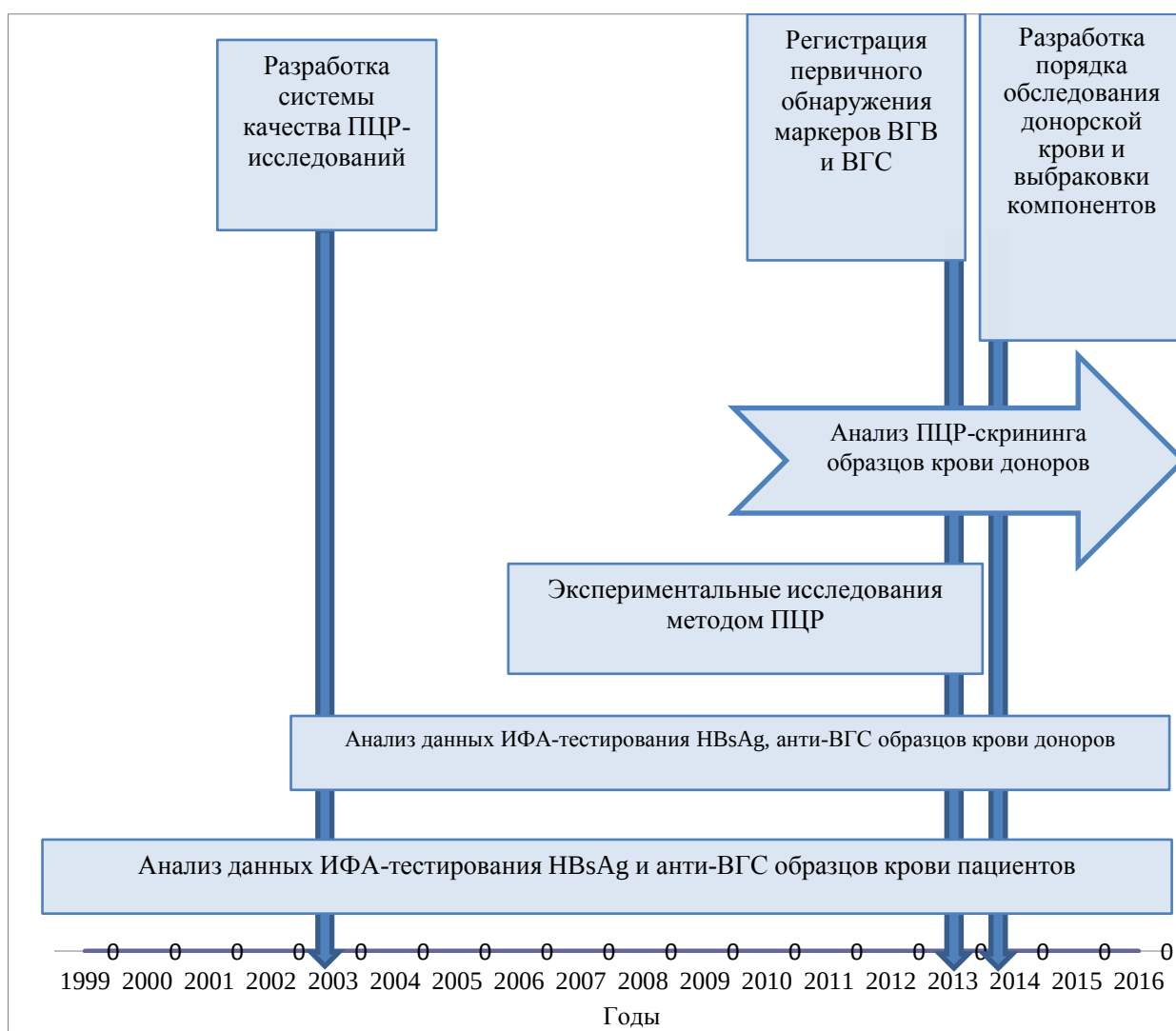


Рисунок 16. Дизайн исследования

Перспективное когортное наблюдение включало анализ результатов:

1. исследования серонегативных образцов крови доноров, пришедших на донацию в 2009 г. и с 2012 г. по 20 апреля 2016г. в пулах из 6 проб на ДНК ВГВ, РНК ВИЧ и РНК ВГС;
2. исследования образцов крови доноров, осуществивших донацию в период с 21 марта 2014 г. по 20 апреля 2016 г. согласно разработанному порядку обследования донорской крови и выбраковки компонентов по результатам лабораторного исследования на маркеры инфекций; анализ полученных результатов.

Ретроспективное когортное исследование включало анализ данных ИФА-тестирования на регламентированные маркеры ВГВ и ВГС (HBsAg и анти-ВГС) образцов крови по материалам ежегодных отчетов и журналам отделения контроля крови на вирусные гепатиты, СПИД, сифилис (данные хранятся в программе Excel и на бумажных носителях, с 6 октября 2014 г. результаты исследования крови доноров доступны в лабораторной информационной системе): проб от пациентов, находившихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с 2003 по 2016 гг., и доноров крови ее компонентов в период с 1999 по 2016 гг. В период 2006 – 2007 гг. пациенты ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России различных нозологических групп однократно обследованы при поступлении в стационар на расширенный спектр маркеров ВГВ и ВГС.

Экспериментальная часть:

1. методом ПЦР исследованы в формате индивидуального тестирования 558 образцов крови доноров в период с апреля по июнь 2006 г.;
2. количественно охарактеризованы ПЦР-позитивные образцы крови доноров, собранные в период с 2006 по 2014 гг. (21 по ДНК ВГВ и 51 по РНК ВГС);
3. исследованы 17 приготовленных пулов плазмы доноров крови и ее компонентов из 6 и 12 образцов, один из которых содержал ДНК ВГВ или РНК ВГС.

С августа 2013 г. регистрируются случаи появления HBsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС у пациентов, ранее обследованных и не имевших маркеров ВГВ и ВГС, а с ноября 2013 г. инициировано расследование таких случаев. В ходе расследования разработан порядок проведения эпидемиологического расследования.

2.2. Материал исследования

Проанализированы данные тестирования на декретированные маркеры ВГВ и ВГС (HBsAg и анти-ВГС) 315191 образцов крови, из них: 58 455 проб от пациентов, находящихся на лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с 2003 по 2016 гг.; 256 736 проб, взятых от доноров крови ее компонентов в период с 1999 по 2016 гг. Данные анализировали по материалам ежегодных отчетов и журналам отделения контроля крови на вирусные гепатиты, СПИД, сифилис (данные хранятся в программе Excel и на бумажных носителях, с 6 октября 2014 г. результаты исследования крови доноров доступны в лабораторной информационной системе).

В период с 2006 по 2007 гг. 277 пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России различных нозологических групп были обследованы однократно при поступлении в стационар на расширенный спектр маркеров ВГВ и ВГС. Доля мужчин составляла 51%, доля женщин – 49%. Медиана возраста – 46 лет (от 16 до 90 лет).

Методом ПЦР исследовано 32462 образца крови доноров в период с 2006 по 2016 гг. В формате индивидуального тестирования исследованы 558 образцов крови доноров в период с апреля по июнь 2006 г. В пулах из 6 проб на ДНК ВГВ, РНК ВИЧ и РНК ВГС протестировано 31 914 серонегативных образца в 2009 и 2012 - 2016 гг. Количественно охарактеризованы 72 ПЦР-позитивных образца

крови доноров, собранные в период с 2006 по 2014 годы (21 по ДНК ВГВ и 51 по РНК ВГС).

Исследовано 17 экспериментально приготовленных пулов плазмы доноров крови, содержащих позитивный образец: 13 пулов из 6 образцов и 4 пула – из 12 образцов. В пробирку помещали по одному образцу, содержащему ДНК ВГВ с концентрацией от не менее $1,5 \times 10^2$ до 1×10^3 МЕ/мл ($n=12$), или РНК ВГС – от 1×10^4 до 1×10^7 МЕ/мл ($n=5$), и отрицательные по маркерам ВГВ, ВГС, ВИЧ образцы плазмы доноров в равных объемах.

Использованы две коммерческие панели контрольных образцов ДНК ВГВ и РНК ВГС Acrometrix OptiQuant HBV DNA Lot715006B и Acrometrix OptiQuant HCV RNA Lot721201D.

Проведены эпидемиологические расследования ($n=4$), исследовано 35 архивных образцов плазмы: от 7 пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и 28 доноров крови и ее компонентов. ПЦР-исследование образцов плазмы доноров выполняли в индивидуальной постановке на наличие ДНК ВГВ ($n=16$) и РНК ВГС ($n=12$). С целью повышения чувствительности теста экстракцию нуклеиновых кислот проводили из двойного объема (200 мкл).

Образцы крови доноров ($n=26113$), пришедших на донацию в период с 21 марта 2014 г. по 20 апреля 2016 г., были включены в проспективное исследование. Из них: 8134 – от первичных доноров, 17979 – от повторных. Продолжительность исследования – 25 месяцев. Доля мужчин составляла 59%, доля женщин – 41%. Возраст доноров варьировал от 18 до 70 лет, медиана возраста – 33 года.

В соответствии с «Программой инфекционной безопасности компонентов донорской крови для иммунокомпрометированных больных», одобренной локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, проводимой в рамках утвержденной научно-исследовательской работы по теме: «Создание программы повышения инфекционной безопасности трансфузионной терапии онкогематологических больных», зарегистрированной

под номером НИОКТР – АААА-А16116011810125-5, было проведено скрининговое исследование образцов крови доноров на наличие анти-НВс. Селекция доноров не проводилась. Допуск потенциальных доноров к донации осуществлялся только после подписания добровольного информированного согласия на проведение расширенного тестирования на маркеры ВГВ. Дополнительный объем крови для исследования не брали. Донору было сообщено о результатах проведенного исследования.

В соответствии с разработанным и утвержденным в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России порядком обследования донорской крови и выбраковки компонентов, если были обнаружены анти-НВс в образце крови донора, проводили повторное тестирование. Если положительный результат повторялся, то компоненты крови с коротким сроком хранения (тромбоконцентрат, тромбовзвесь, эритро взвесь, эритро масса) подлежали выбраковке, компоненты с длительным сроком хранения (плазма) не допускались к применению в клинике. Дополнительно образцы крови, содержащие анти-НВс, исследовали на наличие анти-НВс класса IgM и анти-НВс. В случае получения отрицательных результатов дополнительного иммунохимического и ПЦР-исследования донору через 3 месяца назначали контрольное обследование. В случае получения положительных результатов дополнительного иммунохимического и ПЦР-исследования все заготовленные от данного донора компоненты крови подлежали выбраковке и уничтожению, включая компоненты крови с длительным сроком хранения. По полученным результатам анализов составлялся «Акт отстранения от донорства», который рассматривался на трансфузиологической комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. После принятия решения трансфузиологической комиссией, соответствующие данные о доноре вносились в базу данных и передавались в Единый донорский центр. Образцы крови доноров, отрицательные при первом исследовании в ИФА/ИХЛА или положительные при первой постановке и показавшие дважды отрицательный результат при повторном тестировании в том

же наборе реагентов, расценивались как отрицательные. Были допущены к клиническому применению компоненты крови доноров, образцы крови которых, показали отрицательные результаты исследования методами ИФА/ИХЛА и ПЦР, при этом образцы плазмы от этих компонентов подлежали архивированию.

Результаты исследований образцов крови хранятся на бумажных носителях (распечатанные протоколы и журналы фиксации положительных проб), в электронном виде (Word и Excel), с 6 октября 2014 года результаты – в лабораторной информационной системе.

2.3. Методы исследования

Иммунохимическое исследование было проведено методами ИФА и ИХЛА.

Для проведения ИХЛА использовали прибор ARCHITECT i2000 RS и следующие наборы реагентов: HIV Ag/Ab Combo, anti-HCV, HBsAg Qual II, anti-HBc II, anti-HBc IgM, anti-HBs производства фирмы «Abbott». Положительные результаты тестирования образцов крови доноров подтверждали с помощью ИХЛА в подтверждающей тест-системе HBsAg Architect и иммуноблота Inno-LIA HCV Score Innogenetics (с 2015 г. – Fujirebio). Взятие образцов крови доноров и маркировка пробирок-вакутейнеров с активатором свертывания осуществлялось в донорском зале отдела заготовки крови и ее компонентов. Образцы с кровью доставлялись в лабораторию сотрудником лаборатории в контейнере для переноса образцов крови. Проводили центрифугирование пробирок при охлаждении в течение 10 минут при 3000 оборотов в минуту для получения сыворотки. Образцы крови без маркировки, с гемолизом и гиперлипидемией не анализировали. Готовили рабочий раствор промывочного буфера (в канистре в 9 литрах дистиллированной воды растворяли 1 флакон концентрата буфера) и 10% раствор гипохлорита натрия (разводили 15 мл реагента «Minoclear» в 275 мл воды). Подготавливали прибор к работе: переводили модули прибора из статуса

«Остановлен» в «Готов». Проверяли статус ресурсов в позиции «Ресурсы», заменяли по необходимости флаконы с растворами триггера и претриггера, добавляли промывочный буфер и реакционные ячейки. Проводили ежедневное и еженедельное техобслуживание прибора. Следуя указаниям диалогового окна, помещали флаконы с промывочными растворами в карусель прибора, проводили очистку фильтров и игл. Проверяли «Статус реагентов», при необходимости добавляли необходимое количество наборов. Для этого: крышку на флаконе заменяли мембраной; ресуспендировали микрочастицы аккуратным вращением флакона; загружали компоненты набора в соответствующие свободные секции карусели для реагентов. Закрывали крышку отсека для реагентов и сканировали имеющиеся на борту прибора реагенты. Для работы с новым лотом контролей вводили соответствующие данные в «Системе», «Конфигурации», «Настройке контроля качества». На аналитическом этапе переводили текущий статус модулей в статус «Работа». Проводили калибровку новых лотов реагентов. Для этого: во вкладке «Заказы» активировали «Заказ калибровки», выбирали нужный тест и во вкладке «Опции теста» - нужный лот, его срок годности. В чашку для образцов вносили необходимое количество калибратора, устанавливали в штатив; в поле «Ш» сканировали номер штатива, в поле «П» вносили номер позиции калибратора в штативе. «Добавляли заказ» и помещали штатив в свободные ячейки 1 секции пробоподатчика. По возвращении штатива из зоны раскапывания и смены цвета подсветки на зелёный, удаляли штатив с борта прибора. Ежедневно проводили постановку контрольных образцов для всех проводимых тестов. Для этого вносили в чашки образцов контроля используемых реагентов до необходимого уровня (в зависимости от набора), устанавливали чашечки в штативы, выбирали «Заказы» - «Заказ контролей» - «Однокомпонентный»/«Многокомпонентный». В поле «Ш» сканировали номер штатива, в поле «П» вводили номер позиции в штативе, в которую поставлен первый контроль, выбирали контролируемый тест, и отмечали необходимые уровни контроля. «Добавляли заказ» и помещали штатив в свободные ячейки 1 секции пробоподатчика. По возвращении штатива из зоны раскапывания и смены

цвета подсветки на зелёный, удаляли штатив с борта прибора. По окончании процедуры проверяли полученные значения для контрольных образцов во вкладке «Обзор результатов контроля качества». Полученные значения контролей, не прошедшие контроль качества, были выделены красным цветом, что свидетельствовало о необходимости повтора всей процедуры с данным контролем. Результаты, прошедшие контроль качества, были маркированы черным цветом. При исследовании большого количества образцов крови доноров использовали лоток с установленными штативами. Пробирки помещали в штатив так, чтоб штрих-код был доступен для сканирования в просвете штатива. Штативы с пробирками ставили в лоток. Отмечали «Группа», выбрали необходимые тесты, сканировали штрих-код первого образца из первого штатива и штрих-код последнего образца из последнего штатива, «Добавляли заказ», помещали лоток в свободные секции (2-5) пробоподатчика. Позиция секции подсвечивалась оранжевым цветом, а по возвращении лотка из зоны раскапывания позиция секции становилась зелёной. Удаляли пробирки с борта прибора. Для заказа исследования единичных образцов, их помещали в штативе в первую секцию пробоподатчика без лотков. В поле «Ш» сканировали номер штатива, в поле «П» вводили номер позиции в штативе, сканировали штрих-код образца, выбирали тесты. «Добавляли заказ» и помещали штатив в свободные ячейки 1 секции пробоподатчика. По окончании исследований выбирали вкладку «Результаты», затем «Текущие результаты», выделяли необходимые позиции и распечатывали «по списку результатов». Сохраняли полученные результаты, после чего происходила передача данных в ЛИС.

Для проведения ИФА использовали следующие приборы: автоматический анализатор Evolis (фирмы «Bio-Rad»), спектрофотометры и отмывающие устройства производства «Tescan» и «Bio-Rad». Были использованы следующие наборы реагентов: Джинскрин ультра ВИЧ Аг/Ат, Monolisa HBsAg Ultra, Monolisa anti-HCV Plus, Monolisa anti-HBc Plus, подтверждающий тест с нейтрализацией Monolisa HBsAg – производства фирмы «Bio-Rad»; HBsAg-ИФА-БЕСТ, HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ, Векто HBsAg-антитела, Векто HBcAg-антитела,

Векто HBsAg- IgM, Бест анти-ВГС (комплект3), Бест анти-ВГС (комплект4) производства – ЗАО «Вектор-Бест»; Мюрекс анти-HCV производства – «Abbott-Мюрекс»; Иммуноблот РИБА-ИБ – «Орто-Кайрон»; ИФА-HBsAg-0,01, ИФА-ВГС – ЗАО «Эколаб»; Гепастрип – «Ниармедик»; ДС-ИФА-HBsAg - 0,01, ИФА-АНТИ-HCV – производства ООО НПО «Диагностические системы». Взятие образцов крови доноров и маркировка пробирок-вакутейнеров с активатором свертывания осуществлялось в донорском зале отдела заготовки крови и ее компонентов. Взятие образцов крови пациентов центра и маркировка пробирок с активатором свертывания осуществлялось в процедурном кабинете клинического отделения. Образцы с кровью пациентов доставлялись в лабораторию сотрудником клинического отделения в контейнере для переноса образцов крови. Проводили центрифугирование пробирок в течение 10 минут при 3000 оборотов в минуту для получения сыворотки. Образцы крови без маркировки, с гемолизом и гиперлипидемией не анализировали. Формировали и оформляли протоколы исследований. В зависимости от количества исследуемых образцов готовили растворы. Отбирали необходимое количество стрипов из планшета, выдерживали при комнатной температуре в течение 20 минут до проведения анализа. Вносили необходимые растворы, отрицательные и положительные контрольные образцы, исследуемые образцы (количество определялось согласно инструкции к используемому набору). Планшет заклеивали пленкой или закрывали крышкой. Количество и режим инкубаций, режим промывания лунок планшета соблюдали согласно инструкции к используемому набору реагентов. На заключительном этапе во все лунки планшета вносили стоп-реагент. Измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме. Результаты исследования фиксировались программой прибора и отображались на получаемой распечатке.

Как «положительный» расценивался результат иммунохимического теста, если коэффициент позитивности образца для регламентированных маркеров был более 0,9 и более 1,0 – для анти-HBs. Коэффициент позитивности является

расчетным показателем и измеряется в условных единицах – это число относительных световых единиц пробы, деленное на величину точки отсечения.

Скрининговое исследование образцов крови доноров на наличие молекулярных маркеров ВИЧ, ВГВ, и ВГС проводилось в пулах из 6 проб. Были использованы: автоматические анализаторы Cobas Ampliprep и Cobas Tagman; мультиплексный дискриминационный тест Cobas Taqscreen MPX Test, Version 2.0 – производства фирмы Roche. Аналитическая чувствительность теста Cobas Taqscreen MPX Test, Version 2.0 при исследовании образцов крови в формате минипулов из 6 шт., согласно прилагаемой инструкции, составляет для ДНК ВГВ – 13,8 МЕ/мл и для РНК ВГС – 40,8МЕ/мл [146]. В регистратуре отдела заготовки крови и ее компонентов производили регистрацию доноров. Взятие крови и маркировка пробирок-вакутейнеров с антикоагулянтом осуществлялось в донорском зале отдела заготовки крови и ее компонентов. Образцы с кровью доставлялись в лабораторию сотрудником лаборатории в контейнере для переноса образцов крови. Проводили центрифугирование пробирок для отделения плазмы со скоростью 3000 оборотов 20 мин в центрифуге с охлаждением (ускорение 1000g). Образцы крови без маркировки, с гемолизом и гиперлипидемией не анализировали. Подготовленные образцы в контейнерах для переноса образцов крови доставляли в помещение, где проводилась вся последующая работа. За 30 минут до начала работы извлекали из холодильника диагностические наборы, контрольные образцы, исследуемые образцы. Включали все приборы: HAMILTON, AmpliPrep, TaqMan и управляющие компьютеры. При необходимости проводили обработку (ежедневную и еженедельную) приборов. Пулирование образцов проводили в HAMILTON Microlab STAR. Запускали руководство по пулированию (Pooling Wizard) Roche PDM и следовали инструкциям на экране. В штативы на 24 или 32 гнезда (в зависимости от типа пробирок) расставляли первичные пробирки с образцами крови (без крышек), помещали штативы с пробирками на загрузочную панель прибора. Ставили штатив с необходимым количеством клипс и пробирок для пробоподготовки без

крышек в адаптере. Отрицательный контроль аккуратно перемешивали 5-6 раз, ставили в первую позицию штатива на 24 гнезда, снимали крышку, помещали на загрузочную панель. Положительные контроли аккуратно перемешивали 5-6 раз, ставили в первую, вторую третью позиции штатива на 24 гнезда, снимали крышки, помещали на загрузочную панель, соблюдать осторожность, чтобы не повредить штрих-коды на пробирках с контролями. Помещали штатив с наконечниками на загрузочную панель, после чего прибор проводил пулирование образцов. После окончания пулирования происходила автоматическая выгрузка штативов из прибора. Пробирки для пробоподготовки с пулированными образцами крови доноров закрывали крышками, снимали штатив с адаптера. Закрывали пробирки с образцами донорской крови и убирали в холодильник до конца исследования. Проверили комплектацию наборов реагентов: каждый набор теста Cobas TaqScreen MPX v2.0 содержит восемь кассет: две кассеты MPX CS1 с магнитными частицами, две кассеты MPX CS2 с лизирующим реагентом, две кассеты MPX CS3 с протеазой и буфером для элюции, и две кассеты MPX CS4 с внутрилабораторным контролем, реагентом 1 MMX и реагентом 2 MMX. Загружали количество кассет, достаточное для обработки всех исследуемых образцов во время непрерывной работы прибора COBAS AmpliPrep. Помещали кассету MPX CS1 в штатив для реагентов, отдельно от остальных кассет. Загружали штатив, содержащий MPX CS1, в позицию для штатива А прибора COBAS AmpliPrep, дождавшись, пока соответствующий штативу реагентов индикатор не загорится зеленым светом, а затем задвигали штатив до конца. Помещали в штатив(-ы) реагентов по одному набору кассет MPX CS2, MPX CS3 и MPX CS4 для каждой кассеты MPX CS1, убедившись, что штрих-код кассет находится на одном уровне со штрих-кодом штатива, расположенным справа. Загружали штатив(-ы) реагентов в позиции штативов В, С, D или Е, дождавшись, пока соответствующий штативу реагентов индикатор не загорится зеленым светом, и затем задвигали штатив. Проверяли, что индикаторы на панели состояния прибора COBAS AmpliPrep горят зеленым светом после того, как все компоненты набора будут правильно загружены и узнаны системой. Затем

загружали другие расходные материалы в нужном количестве: элементы для обработки образцов, пробирки для проведения амплификации и наконечники. Загружали штативы с внесенными в HAMILTON Microlab STAR образцами и контролями в позиции F, G или H прибора COBAS AmpliPrep. Нажимали «Пуск» в программе AMPLILINK, чтобы запустить выделение нуклеиновых кислот из образцов в приборе COBAS AmpliPrep. По окончании выделения нуклеиновых кислот, штативы с пробирками автоматически через стыковочную панель перемещались в термоциклеры анализатора COBAS TaqMan для амплификации и детекции. После завершения амплификации и детекции в анализаторе COBAS TaqMan, тестируемые образцы автоматически удалялись в контейнер для отходов. Результаты принимались автоматически в рабочей станции AMPLILINK, затем автоматически передавались в программу рабочей станции Roche PDM. Просматривались результаты, полученные для контрольных и исследованных образцов крови доноров, одобрялись и передавались в ЛИС. Донорские образцы из пулов, положительных по одной из мишеней были исследованы в индивидуальной постановке – в руководстве по пулированию была выбрана «повторная работа». Далее следовали инструкциям на экране. После получения результатов индивидуального тестирования положительные образцы передавали для определения вирусной нагрузки, отрицательные повторно – тестировали в пулах. В случае получения невалидных результатов контрольных образцов повторялась однократно вся постановка. Результаты выполнения ПЦР-исследования автоматически протоколировались на сервере прибора и сохранялись на бумажном носителе за подписью исполнителя. Результаты исследования образцов донорской крови, переданные в ЛИС, сохранялись в донорской документации.

Для индивидуального ПЦР-исследования выделение нуклеиновых кислот проводили из 100/200/500 мкл плазмы крови, используя коммерческие тест-системы производства ЦНИИЭ: «РИБО-золь», «Рибо-преп», «ДНК-сорб» и «Магно-сорб». Образцы с кровью доставлялись в лабораторию в пробирках с антикоагулянтом сотрудником лаборатории или клинического отделения в

контейнере для переноса образцов крови. Проводили центрифугирование пробирок для отделения плазмы со скоростью 3000 оборотов 20 мин. Для каждой пробы брали 2 микропробирки (эппендорфа) объемом 1,5 мл и маркировали их. В первую микропробирку отбирали 1,0 мл плазмы, используя автоматическую пипетку объемом 100-1000 мкл и наконечник с фильтром на 1000 мкл. Из этой пробирки отбирали 100 мкл плазмы во второй эппендорф, используя автоматическую пипетку объемом 50 – 300 мкл и наконечник на 200 мкл с фильтром. Для каждой пробы использовали отдельный наконечник. Первый эппендорф помещали в морозильную камеру (минус 20⁰С) на хранение в течение 3 лет. Второй эппендорф использовать для выделения нуклеиновых кислот. Перед выделением к образцам добавляли по 10 мкл внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью автоматического дозатора, используя наконечник с аэрозольным фильтром до 20 мкл. В образец для выделения ДНК ВГВ добавляли ВКО STI-87 (серия реагента соответствовала серии набора для амплификации), в образец для выделения РНК ВГС добавляли 10 мкл ВКО ICZ-rec (серия реагента соответствовала серии набора для амплификации). Одновременно выделяли не больше 24 образцов. Выделение проводили согласно инструкциям к наборам реагентов. Для амплификации использовали реагенты АмплиСенс HCV-FRT и -FL, АмплиСенс HBV-FRT и -FL, АмплиСенс HBV-470/770-ВКО, АмплиСенс HCV-240/440-ВКО, АмплиСенс HCV- Монитор FRT и -FL, АмплиСенс HBV-Монитор-FRT и -FL. Для проведения реакции обратной транскрипции рассчитывали необходимое количество микропробирок на 0,2 мл. В пробирке на 0,5 мл готовили реакционную смесь, согласно инструкции к набору реагентов. 10 мкл реакционной смеси добавляли в отобранные пробирки на 0,2 мкл, затем добавляли 10 мкл РНК-пробы. После этого пробирки помещали в амплификатор с температурой 37° С на 30 мин. После завершения программы, в пробирки добавляли по 20 мкл ДНК-буфера. Готовый препарат кДНК хранили при температуре не выше минус 16° С в течение 1 недели или сразу использовали для проведения амплификации. Для проведения амплификации отбирали необходимое количество микропробирок на 0,2 мкл. Реакционные смеси готовили

согласно инструкциям к наборам реагентов в микропробирках на 0,5 мл, учитывая количество исследуемых и контрольных образцов. Добавляли в микропробирки реакционные смеси, затем исследуемые и контрольные образцы в объемах, согласно инструкциям к используемым наборам реагентов. После этого микропробирки помещали в амплификатор, составляли протокол и запускали соответствующую программу амплификации. Амплификация с регистрацией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени проводилась на приборах производства фирмы «Corbett research»: Rotor Gene Q и RG 3000. Амплификация с последующей детекцией продуктов методом электрофореза в агарозном геле проводили на приборах производства фирмы «Applied Biosystemes»: Gene Amp PCR System 2400 и 9700. Заявленная аналитическая чувствительность наборов реагентов АмплиСенс HCV-FRT и -FL, АмплиСенс HBV-FRT и -FL составляла для ДНК ВГВ и РНК ВГС при экстракции из 100 мкл – 100 МЕ/мл [23, 24].

2.4. Статистическая обработка данных

Обработка данных произведена методами описательной и индуктивной статистики. Проверка значимости гипотез по выборкам проводилась с использованием методов Пирсона и точного критерия Фишера.

Статистические вычисления и выявление временного тренда различных величин проводились с помощью средств программы Microsoft Excel 10. В качестве значений моментов времени использовались номера месяцев за период наблюдения.

Для анализа достоверности различных математических моделей и оценки степени приближения данных модельными кривыми выводились значения показателя качества приближения R^2 (R – квадрат). (R^2 является квадратом коэффициента корреляции измеренных и модельных значений, чем ближе эта

величина k 1, тем точнее математическая модель описывает поведение соответствующего показателя).

Достоверность отличия коэффициента корреляции от нуля (P – значение) рассчитывалась с помощью формулы t -критерия для коэффициента корреляции и распределения Стьюдента.

Глава 3. Результаты

3.1. Разработка требований к обеспечению качества ПЦР-исследований

Согласно разработанной системе управления качеством молекулярно-биологических исследований, кроме внимания к приборной базе и расходному материалу, особые требования были предъявлены к используемым тест-системам, в первую очередь, к их аналитическим характеристикам. Лаборатория с 2003 г. ежегодно участвовала в программе «Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований», при этом включали максимальные спектры предлагаемых маркеров. Были разработаны документы, в том числе стандартные операционные процедуры. Внедрены дополнительные требования обеспечения качества молекулярно-биологических исследований, согласно которым: лабораторные приборы имели сертификаты качества, находились на постоянном техническом обслуживании и не реже одного раз в год подлежали полной диагностике; автоматические пипетки заменялись на новые или проходили калибровку не реже одного раза в год; весь используемый пластик был предназначен для проведения ПЦР и имел сертификаты качества; при выборе тест-систем обращалось внимание на аналитические характеристики, особенно, чувствительность; тесты были сертифицированы и разрешены к применению на территории РФ; обязательно наличие внутренних контрольных образцов.

Проводился внутренний контроль с использованием стандартных панелей контрольных образцов. В таблицах 2 и 3 представлены результаты постановки коммерческих панелей контрольных образцов ДНК ВГВ и РНК ВГС. Используемые тест-системы производства фирмы «Интерлабсервис» для выявления нуклеиновых кислот ВГВ и ВГС в качественном и количественном форматах соответствовали заявленным характеристикам [23, 24]. Однако отмечена количественная разница между концентрацией РНК/ДНК в образце панели и вычисленным фактическим содержанием в опыте в сторону занижения показателей, что учитывали при дальнейшем анализе полученных результатов.

Таблица 2. Результаты тестирования панели контрольных образцов ДНК ВГВ «Acrometrix OptiQuant HBV DNA Lot715006B» (срок годности до 28 мая 2010года).

Образец	АмплиСенс HBV- Монитор-FRT серия 130	АмплиСенс HBV-FRT серия 14.05.08
отрицательный	-	-
200 МЕ/мл	244 МЕ/мл	+
2000 МЕ/мл	4800 МЕ/мл	+
20000 МЕ/мл	31300 МЕ/мл	+
200000 МЕ/мл	208000 МЕ/мл	+
2000000 МЕ/мл	714000 МЕ/мл	+
20000000 МЕ/мл	5650000 МЕ/мл	+

Таблица 3. Результаты тестирования панели контрольных образцов РНК ВГС «Acrometrix OptiQuant HCV RNA Lot721201D» (срок годности до 20 июля 2010 года)

Образец	АмплиСенс HCV- Монитор-FRT серия 205	АмплиСенс HCV- FRT серия 17.07.08
отрицательный	-	-
50 МЕ/мл	30 МЕ/мл	-
500 МЕ/мл	132 МЕ/мл	+
5000 МЕ/мл	1240 МЕ/мл	+
50000 МЕ/мл	9110 МЕ/мл	+
500000 МЕ/мл	63900 МЕ/мл	+
5000000 МЕ/мл	1490000 МЕ/мл	+

Используемые тест-системы производства фирмы «Интерлабсервис» для выявления нуклеиновых кислот ВГВ и ВГС в качественном и количественном форматах соответствовали заявленным характеристикам [23, 24]. Однако отмечена количественная разница между концентрацией РНК/ДНК в образце панели и вычисленным фактическим содержанием в опыте в сторону занижения показателей, что учитывали при дальнейшем анализе полученных результатов.

При анализе результатов ПЦР-исследования выявлены ключевые условия, при которых могли быть получены ложные результаты. Благодаря введению стандартов качества для метода ПЦР, удалось снизить количество контаминаций. Был разработан и введен в практику лаборатории порядок ПЦР-исследования и учетов результатов реакции. При наличии в эксперименте образца с высокой концентрацией нуклеиновой кислоты заново анализировали все положительные пробы данной постановки, если их позитивность вызывала сомнение. Для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов ПЦР в образцах с высокой концентрацией нуклеиновых кислот кривые накопления продуктов амплификации подлежали визуальному контролю с целью оценки их формы и расположения на графике вне зависимости от результатов автоматической интерпретации результатов реакции. Результаты анализов, приведенные в работе, соответствуют стандартам качества.

3.2 Лабораторные факторы риска неполного выявления инфицированных вирусами гепатитов В и С компонентов крови доноров

Для исследования причин возможного трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС был выполнен анализ результатов лабораторного скрининга 256 736 образцов крови доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, пришедших на донацию за 18 лет наблюдения с 1999 по 2016 гг. Динамика выявления маркеров вирусных гепатитов В (HBsAg) и С (анти-ВГС) представлена

на рисунке 17. В анализируемый период амплитуда колебаний частоты выявления этих маркеров по годам находилась в пределах от 0,06 до 0,45% - для HBsAg, а для анти-ВГС - от 0,21 до 1,08%. Встречаемость декретированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров за анализируемый период статистически значимо снизилась: с 0,38% до 0,06% ($\chi^2=28,81$, $p<0,00001$) и с 0,71% до 0,21% ($\chi^2=35,23$, $p<0,00001$), соответственно.

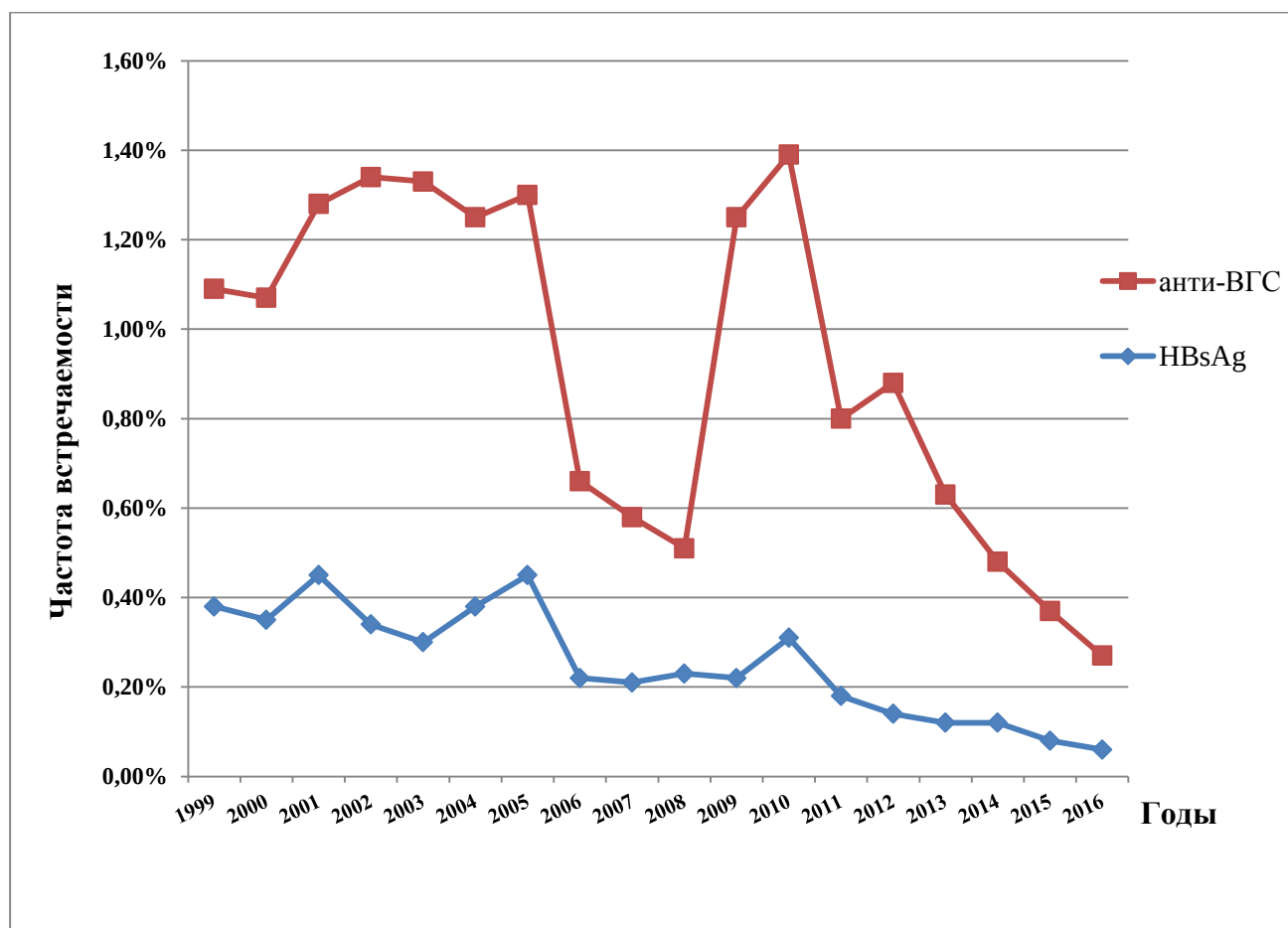


Рисунок 17. Динамика выявления HBsAg и анти-ВГС в образцах крови доноров

С 2002 по 2010 гг. обследование донорской крови на декретированные маркеры (анти-ВГС и HBsAg) проводили с использованием наборов фирмы «Bio-Rad», а с 2010 года — тест-систем фирм «Вектор-Бест» (Новосибирск), «Ниармедик» (Москва), «Диагностические системы» (Нижний Новгород). С 2014 г. диагностика осуществлялась с помощью наборов фирмы «Bio-Rad» с последующим переходом в мае 2014 г. на ИХЛА-тесты.

Проведенный анализ результатов лабораторного тестирования, полученных с 2002 по 2013 гг., показал, что воспроизводимость положительных реакций была недопустимо низкой и составляла от 77 до 95% при выявлении анти-ВГС, и от 54,6% до 89% для HBsAg, вне зависимости от используемого диагностикума.

В 2014 г. в исследовании при использовании наборов реагентов «Bio-Rad» воспроизводимость положительных результатов составила уже 100% для анти-ВГС и 75% для HBsAg. Однако в подтверждающих тестах положительными оказались только 50% образцов по HBsAg и 87,5% - по анти-ВГС. Воспроизводимость положительных результатов в методе ИХЛА составила 100% - как для HBsAg, так и для анти-ВГС (таблица 4).

Таблица 4. Сравнительный анализ подтверждаемости и воспроизводимости положительных результатов на маркеры ВГВ и ВГС с помощью ИФА и ИХЛА в 2014 году

Маркер	анти-ВГС		<i>p</i>	HBsAg		<i>p</i>	анти-HBc		<i>p</i>
Метод	ИФА	ИХЛА		ИФА	ИХЛА		ИФА	ИХЛА	
Количество образцов крови, <i>n</i>	2585	4701		2635	4701		2893	9581	
Первичный положительный результат, <i>n</i>	8	31	>0,05	4	7	>0,05	170	267	>0,05
Повторный положительный результат, <i>n</i>	8	31	>0,05	3	7	>0,05	167	266	>0,05
Подтверждающий тест, положительный результат, <i>n</i>	7	17	>0,05	2	6	>0,05	нет	нет	>0,05

Сравнительная оценка иммунохимических методов (ИФА и ИХЛА) показала, что воспроизводимость положительных результатов по анти-НВс при использовании иммуноферментных тест-систем составляла 98,2% (167 из 170), при использовании иммунохемилюминесцентного диагностикума – 99,6% (266 из 267). Эти данные позволили сделать вывод о сопоставимости полученных результатов при использовании обеих методик ($p > 0,05$).

Анализируя результаты многолетней динамики выявления HBsAg и анти-ВГС в образцах крови доноров, установлено, что колебания превалентности серологических маркеров ВГВ и ВГС зависели не только от использованных тест-систем, но и определялись организационными мероприятиями по селекции доноров. Увеличение доли положительных образцов крови доноров по HBsAg и анти-ВГС в 2009-2010 гг. (рисунок 17) связано с тем, что с 2008 г. заготовка крови и её компонентов в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России стала осуществляться не только от жителей Москвы и Московской области, но и от граждан всех субъектов РФ. В качестве доноров в этот период были привлечены в первую очередь лица из социально неблагоприятных слоев общества, заинтересованные в оплате за донацию. К положительным примерам организационных решений повышения безопасности донорской крови и ее компонентов можно отнести прекращение практики заготовки крови выездными бригадами в воинских частях с ноября 2010 г. в связи с высокой частотой встречаемости у данного контингента доноров маркеров инфекционных заболеваний и с 2013 г. развитие добровольного безвозмездного донорства. С 2010 г. отмечается снижение числа образцов крови доноров, содержащих HBsAg и анти-ВГС (рисунок 17). Обсуждение вопросов, затрагивающих организационные мероприятия по селекции доноров, не входило в задачу данного исследования, однако их необходимо учитывать при анализе частоты выявления серологических маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров.

Таким образом, в последние годы компоненты крови доноров стали более безопасны, и обусловлено это комплексом причин, в том числе, повышением

качества используемых иммунологических диагностикумов и применением автоматических анализаторов. Однако исследование HBsAg и анти-ВГС не позволяет в полной мере выявить все инфицированные компоненты крови, поскольку в ранние фазы заболевания в крови возможно детектировать только нуклеиновые кислоты этих вирусов. Поэтому для полного выявления инфицированных образцов крови доноров в дополнение к обязательным иммунохимическим используют молекулярные методы диагностики, которые выполняются в классическом варианте с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР и с регистрацией флуоресцентного сигнала в реальном времени. С целью изучения вклада этого метода в обеспечение вирусной безопасности трансфузий компонентов крови проведено исследование 558 образцов плазмы доноров, пришедших на донацию с апреля по июнь 2006 г., на наличие молекулярных маркеров ВГВ и ВГС с использованием отечественных ПЦР-тест-систем.

Образцы плазмы доноров ($n=441$) после обязательного скрининга HBsAg с использованием набора реагентов фирмы «Bio-Rad» были исследованы на наличие молекулярного маркера ВГВ (ДНК ВГВ) с помощью диагностикума со стандартным вариантом электрофоретической детекции продуктов ПЦР «АмплиСенс HBV-EPh» и в формате реального времени «АмплиСенс HBV-FRT». Данные представлены в таблице 5.

Из двух проб, содержащих HBsAg, в одной была выявлена ДНК ВГВ, причем при использовании двух видов ПЦР-наборов. В 9 из 439 (2,0%) образцов крови доноров, HBsAg-негативных при скрининговом ИФА-тестировании, методом ПЦР получен положительный сигнал при исследовании на наличие ДНК ВГВ.

При использовании ПЦР-теста с учетом продуктов амплификации в реальном времени в 9 (2%) из 439 случаев была дополнительно диагностирована ВГВ-инфекция, в отличие от стандартного варианта ПЦР, в котором был позитивен только один (0,2%) из 439 образцов.

Таблица 5. Результаты тестирования образцов крови доноров на маркеры ВГВ

ИФА (HBsAg)	Число образцов	ПЦР- положительные (ДНК ВГВ)	
		Стандартный вариант	Детекция в реальном времени
Положительные	2	1	1
Отрицательные	439	1	9
Всего	441	2	10

При исследовании образцов крови доноров, негативных по HBsAg, но содержащих ДНК ВГВ, на широкий спектр маркеров ВГВ-инфекции в двух случаях отмечено наличие изолированных анти-HBs и анти-HBs в сочетании с анти-HBc, что свидетельствует о ЛГВ. Данные представлены в таблице 6.

Вопрос о дальнейшем обследовании доноров, у которых ДНК была единственным маркером ВГВ-инфекции, с целью выявления возможной последующей сероконверсии остался открытым. Эти доноры являлись военнослужащими и сдавали компоненты крови только один раз.

Образцы плазмы доноров ($n = 558$) после обязательного скрининга анти-ВГС с использованием набора реагентов фирмы «Bio-Rad» были исследованы на наличие молекулярного маркера ВГС (РНК ВГС) с помощью диагностикума со стандартным вариантом электрофоретической детекции продуктов ПЦР «АмплиСенс HCV-EPh» и в формате реального времени «АмплиСенс HCV-FRT». Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 6. Результаты тестирования образцов крови доноров на наличие маркеров ВГВ

№ образца	HBsAg	Серологический профиль	Стандартный вариант ПЦР	Детекция в реальном времени	Количественная характеристика
1	+	не определяли	+	+	$1,7 \times 10^3$ МЕ/мл
2	+	анти-HBs/анти-HBc	-	-	не определяли
3	-	-	-	+	не определяли
4	-	-	-	+	не определяли
5	-	-	-	+	не определяли
6	-	-	-	+	не определяли
7	-	-	-	+	не определяли
8	-	анти-HBs	-	+	не определяли
9	-	анти-HBs/анти-HBc	+	+	не определяли
10	-	-	-	+	не определяли
11	-	-	-	+	не определяли

По результатам ИФА-исследования 5 проб содержали анти-ВГС, в трех из них была выявлена РНК ВГС. В 1 (0,2%) из 553 случаев анти-ВГС-негативных образцов крови доноров зарегистрирован положительный сигнал на РНК ВГС. Анализ показал полное совпадение результатов, полученных в ПЦР-тестах с детекцией продуктов амплификации в реальном времени и с электрофоретической детекцией.

Таблица 7. Результаты тестирования образцов крови доноров на маркеры ВГС

ИФА (анти-ВГС)	Число образцов	ПЦР-положительные (РНК ВГС)	
		Стандартный вариант	Детекция в реальном времени
Положительные	5	3	3
Отрицательные	553	1	1
Всего	558	4	4

Характеристика образцов плазмы доноров по выявленным маркерам ВГС представлена в таблице 8.

Таблица 8. Характеристика образцов плазмы доноров по выявленным маркерам ВГС

№	анти- ВГС	Стандартный вариант ПЦР	Детекция в реальном времени	Генотип ВГС	Количественная характеристика
1	+	+	+	3а	1×10^4 МЕ/мл
2	+	+	+	3а	1×10^7 МЕ/мл
3	+	+	+	3а	$7,7 \times 10^6$ МЕ/мл
4	+	-	-	не определяли	не определяли
5	+	-	-	не определяли	не определяли
6	-	+	+	-	-

В трех образцах, в которых были обнаружены и серологический (анти-ВГС) и молекулярный маркер ВГС, была определена концентрация РНК ВГС и идентифицирован генотип вируса. Концентрация РНК ВГС в этих образцах составила 1×10^4 , $7,7 \times 10^6$, 1×10^7 МЕ/мл и во всех трех случаях имел место генотип 3а. В образце крови донора, позитивном при тестировании на наличие РНК ВГС и негативном при тестировании на наличие анти-ВГС, не удалось определить уровень виремии и генотип ВГС, вероятно, за счет низкой концентрации РНК вируса. Контрольное обследование донора с целью прослеживания возможной в дальнейшем сероконверсии было недоступно, поскольку он был снят с донорства и отказался явиться на контрольное обследование.

Таким образом, проведенное исследование показало целесообразность использования метода ПЦР с целью наиболее полного выявления образцов крови доноров, инфицированных ВГВ и ВГС, причем тесты с регистрацией продуктов амплификации в реальном времени предпочтительнее в отношении чувствительности, особенно для детекции ДНК ВГВ.

В 2009 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России были исследованы 1200 серонегативных образцов крови доноров на наличие ДНК ВГВ, РНК ВИЧ и ВГС в пулах из 6 проб, используя мультиплексный дискриминационный тест Cobas TaqScreen MPX Test, version 2. Был обнаружен один образец крови донора, положительный по РНК ВГС (0,08%). В тех же условиях в 2013 г. было протестировано 4736 образцов крови доноров, что составляло 36,3% от общего числа донаций (13 047). В двух случаях была выявлена ДНК ВГВ (0,04%) в низкой концентрации – менее $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл. Анализ серологических маркеров ВГВ в этих образцах показал наличие анти-НВс. В 2014 г. и 2015 г. не было зарегистрировано положительных реакций по молекулярным вирусным маркерам, хотя было исследовано 77,5% (9128 из 11781) и 100% (12 677), образцов крови доноров от общего числа кроводач, соответственно. В 2016 г. за первые четыре месяца было исследовано 4 173 серонегативных образца крови доноров на наличие вирусных нуклеиновых

кислот, и в 1 случае в пуле из шести проб была выявлена ДНК ВГВ, причем в очень низкой концентрации. При попытке количественной оценки виремии в данном образце, был получен отрицательный результат, кроме того отсутствовали все серологические маркеры ВГВ (HBsAg, анти-HBs, HBeAg, анти-HBe, суммарные анти-HBc, анти-HBc IgM). АЛТ была 14 единиц как в момент последней донации, так и 16 дней спустя, при этом концентрация ДНК ВГВ уже составила $1,4 \times 10^3$ МЕ/мл при выделении из 500 миллилитров плазмы. Через 60 дней этот донор отметил появление тошноты, темной мочи, жидкого стула, сывороточная концентрация АЛТ составляла 2100 ед/мл с последующим постепенным снижением этого показателя в течение 30 дней до значений 1600 и 400 ед/мл. Через четыре месяца в сыворотке крови были обнаружены следующие серологические маркеры: HBsAg, суммарные анти-HBc, анти-HBc IgM, анти-HBe; HBeAg и анти-HBs – отсутствовали. При этом, сывороточная концентрация АЛТ составляла 24 ед/мл. У данного донора по данным лабораторной информационной системы, зафиксировано 8 донаций: 3 аппаратных тромбоцитозфераза, 3 кроводачи и 2 – аппаратных плазмаффераза. Суммируя все выше изложенное, можно заключить, что на момент последней донации у донора была начальная стадия острой ВГВ-инфекции – «негативного окна», он представлял инфекционную опасность для реципиентов компонентов его крови, и только благодаря исследованию на наличие молекулярных вирусных маркеров, используя высокочувствительный тест, тромбоцитный концентрат, заготовленный от этого донора, не был допущен для клинического применения.

Принимая во внимание существующие данные о преимуществе выполнения ПЦР-тестирования в индивидуальной постановке [385], позволяющего выявлять единичные вирусные частицы в миллилитре биоматериала, выполнен сравнительный анализ результатов исследования ДНК ВГВ и РНК ВГС в пулах из 6 и более образцов плазмы крови с индивидуальной постановкой образцов плазмы крови. Из образцов плазмы крови доноров, предварительно охарактеризованных на наличие ДНК ВГВ и РНК ВГС, было приготовлено 17 экспериментальных

пулов из 5 или 11 образцов, отрицательных по всем инфекционным маркерам, и одного положительного образца, содержащего ДНК ВГВ в концентрации $1,7 \times 10^3$ копий/мл, или РНК ВГС в концентрации 1×10^4 МЕ/мл. Результаты тестирования представлены в таблице 9.

Все пять пулов, состоящих из шести и двенадцати образцов плазмы крови доноров и содержащих один РНК ВГС-позитивный образец плазмы, были положительными. Таким образом, разбавление инфицированного образца в 6, и даже в 12 раз, не привело к значительному снижению чувствительности и отрицательному результату при детекции РНК ВГС.

ДНК ВГВ была выявлена в семи из десяти пулов, состоящих из шести образцов плазмы, а два пула, состоящие из двенадцати образцов плазмы, оказались отрицательными. Установлено, что разведение в 6 и 12 раз привело к недовыявлению 41,7% (5 из 12 случаев) образцов крови, содержащих ДНК ВГВ, но не повлияло на выявление молекулярного маркера ВГС – выявлено 100% инфицированных образцов крови доноров. Объяснить этот факт можно недостаточной чувствительностью использованных наборов реагентов, особенно, при экстракции из 100 мкл анализируемой биопробы.

Для количественной характеристики вирусной нагрузки ПЦР-позитивных проб донорской крови, полученных от донаций с 2006 по 2013 гг., были исследованы 72 образца, 21 из которых содержали ДНК ВГВ и 51 – РНК ВГС. Полученные данные представлены в таблицах 10 и 11.

В образцах крови, содержащих ДНК ВГВ, в большинстве случаев (66,67%) определена низкая вирусная нагрузка. Концентрация ДНК ВГВ была менее $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл в 4 образцах (19,05%), также в 4 образцах она выявлена в диапазоне от $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл до 1×10^3 МЕ/мл (19,05%), и в 6 образцах – от 1×10^3 до 1×10^4 МЕ/мл (28,57%).

Таблица 9. Результаты ПЦР-тестирования пулированных образцов плазмы доноров

N	Величина пула	Содержание нуклеиновой кислоты	Результат ПЦР-тестирования
1	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
2	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
3	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
4	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
5	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
6	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
7	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
8	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
9	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Положительный
10	6 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
11	12 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
12	12 образцов плазмы	ДНК ВГВ	Отрицательный
13	6 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
14	6 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
15	6 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
16	12 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный
17	12 образцов плазмы	РНК ВГС	Положительный

Таким образом, в 2/3 исследованных образцов крови доноров концентрация ДНК ВГВ содержалась в низких значениях, причем в 19,05% этот маркер зарегистрирован на пороговом уровне чувствительности тест-системы (менее $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл).

Таблица 10. Количественная характеристика ДНК ВГВ-позитивных образцов крови доноров

Концентрация ДНК ВГВ (в МЕ/мл)	Число образцов	Доля образцов	Уровень виремии
Менее $1,5 \times 10^2$	4	19,05 %	Низкий 66,67%
$1,5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	4	19,05 %	
$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	6	28,57%	
$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	4	19,05 %	Высокий 33,33%
$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	1	4,76%	
Более 1×10^6	2	9,52%	
Всего	21	100%	100%

Высокие концентрации ДНК ВГВ в диапазоне $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ МЕ/мл отмечены в 4 случаях, в диапазоне $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ МЕ/мл – в 1 образце крови донора и более 1×10^6 МЕ/мл – в 2 случаях.

Противоположная закономерность наблюдается в отношении РНК ВГС. Данные представлены в таблице 11.

Только в 27,45% случаев определены низкие концентрации молекулярного маркера ВГС: менее 3×10^2 МЕ/мл в 1 образце, в диапазоне $3 \times 10^2 - 1 \times 10^4$ МЕ/мл – 2 случая, в диапазоне $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ МЕ/мл – 11 случаев. Высокие значения

концентрации РНК ВГС выявлены в подавляющем большинстве образцов крови доноров: в диапазоне $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ МЕ/мл – 17 случаев (33,33%) и более 1×10^6 МЕ/мл – 20 случаев (39,22%).

Таблица 11. Количественная характеристика РНК ВГС-позитивных образцов крови доноров

Концентрация РНК ВГС (в МЕ/мл)	Число образцов	Доля образцов	Уровень виремии
Менее 3×10^2	1	1,96 %	Низкий 27,45%
$3 \times 10^2 - 1 \times 10^4$	2	3,92 %	
$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	11	21,57%	
$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	17	33,33 %	Высокий 72,55%
более 1×10^6	20	39,22%	
Всего	51	100%	100%

Таким образом, разведение позитивного образца в шесть раз при пулировании не приводило к недовыявлению РНК ВГС, поскольку в большей части образцов отмечается высокая концентрация РНК ВГС, в отличие от низких уровней ДНК ВГВ, зарегистрированных в большинстве исследованных образцов крови доноров. Разведение исследуемого образца плазмы крови донора может приводить к пропуску компонентов крови, содержащих ДНК ВГВ, при тестировании в формате минипулов и использовании набора реагентов с чувствительностью 100 МЕ/мл, что и подтверждено экспериментально (недовыявление специфического сигнала ВГВ в более 40% пулированных образцов). Данное наблюдение необходимо учитывать при выборе тактики лабораторного обследования.

Представленные данные демонстрируют необходимость введения обязательного ПЦР-исследования маркеров ВГВ и ВГС, являющегося дополнением к серологическим методам, в практику лабораторного обследования крови доноров на наличие вирусных инфекций, причем предпочтительнее в формате индивидуальной постановки, особенно в отношении индикации ВГВ. Однако ПЦР-тестирование в формате минипулов значительно снижает экономические затраты на исследование и в ряде случаев может быть оправдано. Если компоненты донорской крови в последующем подлежат карантинизации, инаktivации или предназначены для фракционирования, допустимо пулирование. В случае заготовки концентрата тромбоцитов данный формат исследования может явиться фактором, затрудняющим полную выбраковку инфекционных образцов донорской крови, и в связи с большим объемом донорской плазмы, переливаемым реципиенту, может привести к заражению ВГВ. Кроме того, при выборе тактики исследования образцов крови доноров на молекулярные маркеры ВГВ и ВГС важно учитывать и чувствительность используемых тест-наборов.

3.3. Скрининг образцов крови доноров на анти-НВс как инструмент повышения безопасности трансфузий

Разработаны порядок обследования крови доноров и выбраковки компонентов крови по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры, приведенный ниже, форма акта отстранения от донорства по результатам лабораторного тестирования (приложение 1) и согласие донора на проведение расширенного исследования образцов его крови на анти-НВс (приложение 2).

Порядок обследования донорской крови и выбраковки компонентов по результатам лабораторного исследования на маркеры инфекций.

Взятие образцов крови доноров для лабораторного исследования выполняется непосредственно после венепункции с помощью специального

контейнера, являющегося частью системы и снабженного коннектором для подсоединения пробирок - вакутейнеров.

Все образцы донорской крови подлежат обязательному исследованию иммуноферментным/иммунохемилюминисцентным методом (ИФА/ИХЛА) на наличие:

- 1) антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена р24 ВИЧ-1;
- 2) поверхностного антигена ВГВ;
- 3) антител к ядерному антигену ВГВ;
- 4) антител к ВГС;
- 5) наличие антител к tr.palidum(+реакция микропереципитации с кардиолипиновым антигеном).

Исследование проводится в день заготовки донорской крови и (или) ее компонентов.

При получении положительной реакции ИФА/ИХЛА проводят повторное исследование.

В случае получения повторного положительного результата ИФА/ИХЛА компоненты крови с коротким сроком годности (тромбоконцентрат, донорские эритроциты) подлежат выбраковке. Компоненты крови с длительным сроком хранения (плазма, криоконсервированные эритроциты) переносят в холодильник с маркировкой «Задержано лабораторией. Не для клинического применения» до получения результатов подтверждающих тестов.

Пробы с выявленными поверхностным антигеном ВГВ и/или антителами к ВГС исследуют в подтверждающих тестах – нейтрализация и иммуноблот (соответственно).

Пробы, с выявленными антителами к вирусу иммунодефицита человека направляются в МГЦ СПИД для дальнейшего исследования.

При положительном результате подтверждающих тестов на регламентированные маркеры, а также при выявлении анти-НВс с уровнем

реактивности более 3 условных единиц методами ИФА/ИХЛА (в связи с отсутствием подтверждающего теста):

- все компоненты крови, заготовленные от данного донора, подлежат выбраковке;
- составляют Акт отстранения от донорства, утверждают акт на заседании специальной комиссии, данные о доноре вносят в базу данных донорства. Донору предоставляется полная информация о результатах его обследования и принятии решения об отстранении от донорства.

Анти-НВс положительные образцы с уровнем реактивности менее 3 условных единиц дополнительно, для уточнения специфичности положительной реакции, могут быть исследованы на анти-НВс IgM, анти-НВс и анти-НВе.

При отрицательных результатах дополнительного тестирования и отрицательном результате подтверждающих тестов на декретированные маркеры донора временно отстраняют от донорства:

- компоненты крови, находящиеся на длительном хранении, откладываются в промаркированный холодильник «Задержано лабораторией. Не для клинического использования»;
- донору назначается контрольное обследование через 1-6 месяцев.

При повторном ИФА/ИХЛА обследовании донора:

- в случае положительного результата ИФА/ИХЛА, находящиеся на длительном хранении задержанные компоненты крови подлежат выбраковке, составляют Акт отстранения от донорства, утверждают акт на заседании специальной комиссии, данные о доноре вносят в базу данных донорства. Донору предоставляется полная информация о результатах его обследования и принятии решения об отстранении от донорства;

- в случае отрицательного результата ИФА/ИХЛА компоненты крови считаются пригодными для клинического применения, донора допускают к донации.

Как «ИФА/ИХЛА отрицательную» расценивают пробу:

- отрицательную в первой постановке;
- положительную в первой постановке и дважды отрицательную при повторном исследовании в той же тест-системе.

Постановка ПЦР осуществляется для всех образцов крови, негативных по антителам к ВГС, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, антигену р24 ВИЧ-1, поверхностному антигену ВГВ и антителам к ядерному антигену ВГВ, с целью выявления РНК ВИЧ, ВГС и ДНК ВГВ.

Если ПЦР исследование проводилось в пулах, в случае положительной реакции выполняют индивидуальные постановки. Затем положительные образцы передают для определения вирусной нагрузки, отрицательные образцы тестируют повторно.

При получении положительного результата ПЦР-исследования:

- все заготовленные от данного донора компоненты крови подлежат выбраковке;
- составляют Акт отстранения от донорства, утверждают акт на заседании специальной комиссии, данные о доноре вносят в базу данных донорства. Донору предоставляется полная информация о результатах его обследования и принятии решения об отстранении от донорства.

Компоненты крови, отрицательные по молекулярным вирусным маркерам, считают пригодными для клинического применения.

Для того, чтобы оценить значение рутинного тестирования образцов донорской крови на наличие анти-НВс (с целью выявления латентных форм вирусного гепатита В среди доноров крови и ее компонентов), было проведено в период с марта 2014 г. по апрель 2016 г. проспективное исследование 26 113 образцов крови доноров (таблица 12).

Таблица 12. Маркеры ВГВ, выявленные в образцах донорской крови в период проспективного исследования.

Месяц/год	Кол-во кроводач	Образцы крови первичных доноров		Образцы крови повторных доноров		HBsAg +	ДНК ВГВ+ HBsAg- анти- HBc-
		Кол-во	Анти- HBc+	Кол-во	Анти- HBc+		
Апрель/2014	968	275	14 (5,1%)	693	59 (8,5%)	1	0
Май/2014	1080	476	30 (6,3%)	604	36 (5,9%)	0	0
Июнь/2014	940	342	20 (5,8%)	598	12 (2%)	2	0
Июль/2014	946	323	24 (7,4%)	623	9 (1,4)%	1	0
Август/2014	1077	428	23 (5,4%)	649	14 (2,2%)	1	0
Сентябрь/2014	1198	355	31 (7,8%)	843	22*(2,6%)	2	0
Октябрь/2014	792	192	12 (6,3%)	600	6 (1%)	1	0
Ноябрь/2014	1289	699	30 (4,3%)	590	9* (1,5%)	1	0
Декабрь/2014	983	439	20 (4,6%)	544	3 (0,6%)	0	0
Январь/2015	874	391	14 (3,6%)	483	1* (0,2%)	2	0
Февраль/2015	1350	519	29 (5,6%)	831	3 (0,4%)	2	0
Март/2015	977	330	18 (5,5%)	647	1 (0,2%)	0	0
Апрель/2015	1050	340	14 (4,1%)	710	5 (0,7%)	0	0
Май/2015	987	346	20 (5,8%)	641	4 (0,6%)	2	0
Июнь/2015	1325	428	18 (4,2%)	897	9 (1,0%)	0	0
Июль/2015	871	209	6 (2,9%)	662	5 (0,7%)	0	0
Август/2015	1032	277	16 (5,8%)	755	3 (0,4%)	1	0
Сентябрь/2015	977	290	15 (5,2%)	687	2* (0,3%)	0	0

Октябрь/2015	1122	311	8 (2,6%)	811	3 (0,4%)	0	0
Ноябрь/2015	1054	246	10 (4,1%)	808	2* (0,2%)	0	0
Декабрь/2015	1048	234	9 (3,8%)	814	1 (0,1%)	0	0
Январь/2016	866	112	6 (5,4%)	754	2 (0,3%)	2	0
Февраль/2016	1179	208	6 (2,9%)	971	1 (0,1%)	0	1
Март/2016	924	122	6 (4,9%)	802	2* (0,2%)	0	0
Апрель/2016	1204	242	7 (2,9%)	962	1 (0,1%)	2	0
Всего	26113	8134	406 (5,0%)	17979	215 (1,2%)	20 (0,1%)	1

Примечание: * - в одном случае анти-НВс выявлены в образце крови донора, ранее обследованного на этот маркер.

От 792 до 1350 (медиана 1032) доноров в месяц осуществляли донации крови и ее компонентов. Соотношение числа первичных и повторных доноров, ежемесячно приходивших в отдел заготовки крови и ее компонентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, существенно не различалось за 25 месяцев наблюдения. За данный период число кроводач первичных доноров было в диапазоне от 112 (12,9%) до 699 (54,3%) в месяц (медиана 323, 34,1%). Число кроводач повторных доноров преобладало на протяжении всего периода исследования и составляло от 483 (55,3%) до 971 (82,4%) в месяц (медиана 693, 71,6%).

В 2015 г. доноры в возрасте 18-29 лет составляли 47% от общего числа, а в 2016 г. – 48%, из них доноров в возрасте 18 лет было 1,4%.

Была проанализирована частота выявления следующих маркеров ВГВ в образцах крови доноров: HBsAg, ДНК ВГВ и дополнительно – анти-НВс. Наличие других инфекционных маркеров (антител к ВИЧ, ВГС и возбудителю сифилиса) оценивали только в пробах, положительных по антителам к ядерному антигену ВГВ.

За весь период исследования из 26 113 образцов донорской крови было выявлено лишь 20 (0,1%) образцов, содержащих HBsAg и только один положительный по ДНК образец крови при отсутствии других маркеров ВГВ (случай ранней фазы инфекции, описан в предыдущей главе). Все 26 113 образцов донорской крови, в соответствии с утвержденным в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России порядком обследования доноров, были исследованы на наличие анти-HBc. Этот маркер был обнаружен в 621 (2,4%) образце, причем в 15 случаях – параллельно с HBsAg, 3 – с анти-ВГС, 1 – с анти-ВИЧ и 4 – с антителами к возбудителю сифилиса. При исследовании образцов крови доноров на наличие инфекционных маркеров 598 были положительны только по анти-HBc. В 5 образцах донорской крови был выявлен только HBsAg, при отсутствии анти-HBc, что может свидетельствовать о ранней фазе инфекции. За 25 месяцев наблюдения частота выявления анти-HBc в образцах крови первичных доноров значимо не изменилась и составляла от 6 до 31 случая в месяц. Данные представлены в таблице 12. Доля образцов крови, взятых от повторных и содержащих анти-HBc, среди всех проб крови составляла от 2,6% до 7,8% (медиана 5,1%). В тоже время, отмечено статистически значимое снижение частоты встречаемости анти-HBc в образцах крови повторных доноров с 59 случаев в апреле 2014 г. до 1 случая в апреле 2016 г., что составило от 8,5% до 0,1% от всех обследованных ежемесячно проб повторных доноров ($\chi^2=79,5$, $p<0,05$). Данную динамику можно объяснить тем, что лица, в образцах крови которых были выявлены анти-HBc, отстранялись от донорства. Однако за время наблюдения отстранение от донорства таких лиц не повлияло на общее число донаций, регулярно осуществляемых повторными донорами, которое составляло от 483 до 971 в месяц (медиана – 693). Как следует из данных, представленных в таблице 12, уже за восемь месяцев (к декабрю 2014 г.) удалось сформировать когорту регулярных повторных, не инфицированных ВГВ (отрицательных по анти-HBc) доноров. Встречаемость в образцах их крови анти-HBc составила ниже 1%. В дальнейшем исследовании (с декабря 2014 г. по апрель 2016 г.) этот показатель существенно не менялся. В то же время в начале исследования частота

встречаемости антител к ядерному белку ВГВ была достоверно выше в образцах крови повторных доноров по сравнению с образцами крови первичных доноров – 8,5% и 5,1%, соответственно ($\chi^2=45,15$, $p<0,05$). В апреле 2016 г. доля положительных результатов тестирования на наличие анти-НВс образцов крови от повторных доноров была статистически значимо ниже по сравнению долей таких результатов в образцах крови от первичных доноров – 0,1% и 2,9%, соответственно ($\chi^2=18,75$, $p<0,05$), что произошло за счет отстранения от донорства лиц, у которых в крови был обнаружен этот маркер ВГВ.

За 25 месяцев обследования повторных доноров, образцы крови которых были ранее исследованы на наличие серологических и молекулярных вирусных маркеров и были получены отрицательные результаты, в 6 случаях в образцах от последующих донаций были выявлены анти-НВс.

У одного донора анти-НВс с невысоким коэффициентом позитивности (1,77) появились спустя 3 месяца после предыдущей донации. Анти-НВс были единственным выявленным маркером ВГВ. На наличие ДНК ВГВ в индивидуальной постановке был исследован архивный материал от предыдущей донации и получен отрицательный результат. Для исключения неспецифической реакции на анти-НВс донору было назначено контрольное обследование через 3 месяца, согласно разработанному и утвержденному порядку обследования донорской крови и выбраковки компонентов крови в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Выполнить контрольное обследование донора не удалось по причине неявки донора.

У второго донора анти-НВс появились уже через 2 месяца после предыдущей донации. Кроме анти-НВс суммарных были обнаружены анти-НВс IgM. Исследование архивного материала от предыдущей донации в индивидуальной постановке показало наличие ДНК ВГВ в низкой концентрации (менее $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл). От этой донации была заготовлена эритроцитарная взвесь и перелита пациенту центра в день заготовки. Пациент умер от основного заболевания через две недели после трансфузии, поэтому не удалось выполнить исследование его крови на наличие маркеров ВГВ.

В третьем случае в образце крови донора были выявлены анти-НВс методом ИХЛА с низким показателем позитивности (1,2), при этом, с помощью ИФА-метода выявлены анти-НВс в титре 200 мМЕ/мл, а анти-НВс этим методом не определялись. Остальные маркеры ВГВ (ДНК, НВsAg, анти-НВс IgM, анти-НВе) не выявлены. Предыдущая донация была 4 месяца назад, и донор был обследован на наличие инфекционных маркеров. Был заготовлен концентрат тромбоцитов и перелит реципиенту, который не был обследован на маркеры ВГВ после трансфузии из-за смерти в реанимационном отделении от основного заболевания.

В образце крови четвертого донора при скрининге на инфекционные маркеры методом ИХЛА была зафиксирована положительная реакция по анти-НВс с показателем позитивности 1,9, присутствовали анти-НВс IgM, анти-НВс в титре 97 мМЕ/мл, остальные маркеры ВГВ не выявлены (НВsAg, ДНК и анти-НВе). От предыдущей донации двумя месяцами ранее была заготовлена эритроцитная взвесь и перелита пациенту, ранее не обследованному на широкий спектр маркеров ВГВ, который умер от основного заболевания через два месяца после трансфузии.

В пятом случае анти-НВс были выявлены вместе с антителами к ВИЧ в образце крови донора, титр анти-НВс составлял 122 мМЕ/мл. Эритроцитная взвесь с ресуспендирующим раствором, фильтрованная, была заготовлена три месяца назад и перелита реципиенту, у которого были анти-НВс в защитном титре на момент трансфузии. В течении полугода наблюдения у этого пациента не появились ни маркеры активной ВГВ-инфекции, ни антитела к ВИЧ.

В шестом случае образец крови донора содержал анти-НВс (коэффициент позитивности – 8,29), анти-НВс в титре 20 мМЕ/мл, анти-НВе, при отсутствии анти-НВс IgM и ДНК ВГВ. Заготовленный от данного донора 15 дней назад концентрат тромбоцитов был и перелит двум реципиентам. Один реципиент на момент трансфузии уже был инфицирован ВГВ (присутствовали анти-НВс) и в течение трех месяцев наблюдения у него не появились лабораторные маркеры активации ВГВ-инфекции. Второй реципиент на момент трансфузии не был

обследован на весь спектр маркеров ВГВ, а через четыре месяца у него не были выявлены HBsAg, анти-HBc, а анти-HBs были в титре 39 мМЕ/мл.

Таким образом, согласно полученным данным, у повторных доноров случаи появления анти-HBc в качестве нового маркера крайне редки. Не выявлены случаи инфицирования реципиентов потенциально опасными в отношении ВГВ компонентами крови доноров, заготовленными от предыдущих донаций. Только в образце крови одного донора удалось обнаружить ДНК ВГВ в низком титре, что характерно для латентной формы ВГВ-инфекции. В остальных 5 случаях анти-HBc изолированные или в сочетании с антителами к другим антигенам вируса свидетельствовали об инфицированности ВГВ, при невыявлении ДНК вируса, концентрация которой могла быть ниже чувствительности используемого набора реагентов.

С целью определения напряженности специфического противовирусного иммунитета было выполнено исследование на наличие анти-HBs 495 из 606 образцов донорской крови, содержащих анти-HBc, но в отсутствии HBsAg. Обнаружено (таблица 13), что данный маркер имел место в 79,6% случаях ($n=394$), причем достоверно чаще анти-HBs выявлялся в высоком защитном титре – более 100 мМЕ/мл (283, 57,2%, $\chi^2=190,33$, $p<0,05$).

Согласно протоколу исследования, все образцы крови доноров, положительные по анти-HBc, были протестированы на наличие анти-HBc IgM. Из 495 следованных проб положительными по анти-HBc IgM оказались 38, что составило 7,7%. Согласно данным, представленным в таблице 13, доля образцов крови доноров, содержащих маркер острой ВГВ-инфекции (анти-HBc IgM) была сопоставима как в образцах с высоким титром анти- HBs, так в образцах крови, отрицательных по этому маркеру (7,8% и 6,9%, $p=0,945$).

В ряде стран для уменьшения потерь среди потенциальных доноров используется дополнительный алгоритм тестирования крови анти-HBc-позитивных доноров на наличие анти-HBs. Даже ВОЗ рекомендует компоненты крови доноров, у которых обнаружены анти-HBc и анти- HBs в титре 100 мМЕ/мл и выше, но при отрицательном результате исследования на ДНК ВГВ, считать

пригодными для клинического применения [54]. Но, согласно полученным данным, не представляется возможным исключение потенциальной вирусной опасности переливания компонентов донорской крови, содержащих анти-НВс, даже при условии обнаружения в них анти-НВс в высоких титрах. Особенно сомнительна безопасность таких компонентов крови, предназначенных для пациентов с заболеваниями системы крови. В данном исследовании при лабораторном тестировании на наличие инфекционных маркеров были выявлены и не допущены до клинического применения 598 образцов крови доноров положительные только по анти-НВс.

Таблица 13. Титр анти-НВс в положительных по анти-НВс образцах крови доноров и зависимость от обнаружения маркера острой инфекции (анти-НВс IgM)

Титр анти-НВс	Количество	Из них анти-НВс IgM+	
		Количество	Процент
>10 мМЕ/мл	101	7	6,9
10-100 мМЕ/мл	111	9	8,1
>100 мМЕ/мл	283	22	7,8
Всего	495	38	7,7
p	$\chi^2=190,33$, $p<0,05$	$\chi^2=0,11$, $p=0,945$	

3.4 Построение математических моделей и расчет эпидемиологических показателей по результатам проспективного исследования

Процедура построения математической модели заключалась в подборе такого уравнения математической модели линии тренда, которое будет иметь максимальное значение показателя R^2 и наилучшее визуальное соответствие поведения модели и данных.

Использовались модели: линейная, полиномиальные (степени от 2 до 4) и экспоненциальная. Экспоненциальные модели использовались в случаях, когда линейное снижение соответствующего показателя могло при экстраполяции привести к отрицательным значениям.

По данным, представленным в таблице 12, построены графики (рисунок 18).

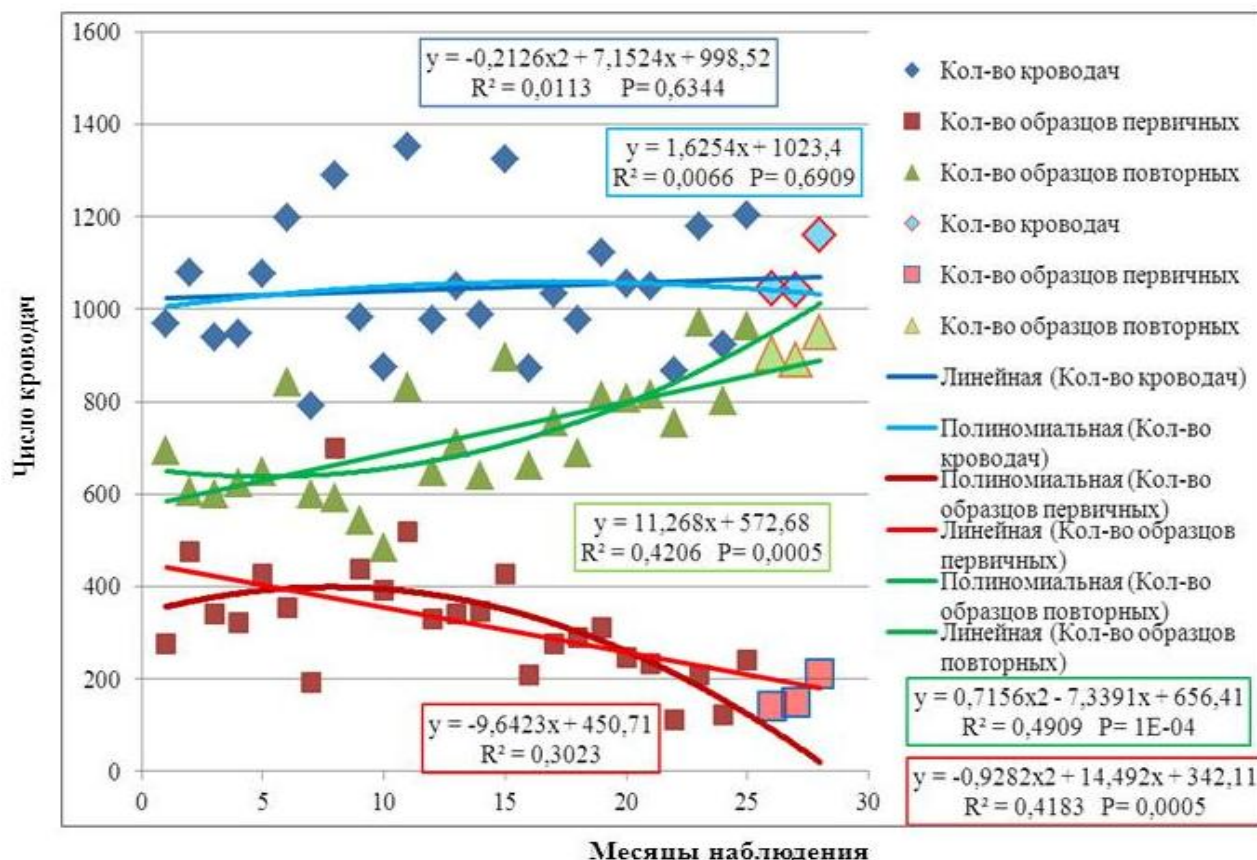


Рисунок 18. Тенденции количества образцов первичных и повторных доноров в период проспективного исследования

За 25 месяцев не отмечено значимого изменения общего числа донаций ($p=0,6909$). В период проспективного исследования наблюдалось достоверное увеличение числа кроводач повторных доноров ($p = 0,0005$) на фоне снижения числа кроводач первичных доноров ($p = 0,0046$). Этот феномен является прямым следствием процедуры вычислений: число кроводач повторных доноров получается вычитанием числа кроводач первичных доноров из общего числа кроводач. Так как моделирование не выявило достоверных временных тенденций

общего числа кроводач, то для прогнозирования достаточно вычислять процент числа кроводач повторных доноров от общего числа кроводач (процент кроводач первичных доноров будет дополнением до 100%).

С целью выбора оптимальных моделей для прогнозирования были добавлены данные за последующие 3 месяца исследования с мая по июль 2016г. В этот период общее число кроводач составило 3246, ежемесячно: 1045, 1041 и 1160. Количество кроводач повторных доноров ($n=2744$) также преобладало по сравнению с количеством кроводач первичных доноров ($n=502$). Данные представлены в таблице 14.

Полиномиальные модели оказались неудачными для прогнозирования и были заменены линейными (рисунок 18). Тенденции, выявленные линейными моделями на данных до апреля 2016 (таблица 12), сохранялись и в следующие 3 месяца (таблица 14). Таким образом, сохранение общего числа донаций происходит за счет увеличения числа донаций повторных доноров на фоне снижения числа донаций первичных доноров.

Таблица 14. Динамика выявления анти-НВс в образцах крови доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в период с мая по июнь 2016 г.

Месяц/год	Кол-во кроводач	Образцы крови первичных доноров			Образцы крови повторных доноров		
		Кол-во	Анти-НВс+	Прогноз линейной модели	Кол-во	Анти-НВс+	Прогноз экспоненциальной модели
Май/2016	1045	142	5 (3,5%)	3,4%	903	2 (0,2%)	0,098%
Июнь/2016	1041	150	5 (3,3%)	3,3%	891	0	0,085%
Июль/2016	1160	210	6 (2,9%)	3,2%	950	1 (0,1%)	0,074%
Всего	3246	502	16 (3,2%)	-	2744	3 (0,1%)	-

На рисунках 19 и 20 представлены математические модели динамики процентного соотношения анти-НВс-положительных образцов крови первичных и повторных доноров крови и ее компонентов.

Моделирование динамики с течением времени процентного соотношения образцов крови первичных доноров, содержащих анти-НВс, позволило выявить достоверное снижение этого показателя за время проспективного исследования ($P = 0,0018$). Линейная модель оказалась удачной, что подтверждается добавлением данных последующих трех месяцев (таблица 14). Полиномиальная модель второго порядка ни визуально, ни по точности прогнозирования существенно не отличается от линейной, но более сложна для вычислений (рисунок 19).

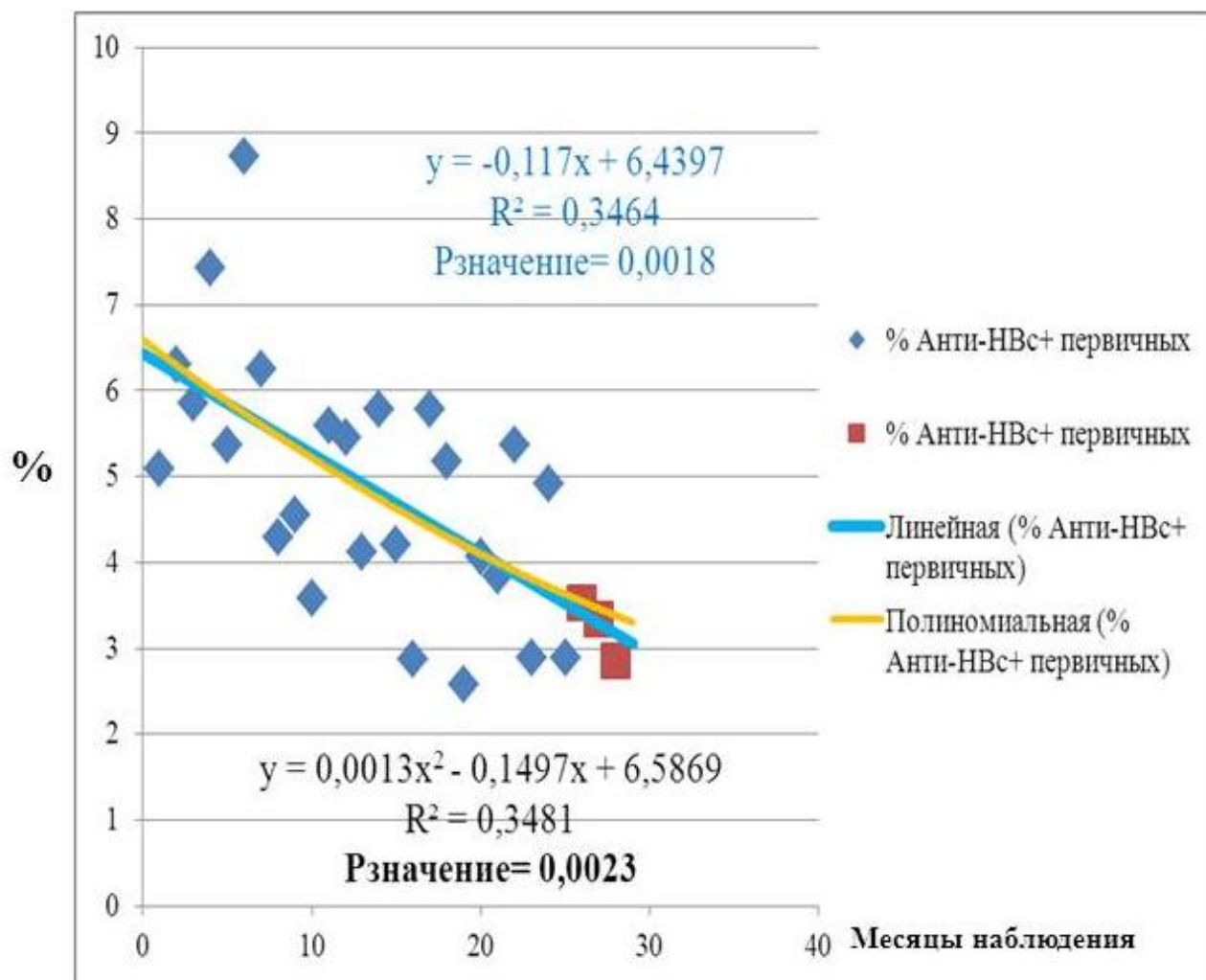


Рисунок 19. Тенденции процентного соотношения образцов крови первичных доноров, положительных по анти-НВс

Моделирование динамики процентного соотношения образцов крови повторных доноров, содержащих анти-НВс, представлено на рисунке 20. Экспоненциальная модель позволяет уверенно (с той же точностью, с которой интерполируются предыдущие значения) экстраполировать тенденцию на следующие 3 месяца. Другими словами, выявленная по данным, представленным в таблице 12, общая тенденция сохранялась в последующие 3 месяца (таблица 14). Эти же графики показывают, что выбранная полиномиальная модель 4 степени непригодна для прогнозирования общей тенденции.

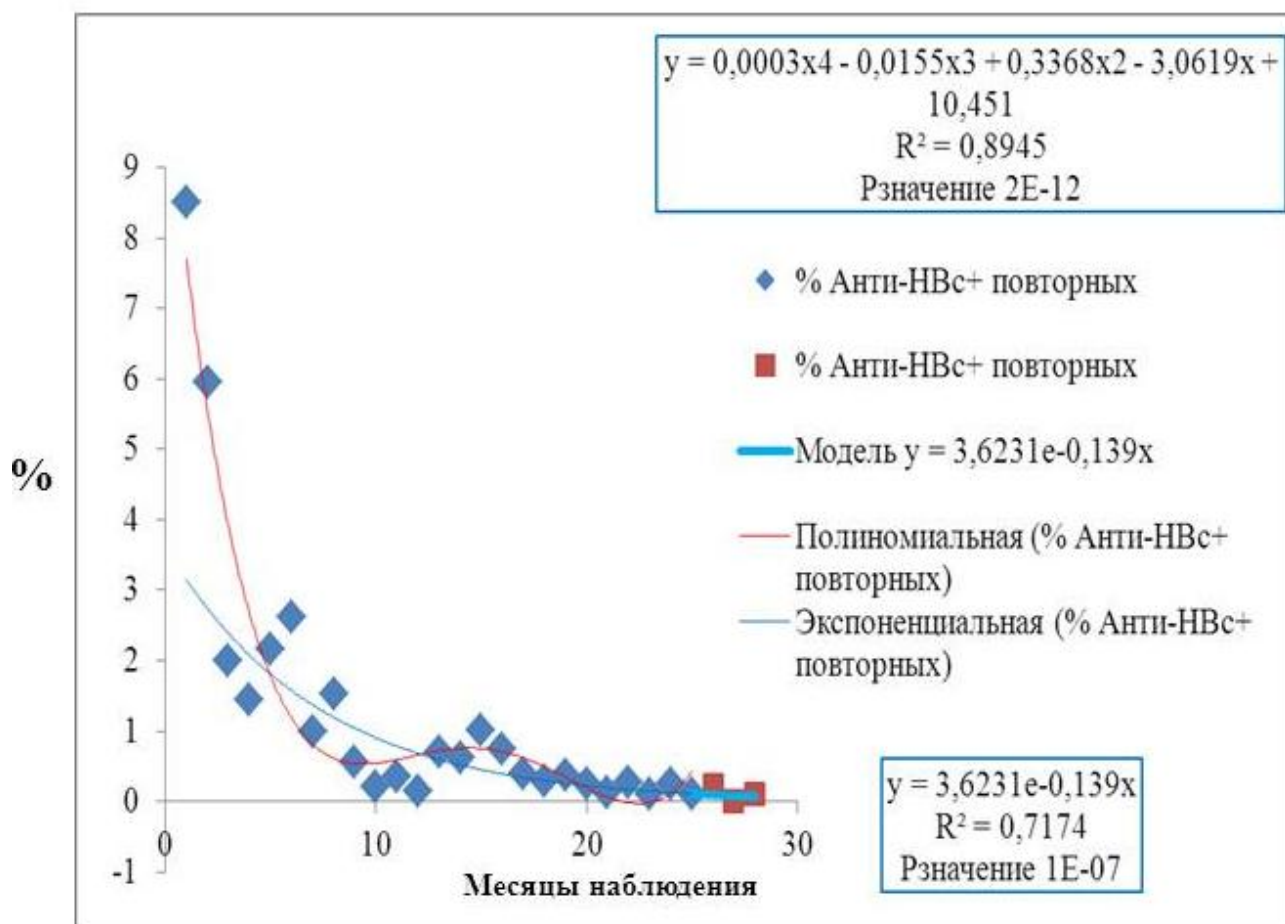


Рисунок 20. Тенденции процентного соотношения образцов крови повторных доноров, содержащих анти-НВс

Таким образом, математическое моделирование позволило спрогнозировать на последующие три месяца снижение числа анти-НВс-положительных образцов

крови как повторных, так и первичных доноров. Отстранение доноров, образцы крови которых были положительны по анти-НВс, не привело к изменению общего числа донаций. Зафиксировано достоверное снижение числа донаций первичных доноров и увеличение числа донаций повторных доноров.

Расчет эпидемиологических показателей, определяющих безопасность трансфузий компонентов крови доноров.

Были использованы следующие эпидемиологические показатели, определяющие безопасность:

1. Выявляемость – количество событий за определенный период времени на 100 000 донаций;
2. Инцидентность – количество положительных реакций на 100 000 человеко-лет;
3. Остаточный риск трансфузионного инфицирования – равный инцидентности умноженной на период негативного окна инфекции в годах на 1 млн. донаций.

Выявляемость маркеров ВГВ у первичных и повторных доноров.

Выявляемость маркеров ВГВ у первичных и повторных доноров рассчитывали по данным, представленным в таблице 12. Выявляемость анти-НВс в образцах крови первичных доноров была в 4 раза выше по сравнению с повторными донорами ($4991,39/10^5$ донаций и $1195,84/10^5$ донаций). Данные представлены в таблице 15.

Все положительные по HBsAg образцы крови принадлежали первичным донорам крови и ее компонентов, в то время как, единственный образец, положительный по ДНК ВГВ, – повторному донору, поэтому для первичных доноров была рассчитана только выявляемость HBsAg, а для повторных – ДНК ВГВ.

Таблица 15. Выявляемость маркеров ВГВ у первичных и повторных доноров в период с марта 2014 г. по апрель 2016 г.

Маркер	Выявляемость/10 ⁵ донаций	
	Образцы крови первичных доноров	Образцы крови повторных доноров
Анти-НВс	4991,39	1195,84
НВsAg	135,23	-
ДНК ВГВ	-	5,56

Оценка остаточного риска трансфузионного инфицирования ВГВ.

Поскольку данные, необходимые для расчета остаточного риска трансфузионного инфицирования, доступны в лабораторной информационной системе с конца 2014 г. и, учитывая, что ПЦР-скрининг образцов крови от всех донаций осуществлялся только с 2015 г., для анализа был выбран период проспективного наблюдения в течении 16 месяцев (с начала 2015 г. по апрель 2016 г.). За этот период времени было совершено 16840 донаций, из которых 12235 – повторными донорами крови и ее компонентов (таблица 12). Для расчета остаточного риска трансфузионного инфицирования была использована общепринятая методика [349], периоды негативного окна выбраны согласно работе Vermeulen M. С соавт. [385].

Методика оценки суммы интервалов между донациями для повторных доноров.

Обозначения: Т – период наблюдения (16 месяцев), из отчета: N – число кроводач повторных доноров за период наблюдения (12235), М – число повторных доноров (3967), s – среднее число кроводач на одного донора за период наблюдения $s = N/M (=3,084)$, τ – средний интервал между донациями у одного донора $\tau = T/s$ (157,8 дня, число донаций одного донора в год = $365/157,8 =$

2,3), сумма интервалов между донациями для всех повторных доноров за период наблюдения человеко-лет $SI = \tau \times N$. Окончательно, получаем формулу:

$$SI = T \times M$$

Количество человеко-лет, согласно расчетам, составило 5289.

Отношение периода наблюдения к общему числу кроводач повторных доноров (T/N) можно интерпретировать как средний интервал между донациями.

Инцидентность анти-НВс среди повторных доноров составила 113,44/100 тыс. человеко-лет, а инцидентность ДНК ВГВ – 18,90/100 тыс. человеко-лет.

Остаточный риск трансфузионного инфицирования ВГВ, рассчитанный на основе анализа данных обследования повторных доноров с учетом результатов ПЦР-тестирования, составил 0,79 на 1 млн. донаций. Для расчетов была использована маленькая выборка, следовательно, учитывать его мы считаем преждевременным. Необходимы дополнительные исследования.

3.5 Лабораторные маркеры вирусов гепатитов у пациентов с заболеваниями системы крови

У пациентов с заболеваниями системы крови поражение печени является одним из наиболее частых осложнений в ходе проведения программной химиотерапии. Характерной особенностью данного осложнения у гематологических больных является его сложный смешанный генез: инфильтрация печени опухолевыми клетками, гепатотоксичность химиопрепаратов, а также воздействие инфекционных агентов. Дифференциальная диагностика вирусного гепатита начинается с рутинного исследования крови пациента на HBsAg и анти-ВГС, и, в большинстве случаев, на этом и заканчивается. Лишь в некоторых клиниках и гематологических

отделениях проводят более глубокое исследование на широкий спектр маркеров вирусного гепатита В (анти-HBs, анти-HBc, анти-HBe, HBeAg) и используют молекулярные методы диагностики вирусных инфекций, в частности, определение ДНК ВГВ и РНК ВГС методом ПЦР.

Проанализирована динамика выявления регламентированных маркеров ВГВ и ВГС (HBsAg и анти-ВГС) в период с 2003 по 2016 гг. в образцах крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России ($n = 58\,455$) (рисунок 21).

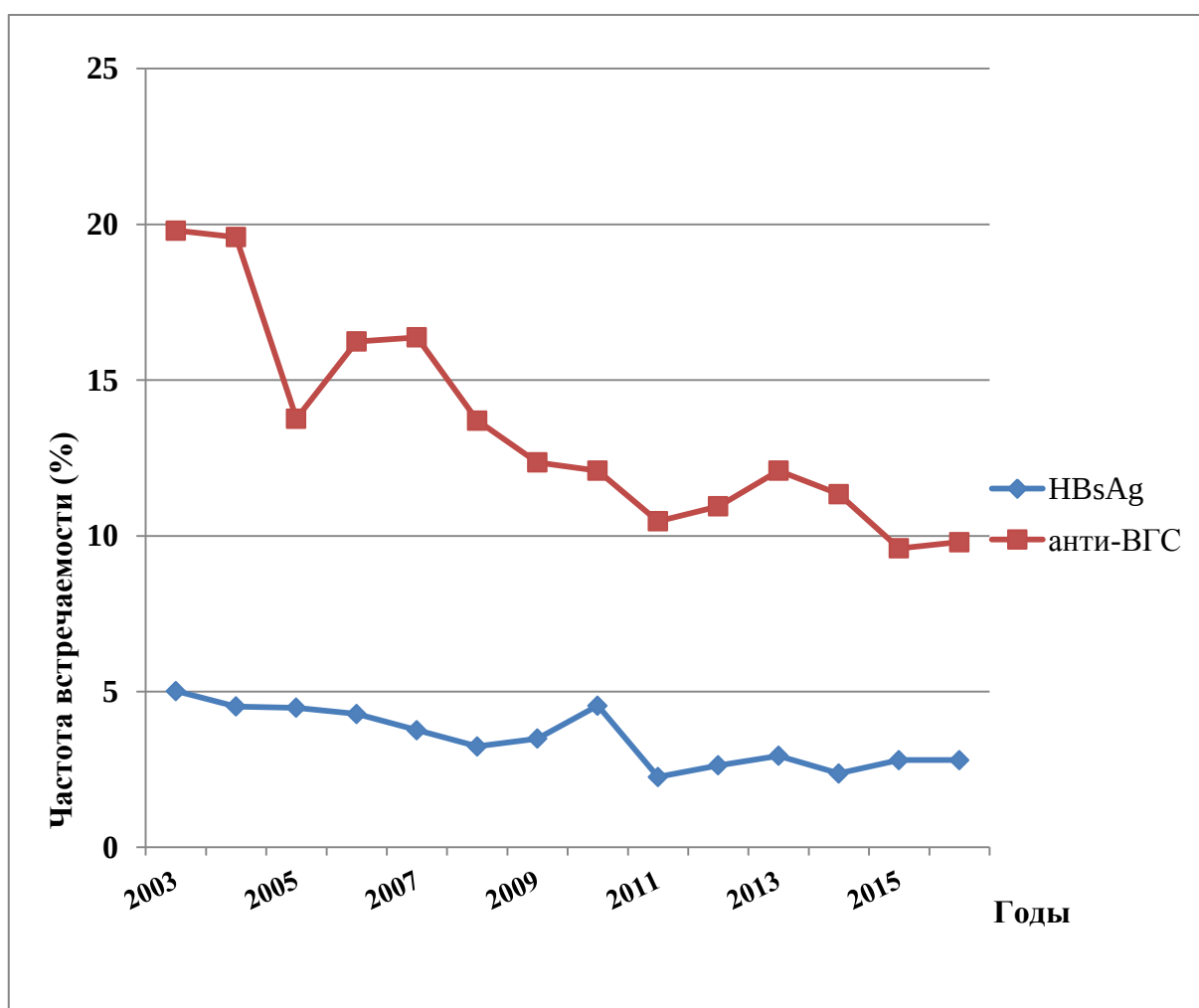


Рисунок 21. Динамика частоты выявления маркеров вирусов гепатитов В и С в образцах крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за период с 2003 по 2016 гг.

За указанный 14 летний период наблюдалось статистически достоверное снижение частоты встречаемости HBsAg и анти-ВГС в образцах крови пациентов с заболеваниями системы крови ВГС с 5,0% до 2,8% ($\chi^2=29,56$, $p<0,00001$) и с 19,8% до 9,8% ($\chi^2=183,23$, $p<0,00001$), соответственно.

Исследование на HBsAg и анти-ВГС не в полной мере отражают уровень инфицированности ВГВ и ВГС больных заболеваниями системы крови. С целью определения данного показателя используют другие лабораторные маркеры этих вирусов, появляющиеся на разных этапах заболевания.

Пациенты ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России из различных нозологических групп были обследованы однократно при поступлении в стационар на расширенный спектр маркеров вирусов гепатитов В и С: больные апластической анемией (АА) - 69 человек, острыми лейкозами (ОЛ) – 93 человек, хроническим миелолейкозом (ХМЛ) – 45 человек, хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) – 19 человек, множественной миеломой (ММ) – 31 человек. В качестве контрольной группы пациентов с высокой трансфузионной нагрузкой были выбраны 20 больных гемофилией А и В, поскольку до 2006 г. заместительная терапия факторов свертывания проводилась только компонентами донорской крови.

Как видно из данных, представленных в таблице 16, суммарная частота обнаружения серологических маркеров ВГВ и ВГС при первичном скрининге колебалась в разных группах пациентов от 51,6% до 73,7%; при этом статистически достоверных различий между группами найдено не было ($p>0,05$).

HBsAg был выявлен в 14 из 257 (5,4%) образцов крови пациентов. Доли HBsAg-положительных образцов крови пациентов достоверно различались в зависимости от нозологии ($\chi^2= 12,21$, $p=0,016$), минимальные значения были выявлены у пациентов с ХМЛ (0%) и АА (1,4%), а максимальные у пациентов с ХЛЛ (15,8%). Анти-HBs были выявлены в 89 из 257 (34,6%) образцов крови пациентов. Отмечены статистически значимые различия по частоте встречаемости анти-HBs среди пациентов с разными заболеваниями:

минимальные значения были получены у больных ММ (19,3%), максимальные - у больных АА (44,9%) ($\chi^2 = 16,89$, $p = 0,002$). Суммарные анти-НВс были зарегистрированы у 76 из 257 (29,6%) пациентов, причем частота выявления данного маркера значимо не различалась среди пациентов пяти анализируемых групп ($\chi^2 = 2,77$, $p = 0,598$).

Таблица 16. Частота встречаемости маркеров ВГВ и ВГС у пациентов с различными нозологическими формами заболеваний системы крови при первичном обследовании.

Диагноз	n	Без серо-маркеров	Профиль серологических маркеров ВГВ и ВГС							ПЦР-маркеры	
			HBsAg	анти-НВс	анти-НВс сумм.	анти-НВс IgM	HBeAg	анти-HBe	анти-ВГС	ДНК ВГВ	РНК ВГС
АА	69	28 40,5%	1 1,45%	31 44,9%	20 29,0%	2 2,9%	0 0%	13 18,8%	7 10,1%	2 2,9%	7 10,1%
ОЛ	93	43 46,2%	6 6,4%	36 38,7%	31 33,3%	0 0%	3 3,2%	15 16,1%	0 0%	8 8,6%	4 4,3%
ХМЛ	45	18 40%	0 0%	9 20%	9 20%	0	0	1 2,2%	3 6,6%	3 6,6%	3 6,6%
ХЛЛ	19	5 26,3%	3 15,8%	7 36,8%	6 31,6%	0	0	5 26,3%	0	4 21,0%	1 5,2%
ММ	31	15 48,4%	4 12,9%	6 19,3%	10 32,2%	2 6,4%	2 6,4%	2 6,4%	3 9,6%	4 12,9%	2 6,4%
Всего	257	109	14	89	76	4	5	36	13	21	17

Маркеры ВГВ, свидетельствующие об активной фазе инфекции (анти-НВс IgM и НВсAg), были выявлены у небольшого числа больных: у 4 (1,6%) и 5 (1,9%) из 257 обследованных, соответственно, также без статистически значимых различий ($p>0,05$). В то же время, анти-НВс зарегистрированы у 36 из 257 обследованных (14,0%), причем ни в одном случае эти антитела не являлись единственным маркером ВГВ-инфекции, сопровождая анти-НВс и/или анти-НВс. Анти-ВГС были выявлены в 13 из 257 (5,1%) образцов крови больных, со статистически значимыми колебаниями по группам пациентов от 0 при ХЛЛ, 6,6% при ХМЛ, до 10,1% при АА ($\chi^2=11,3$, $p=0,023$). Последний показатель в исследуемых группах был ниже, чем в когорте всех пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (16,3% в те же годы - 2006-2007 гг.), куда входили и больные гемофилией. Больные гемофилией (таблица 17) были тотально инфицированы ВГС (20 из 20 обследованных, 100%) и частота встречаемости серологических и молекулярных маркеров ВГВ и ВГС достоверно выше в этой группе по сравнению с образцами крови от пациентов с другими заболеваниями системы крови – АА, ОЛ, ХМЛ, ХЛЛ и ММ ($p<0,05$).

Таблица 17. Частота индикации маркеров ВГВ и ВГС при первичном обследовании больных с диагнозом гемофилия.

N	Без серологических маркеров	Профиль серологических маркеров ВГВ и ВГС							ПЦР-маркеры	
		HBsAg	анти- - HBs	анти- HBc сумм.	анти- HBc IgM	HBeAg	анти- HBe	анти- ВГС	ДНК ВГВ	РНК ВГС
20	0 (0%)	0 (0%)	16 (80%)	13 (65%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (65%)	20 (100%)	3 (15%)	5 (25%)

В образцах крови больных гемофилией отсутствовал HBsAg и серологические маркеры активной ВГВ-инфекции (анти-НВс IgM, HBeAg).

Профиль серологических маркеров у данного контингента пациентов характерен для латентной формы ВГВ-инфекции: 13 из 20 (65%) образцов содержали анти-НВс и 16 (80%) - анти-НВs. В 3 из 20 случаев (15%) выявлена ДНК ВГВ и в 5 (25%) – РНК ВГС. Таким образом, суммарная выявляемость молекулярных маркеров ВГВ и ВГС среди больных гемофилией составляла 35%, что значительно выше, чем среди пациентов с другими заболеваниями системы крови (от 12,9 до 26,2%, в среднем 14,8%). Суммарная выявляемость молекулярных маркеров ВГВ и ВГС (ДНК ВГВ и РНК ВГС) наиболее велика у больных ХЛЛ (26,2%) и ММ (19,3%); в других группах (АА, ОЛ, ХМЛ) она ниже и практически одинакова ($\approx 13\%$, $p > 0,05$). У подавляющего большинства обследованных частота обнаружения ДНК ВГВ и РНК ВГС превышала соответствующие показатели для НВsAg и анти-ВГС на 1-2%. У 5,4% больных ОЛ, негативных по всем серологическим маркерам, наличие ДНК ВГВ или РНК ВГС было единственным свидетельством инфицированности ВГВ и ВГС.

3.6 Проведение эпидемиологического расследования случаев возможного инфицирования реципиента компонентов донорской крови вирусом гепатита В и/или С

С целью выявления случаев вероятного трансфузионного инфицирования, с августа 2013 г. проводилась регистрация случаев первичного выявления лабораторных маркеров ВГВ и ВГС (НВsAg, ДНК ВГВ, анти-ВГС, РНК ВГС) у ранее обследованных пациентов, а с ноября 2013 года инициировано расследование таких случаев. Был разработан двухэтапный порядок проведения расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ранее отрицательных по маркерам этих вирусов. После выявления маркера в образце крови пациента проверяли имеющиеся данные в лабораторной информационной системе,

анализировали спектр сделанных ранее лабораторных исследований. При отсутствии/недостаточности данных дополнительно исследовали панель маркеров ВГВ или ВГС. Для вируса гепатита В панель состояла из – HBsAg, ДНК ВГВ, анти-HBs, анти-HBc, HBeAg, анти-HBe. Если были выявлены анти-HBc, то дополнительно исследовали на наличие анти-HBc IgM с целью определения активности вирусного процесса. Для вируса гепатита С панель состояла из анти-ВГС и РНК ВГС. После получения полной панели маркеров определяли даты первого положительного результата и предшествующего отрицательного результата по этому маркеру. По базе данных научной лаборатории вирусной безопасности трансфузий крови и её компонентов проводили поиск архивных образцов плазмы/сыворотки крови пациента, присланных на исследование ДНК герпесвирусов, в период между положительным результатом и предыдущим отрицательным результатом.

На первом этапе расследования определялась дата вероятного инфицирования (ДВИ). ДВИ определяется как наиболее ранняя точка отсчета, после которой вероятное инфицирование могло проявиться выявлением лабораторных вирусных маркеров. ДВИ вычисляли по формуле с учетом даты первичного выявления (ДПВ) лабораторных маркеров вирусов гепатитов. В случае первичного выявления HBsAg или молекулярных маркеров ВГВ и ВГС, поскольку ДНК ВГВ и РНК ВГС достигают обнаруживаемых концентраций через 10-15 дней, а поверхностный антиген ВГВ можно выявить через 1 месяц от момента инфицирования, но, согласно данным литературы [32, 385], «негативное окно» составляет 3 месяца:

$$\text{ДВИ} = \text{ДПВ} - 90 \text{ дней.}$$

В случае первичного выявления анти-ВГС, так как антитела появляются в определяемом титре от 7-8 недель до 6 месяцев от момента инфицирования:

$$\text{ДВИ} = \text{ДПВ} - 180 \text{ дней.}$$

Если были доступны архивные образцы крови пациентов, то проводили их исследование на наличие молекулярных маркеров ВГВ и ВГС. Для данных

маркеров негативное окно минимальное и составляет 15-30 дней для ДНК ВГВ, 11-15 дней – для РНК ВГС. В случае регистрации положительного результата рассчитывалась скорректированная дата вероятного инфицирования: дата взятия образца крови пациента, в котором впервые был получен положительный сигнал, минус 30 дней.

Далее, на втором этапе расследования, проводился поиск вероятного источника инфекции. Анализировали трансфузионный анамнез реципиента в период от ДВИ до даты ДПВ. Подбирали данные о компонентах, перелитых реципиенту за этот период, составляли список доноров, от которых были заготовлены данные компоненты, проверяли, были ли от этих доноров последующие донации с отрицательными результатами вирусологического скрининга, спустя 90 и более дней, от даты трансфузии, если донор не совершал последующих донаций крови и ее компонентов, то его вызывали для прохождения обследования.

Образцы донорской крови исследовали на панель маркеров того вируса гепатита, который был выявлен у реципиента. ПЦР-исследование проводили в индивидуальной постановке. Материалом для исследований служили архивные образцы от данной и последующих донаций; плазма донора, находящаяся на карантинном хранении, а также образцы крови доноров, вызванных с целью обследования. Учитывали результаты лабораторного тестирования последующих донаций и проводили анализ данных находящихся в лабораторной информационной системе.

За 33 месяца исследования (на 1.05.2016) было зарегистрировано 6 случаев первичного выявления маркеров ВГВ и 2 случая первичного выявления ВГС, 4 из них, выявленные после ноября 2013 г., было расследовано (2 – первичного выявления маркеров ВГВ и 2 – ВГС в образцах крови пациентов, негативных по всем маркерам этих вирусов при предыдущих исследованиях).

В первом случае 14 ноября 2013 г. был выявлен HBsAg у ранее неинфицированного ВГВ больного 32 лет с диагнозом острый миелоидный лейкоз

(М4-вариант), диагностированный в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в мае 2013 г. Первоначально определенная дата вероятного инфицирования – 14 августа 2013 г, была подвергнута корректировке после исследования на наличие ДНК ВГВ доступных архивных образцов плазмы данного пациента, поступивших в лабораторию для ПЦР-исследования. Было показано, что ДНК ВГВ имела место уже 16 октября 2013 г. в концентрации $4,1 \times 10^3$ МЕ/мл. после получения результатов исследования дата вероятного инфицирования была определена 16 июля 2013 г. (таблица 18).

В дальнейшем у данного пациента при количественном определении ДНК ВГВ отмечалось повышение концентрации до $4,6 \times 10^6$ МЕ/мл. В образце крови, в котором впервые был выявлен HBsAg, помимо этого антигена ВГВ, присутствовал еще и HBeAg, который свидетельствовал об активной репликации вируса. Через три месяца в крови у этого пациента появились анти-HBc суммарные и IgM, что является характерным для классического течения вирусного гепатита В.

Данному пациенту в период вероятного инфицирования были проведены трансфузии эритроцитной массы и концентратов тромбоцитов от 23 доноров. Поскольку рутинное исследование образцов крови доноров на тот момент включало лишь определение регламентированного HBsAg, было проведено исследование на наличие ДНК ВГВ и анти-HBc доступных архивных образцов плазмы доноров ($n=16$) от соответствующих донаций и получены отрицательные результаты. Четыре донора пришли на последующую донацию, образцы их крови были тестированы на наличие HBsAg, анти-HBc, ДНК ВГВ и также получены отрицательные результаты. Еще три донора, у кого не было последующих донаций, и чьи архивные образцы были недоступны, были вызваны в отдел заготовки компонентов крови, но отказались от обследования. Таким образом, эпидемиологическое расследование в данном случае не было завершено, поэтому не представилось возможным исключить трансфузионный путь инфицирования.

Таблица 18. Данные вирусологических исследований пациента 1

Дата	31.05. 2013	19.08. 2013	03.09.2013 Архивный образец	16.10.2013 Архивный образец	14.11.2013 Первичное выявление	19.11. 2013	16.12. 2013	21.01. 2014
ДНК ВГВ	-	отр	отр	$4,1 \times 10^3$	-	$4,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$	$5,6 \times 10^3$
HBsAg	отр	отр	отр	пол	пол	пол		пол
анти-HBs	отр	-	-	-	отр	отр	отр	отр
анти-HBc	отр	-	-	-	отр	отр	отр	пол
анти- HBc-IgM	-	-	отр	отр	отр	отр	отр	пол
HBeAg	-	-	отр	отр	пол	пол	пол	пол
анти-HBe	отр	-	-	-	отр	отр	отр	отр

У второго пациента 66 лет; находящегося в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с диагнозом - В-хронический лимфолейкоз, мезангиокапиллярный гломерулонефрит; первично HBsAg был выявлен 27.01.2015. Исследование архивных образцов крови данного пациента не привели к корректировке даты вероятного инфицирования, поскольку результат исследования на ДНК ВГВ оказался отрицательным (таблица 19).

Согласно разработанному порядку проведения расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования вирусами гепатитов В и С, была установлена дата вероятного инфицирования ВГВ - 27 октября 2014 г. Данному пациенту, согласно трансфузиологическому анамнезу, была произведена единственная трансфузия концентрата тромбоцитов 22 ноября 2014 г. от донора, который четыре раза сдавал кровь в последующем, последний раз 26 января 2015 г., был планово обследован на наличие HBsAg, анти-HBc и ДНК ВГВ, и получены

отрицательные результаты лабораторных исследований. Следовательно, трансфузионный путь инфицирования в данном случае был исключен.

Таблица 19. Данные вирусологических исследований пациента 2

Дата	21.01.2014 Архивный образец	07.02. 2014	14.08. 2014	27.01.2015 Первичное выявление	03.02. 2015	26.02. 2015	21.04. 2015
ДНК ВГВ	отр	отр к/м	-	-	>1х10 ^{в8}	>1х10 ^{в8}	>1х10 ^{в8}
HBsAg	-	отр	отр	пол	пол	пол	пол
анти-HBs	-	-	-	-	отр	отр	отр
анти-HBc	отр	-	-	-	пол	пол	пол
анти-HBc- IgM	-	-	-	-	пол	-	пол
HBeAg	-	-	-	-	пол	-	пол
анти-HBe	-	-	-	-	отр	отр	отр

Следующие два случая связаны с первичным выявлением маркеров ВГС у ранее неинфицированных пациентов.

У третьего пациента 23 лет с диагнозом апластическая анемия 3 апреля 2014 г. была обнаружена РНК ВГС в концентрации более 10⁸ МЕ/мл, в то время, как при обследовании 27 февраля 2014 г. маркеры ВГС у него отсутствовали (таблица 20). Установлена дата вероятного инфицирования, что позволило рассчитать период для поиска доноров – с 4 января 2014 г. по 4 апреля 2014 г. В указанный период времени пациенту проведено 12 трансфузий, из них: 8 трансфузий концентратов тромбоцитов и 4 дозы эритроцитной массы. Поскольку в тот период времени донорская кровь не была исследована на наличие молекулярных вирусных маркеров, для расследования источника инфицирования был проведен анализ архивных образцов от выполненных 12 донаций. Все образцы были

исследованы в индивидуальной постановке и РНК ВГС не выявлена. Проведенное расследование позволило исключить трансфузионный путь инфицирования.

Таблица 20. Данные вирусологических исследований пациента 3

Дата	27.02.2014	03.04.2014 Первичное выявление	16.04.2014	28.05.2014	30.06.2014	08.09.2014
РНК ВГС	отр	пол $>10^8$ (генотип 1b)	пол $>10^8$ (генотип 1b)	пол $4,2 \times 10^6$ (генотип 1b)	пол 7×10^6 (генотип 1b)	-
анти-ВГС	отр	-	отр	отр	-	пол
анти-ВГС core	-	-	-	-	-	пол
анти-ВГС NS3	-	-	-	-	-	пол
анти-ВГС NS4	-	-	-	-	-	пол
анти-ВГС NS5	-	-	-	-	-	пол

У четвертого пациента 20 лет с диагнозом острый промиелоцитарный лейкоз, установленным в декабре 2013 г., 6 марта 2015 г. была обнаружена РНК ВГС в концентрации $5,4 \times 10^6$ МЕ/мл. При этом, анти-ВГС отсутствовали (таблица 21). Через 18 дней при повторном обследовании были выявлены антитела к вирусным белкам, что не является характерным для классического течения острого вирусного гепатита С. У данного пациента были доступны архивные образцы плазмы крови, ранее поступившие в лабораторию для ПЦР-исследования. В результате молекулярного исследования архивных образцов РНК ВГС выявлена в образце крови 3 декабря 2013 г. Была скорректирована дата вероятного инфицирования - 3 сентября 2013 г. До этого момента пациенту было проведено 5 трансфузий. У трех доноров были повторные донации с отрицательными результатами исследования образцов их крови на наличие анти-

ВГС и РНК ВГС в период с марта по октябрь 2014 г. Два из пяти доноров отказались от повторного контрольного обследования. В данном случае расследование не закончено, поэтому не представляется возможным исключить вероятность трансфузионного инфицирования.

Таблица 21. Данные вирусологических исследований пациента 4

Дата	20.1 1.20 13	03.12.2013 Архивный образец	05.02.2014 Архивный образец	20.02.2015 Архивный образец	27.02.2015 Архивный образец	06.03.2015 Первичное выявление	24.03.20 15
РНК ВГС	отр	334	550	$6,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$5,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$
анти-ВГС	отр	-	-	отр	-	отр	пол
анти-ВГС Core	-	-	-	-	-	-	отр
анти-ВГС NS3	-	-	-	-	-	-	пол
анти-ВГС NS4	-	-	-	-	-	-	отр
анти-ВГС NS5	-	-	-	-	-	-	отр

Таким образом, в двух случаях трансфузионный путь инфицирования был исключен. Еще в двух случаях трансфузионный путь инфицирования исключить не удалось, в связи с тем, что доноры отказались от контрольного обследования. В ходе данного наблюдения, наиболее информативным материалом для проведения эпидемиологического расследования оказались результаты повторного обследования доноров и архивные образцы крови пациентов центра, поступавшие

в лабораторию для других исследований. Архивный материал от доноров являлся неинформативным, поскольку не позволил установить причину инфицирования пациентов, что, вероятно, обусловлено как повышением качества лабораторных исследований, так и дополнительным обследованием доноров на наличие анти-НВс и молекулярных маркеров ВГВ и ВГС.

Кроме того, в процессе проведения эпидемиологических расследований и регистрации случаев впервые обнаруженных лабораторных маркеров ВГВ и ВГС у ранее обследованных пациентов, выяснилось, что нет первичной достаточной информации вирусологического обследования пациентов при поступлении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Согласно нормативным документам, поступающие в гематологический стационар больные были обследованы на наличие HBsAg и анти-ВГС. В тоже время, анализ результатов обследования на анти-НВс пациентов центра показал, что 2016 г. из 3548 проб от поступивших в стационар лиц, на исследование анти-НВс был направлен только 1131 образец (31,9%), причем в 233 из них (20,6%) были выявлены анти-НВс.

По результатам проведенных эпидемиологических расследований были разработаны и внедрены в практику ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России стандартная операционная процедура и карта расследования случая вероятного трансфузионного инфицирования ВГВ или ВГС пациентов (приложение 3), которая заполняется по результатам эпидемиологического расследования. Кроме того, в связи с недостаточностью информации, получаемой только по результатам стандартного скрининга, был разработан и внедрен в практику протокол обследования пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России на инфекционные маркеры, приведенный ниже.

Протокол обследования образцов крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России на инфекционные маркеры (ВИЧ, ВГВ, ВГС, возбудителя сифилиса)

1. Необходимо проводить обследование всех пациентов при поступлении в стационар на наличие анти-НВс и анти-НВs в дополнение к регламентированным маркерам (анти-ВИЧ, НВsAg, анти-ВГС, ДНКВГВ, РНК ВГС, серологические реакции на сифилис).
2. В случае обнаружения НВsAg - дополнительное исследование НВeAg, анти-НВе.
3. В случае обнаружения анти-НВс – дополнительное исследование анти-НВс IgM.
4. В спорных случаях – исследование анти-НВе для подтверждения инфицированности ВГВ.
5. Обследование на наличие НВsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС проводится ежемесячно для реципиентов крови и ее компонентов, органов и тканей, пациентов отделений гемодиализа и гематологии, пребывающих в медицинской организации более 1 месяца (согласно нормативным документам – санитарным правилам).
6. Остальные контингенты пациентов вне зависимости от результатов тестирования при поступлении обследуются на инфекционные маркеры только по клиническим показаниям.

Обсуждение

Для заражения реципиента возбудителями вирусных заболеваний необходимо сочетание ряда факторов, таких как, наличие инфекционного агента в крови донора в момент осуществления донации крови и ее компонентов, невозможность выявить его имеющимися в настоящий момент в арсенале лаборатории способами и сохранение его жизнеспособности в условиях получения и производства компонентов и препаратов крови.

Существенной частью комплекса мер по обеспечению вирусной безопасности переливания крови является ее лабораторный компонент, то есть качество и адекватность исследования образцов крови доноров на содержание вирусных патогенов.

Методы лабораторного выявления вирусных агентов непрерывно совершенствуются. В 1970-ые гг. HBsAg тестировали с помощью встречного иммуноэлектрофореза с чувствительностью метода – 1000 нг/мл. В 1987 г. чувствительность реакции пассивной гемагглютинации, рекомендованной для обследования доноров на HBsAg, составляла уже 5-20 нг/мл. Через несколько лет Служба крови перешла на тестирование HBsAg с помощью иммуноферментного метода с чувствительностью 0,01-1 нг/мл [15]. Молекулярные методы (ПЦР), обязательные в странах Евросоюза с 1999 г. при обследовании доноров на ВГВ-, ВГС-, и ВИЧ-инфекцию, позволяют выявлять единичные вирусные геномы [6].

В Российской Федерации, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии, заболеваемость острым формами вирусных гепатитов В и С в последнее десятилетие снизилась до 1,27 и 1,55 на 100 тыс. населения, соответственно. В то же время, заболеваемость хроническими формами вирусных гепатитов В и С сохраняется на высоком уровне – 11,26 и 39,94 на 100 тыс. населения, соответственно. Следовательно, циркуляция этих вирусных агентов в

популяции имеет место и не исключена возможность попадания инфицированных лиц в когорту доноров и заготовки потенциально опасных компонентов крови. Этим объясняется высокая частота встречаемости маркеров ВГВ и ВГС среди пациентов, получающих множественные гемотрансфузии.

В 2005 г. было показано, что каждый 4-5-й пациент ФГБУ ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России инфицирован ВГВ или ВГС уже перед поступлением в гематологический стационар [56]. С 2003 по 2016 гг. частота встречаемости HBsAg и анти-ВГС у больных заболеваниями системы крови статистически достоверно снизилась с 5,0% до 2,8% ($\chi^2=29,56$, $p<0,00001$) и с 19,8% до 9,8% ($\chi^2=183,23$, $p<0,00001$), соответственно. Трансфузионный путь инфицирования ВГВ и ВГС является ведущим у больных заболеваниями системы крови [11]. Наблюдается корреляция между выявленным снижением частоты обнаружения HBsAg и анти-ВГС в образцах крови пациентов гематологического стационара как с относительной превалентностью этих показателей в донорской популяции, так и в целом среди населения Российской Федерации. Закономерно, что частота встречаемости декретированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за последние 18 лет так же статистически значимо снизилась с 0,38% до 0,06% ($\chi^2=28,81$, $p<0,00001$) и с 0,71% до 0,21% ($\chi^2=35,23$, $p<0,00001$), соответственно. Аналогичные данные приводят и коллеги по Северо-Западному федеральному округу Российской Федерации. В этом регионе частота выявления HBsAg и антител к белкам вируса гепатита С снизилась с 2013 по 2014 гг. с 0,21% до 0,15% и с 0,5% до 0,49%, соответственно [28]. Исследования, проведенные в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», показывают, что частота встречаемости маркеров гемотрансмиссивных инфекций у обследованных в институте доноров и лиц, впервые обратившихся для дачи крови, за последние 15 лет в целом имеет тенденцию к снижению [7]. В тоже время, в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России HBsAg и анти-ВГС в 40 раз чаще выявлены в образцах крови пациентов по сравнению с донорскими пробами (2,8% и 0,06%;

9,8% и 0,21%, соответственно). Данный факт свидетельствуют о существующей трансфузионной передаче вирусов гепатитов В и С.

Клиническое значение латентной ВГВ-инфекции определяется тремя ключевыми моментами: 1) передача вируса в основном происходит при переливании крови и трансплантации печени с последующим развитием острого гепатита В у реципиента; 2) возможна реактивация вирусного гепатита В на фоне иммуносупрессии; 3) латентная ВГВ-инфекция, способствуя прогрессированию хронических заболеваний печени другой этиологии, играет определённую роль в гепатоканцерогенезе.

После переливания компонентов крови, заготовленных от лиц с ЛГВ, у реципиентов отмечены случаи развития клинической картины гепатита [78, 124, 210, 212, 359]. В последние 20 лет риск инфицирования ВГВ при переливании компонентов крови резко сократился в связи с повышением чувствительности и специфичности диагностических тестов. Посттрансфузионный гепатит В в настоящее время – редкость в Европе и Америке [327]. Трансфузионная передача ВГВ возможна, если в условиях стандартного обследования доноров крови будут недовыявлены следующие лица:

- Донор в начале острой фазы инфекции - период «серонегативного окна» (HBsAg-отрицательный). Количество таких доноров крови сокращается за счет массовой вакцинации [78].
- Донор – «носитель» дикого типа вируса, репликация и экспрессия генов которого подавлены. Латентная форма ВГВ-инфекции характеризуется периодами переменной виремии, когда вирусная ДНК может не обнаруживаться в сыворотке крови [138, 210, 226]. Таким образом, инфекционность таких лиц колеблется с течением времени. Тем не менее, того небольшого количества вируса, которое содержится в сыворотке крови донора с ЛГВ, достаточно для развития острого гепатита В у реципиента. Доноры, в крови которых содержатся ВГВ ДНК и анти-HBs, но нет анти-HBs, представляют большую инфекционную опасность, чем те, которые имеют и анти-HBs [78]. В эксперименте на шимпанзе показано, что

минимальная 50% инфекционная доза ВГВ составляет примерно десять копий [242], но для людей это не установлено [78]. Последние оценки случаев передач ВГВ от доноров с латентной формой инфекции показали, что одна 50%-ая инфекционная доза содержит 1000 вирусных частиц [79]. Вероятность развития острого гепатита зависит от ряда факторов, таких как, вирусная нагрузка, количество перелитой плазмы, иммунокомпетентность реципиента, серологический ВГВ-статус (наличие/отсутствие анти-НВс и/или анти-НВs) как донора, так и реципиента. Прием отсутствия развития острого вирусного гепатита В у реципиента не исключает передачи вируса.

- Донор, инфицированный мутантными штаммами ВГВ, репликативно компетентными, но производящими аномальные поверхностные белки, которые не выявляются в коммерчески доступных скрининговых наборах реагентов. В связи с чем, группой экспертов было рекомендовано для обнаружения HBsAg у доноров крови использование наборов на основе поливалентных антител к HBsAg [325].

Введение ПЦР-тестирования на ДНК ВГВ крови доноров, показало, что во всем мире этот маркер обнаруживается лишь у небольшой части HBsAg-негативных доноров. Хотя данные не являются однородными (среди первичных или повторных доноров крови, или населения в целом), обнаружение ДНК вируса при отсутствии HBsAg зависит от распространенности инфекции в различных географических районах. Кроме того, лица с ЛГВ и лица, инфицированные мутантными вариантами вирусами, могут быть выявлены благодаря анти-НВс-тестированию (примерно 50% из которых также положительны по анти-НВs). В редких случаях у невакцинированных доноров анти-НВs присутствуют без анти-НВс [77, 359].

Постепенное и повсеместное внедрение в скрининг донорской крови методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, ставит перед трансфузиологической службой новые задачи и новые вопросы. Согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 14 сентября 2001 г.

№364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов» (в редакции Приказов Минздравсоцразвития РФ от 16.04.2008 № 175н, от 06.06.2008 № 261н), донорская кровь апробируется только на наличие следующих инфекционных маркеров: анти-ВИЧ 1 и 2, анти-ВГС, HBsAg и антител к возбудителю сифилиса [48]. Кровь доноров плазмы, предназначенная для фракционирования, согласно этому же приказу, подвергается обязательному тестированию на все те же вышеперечисленные маркеры. Однако, в отличие от доноров крови, «образцы плазмы с отрицательными результатами ИФА-тестов объединяют в минипулы и подвергают исследованию на наличие нуклеиновых кислот вирусов иммунодефицита человека, гепатитов В и С». С 2013 г. введено обязательное обследование доноров крови и ее компонентов только на наличие РНК ВГС [52]. Следовательно, применение молекулярных методов в полном объеме регламентировано только для доноров плазмы для фракционирования. Обследование доноров на наличие нуклеиновых кислот вирусов представляет особую актуальность при заготовке компонентов крови с коротким сроком годности, без возможности карантинизации и эффективной инаktivации вирусных агентов. Введение исследования нуклеиновой кислоты ВГВ с помощью ПЦР в развитых странах позволило снизить риск трансфузионной передачи вируса на три порядка [290]. Метод ПЦР является абсолютно специфичным и наиболее чувствительным из существующих сегодня. Этот метод позволяет обходить трудности, связанные с фено- и генотипическими вариациями исследуемых вирусов [71].

При оценке значимости введения обязательного тестирования крови доноров методом ПЦР было показано, что его использование позволило осуществить дополнительную выбраковку опасных компонентов крови: в 2% в отношении ВГВ-инфекции и в 0,2% - ВГС. В данном исследовании, оценивая возможность недовыявления инфицированных ВГВ и ВГС образцов крови, при тестировании молекулярных маркеров этих вирусов в пулах из 6 и более образцов было показано, что разведение образцов даже в 12 раз не влияло на выявление

РНК ВГС, но приводило к пропуску ДНК ВГВ в 5 из 12 случаев (41,7%). Определено, что низкие значения концентрации ДНК ВГВ встречаются у 2/3 обследованных доноров, причем в 1/5 части образцов крови доноров концентрация этого маркера находилась на пороговом уровне чувствительности используемого диагностикума – менее $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл. В отношении РНК ВГС отмечена противоположная закономерность – 3/4 количественно охарактеризованных образцов крови доноров имели высокие значения концентрации РНК ВГС. Полученные данные свидетельствуют, что разведение в шесть и более раз при скрининговом исследовании РНК ВГС не привело к недовыявлению образцов плазмы доноров, содержащих этот маркер, поскольку большая часть образцов имела высокую вирусную нагрузку. В тоже время, при тестировании ДНК ВГВ в формате минипулов в 40% случаев получены ложноотрицательные результаты, что обусловлено характерными для ВГВ низкими уровнями вирусной нагрузки.

Современная эпидемиологическая ситуация свидетельствует о широком распространении латентной формы вирусного гепатита В, которая не диагностируется рутинными методами [4, 310]. Европейская ассоциация по изучению печени (EASL) в 2008 г. сформулировала понятие ЛГВ как наличие ДНК ВГВ в печени (независимо от ее присутствия в сыворотке крови) при отрицательном результате тестирования на наличие HBsAg. При этом приблизительно у 20% лиц с латентной формой гепатита В в образцах сывороток крови отсутствуют серологические маркеры инфицирования ВГВ, в половине определяются анти-HBc – «изолированные» или в сочетании с анти-HBs и в 35% – только анти-HBs [325]. Поэтому, существует мнение, что если не применяют скрининг на анти-HBc образцов крови всех донаций, то существует риск трансфузионной передачи ВГВ [350]. Включение компонента риска передачи ВГВ от донора с латентной формой инфекции в процесс оценки остаточного риска трансфузионного инфицирования является важным, поскольку стало очевидным, что ЛГВ менее доброкачественная, чем первоначально предполагалось. Taïra и

соавт. [364] установили, что случаи тяжелого посттрансфузионного вирусного гепатита В (когда уровень АЛТ составлял более 1000 единиц) были чаще ассоциированы с переливанием компонентов крови, заготовленных от доноров с латентной ВГВ-инфекцией, чем с острой формой заболевания вирусным гепатитом. Авторы также отметили, что, несмотря на сравнительно низкую вирусную нагрузку в компонентах крови, полученных от доноров с латентной ВГВ-инфекцией, у реципиентов развивался тяжёлый, клинически выраженный гепатит, причем в трех случаях со смертельным исходом. Другие авторы при ретроспективном исследовании подтвердили, что переливание компонентов крови доноров с латентным гепатитом В может приводить к заражению ВГВ реципиентов [362], хотя, как правило, реже по сравнению с переливанием компонентов крови доноров, находившихся в остром пре-HBsAg периоде заболевания [411].

С целью наиболее полного выявления латентных форм ВГВ-инфекции среди доноров крови ее компонентов разработан и утвержден в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России приказом №61 от 3 апреля 2014 г. новый порядок обследования донорской крови и выбраковки компонентов, включающий дополнительное тестирование образцов от всех донаций крови и ее компонентов на наличие анти-HBc. После введения нового порядка обследования доноров в перспективном исследовании 26113 образцов крови доноров было выявлено 20 проб, положительных по HBsAg. Встречаемость HBsAg в образцах крови доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (0,1%) сопоставима с данными других авторов, изучавших этот маркер в популяции доноров Москвы и других регионов Российской Федерации [6,53]. При исследовании серонегативных образцов крови ДНК ВГВ была выявлена в одном случае, причем позже у донора развилась клинически выраженная форма вирусного гепатита В. Ранее ПЦР-тестирование образцов крови доноров позволило дополнительно выявить инфицированных ВГВ и ВГС лиц (0,04% и 0,08 %, соответственно), причем при обследовании меньшего числа доноров (около 6 000). Ранее обнаруженные позитивные образцы крови доноров содержали низкие концентрации ДНК ВГВ

(менее $1,5 \times 10^2$ МЕ/мл) и были положительны при исследовании на наличие анти-НВс. Следовательно, при использовании нового порядка обследования доноров крови, эти компоненты крови были бы забракованы уже по результатам серологических исследований.

Значение скринингового тестирования образцов крови доноров на наличие анти-НВс в выявлении лиц с ЛГВ и низкой вирусной нагрузкой очевидно [189, 290, 360], но некоторые авторы [229] полагают, что отвод доноров, в крови которых обнаружены эти антитела, приведет к необоснованной потере большого числа доноров, в то числе и за счет неспецифической реактивности. Результаты исследования, проведенного в институте Paul Ehrlich [120], показали, что из 18 доказанных случаев трансфузионной передачи ВГВ, как минимум, 7 были бы предотвращены благодаря тестированию на наличие анти-НВс. В работе Niederhauser С. [290] установлено, что обследование доноров на наличие анти-НВс позволяет выявить большинство случаев ЛГВ, хотя неэффективно при первичном остром вирусном гепатите В и в редких случаях, когда инфекция вызвана мутантными штаммами вируса, ассоциированными с появлением только анти-НВс. Австралийские ученые, Kiely Р. с соавт. [290], по результатам обследования 756 915 доноров зафиксировали, что значительно чаще встречаются лица с латентным течением гепатита, чем лица, которые находятся в ранней стадии ВГВ-инфекции – негативного окна (42 случая против 8). Они тоже отмечают важность исследования на наличие анти-НВс в выявлении ЛГВ, поскольку вирусная нагрузка при этой форме вирусного гепатита В периодически снижается ниже детектируемого уровня.

В проспективном исследовании анти-НВс определены в 621 из 26113 (2,4%) исследованных образцов, причем в 592 случаях антитела к ядерному антигену вируса гепатита В были единственным свидетельством наличия ВГВ-инфекции у доноров. В 38 из 495 (7,7%) анти-НВс положительных образцов крови доноров выявлен маркер активной ВГВ инфекции – анти-НВс-IgM, причем в 7 случаях из 38 (18%) эти антитела также были единственным маркером активной формы ВГВ-

инфекции, при отрицательных результатах тестирования на наличие HBsAg, антител к этому антигену и ДНК ВГВ. Отмечено, что анти-HBc-IgM были выявлены с одинаковой частотой, как в образцах донорской крови с высоким титром анти-HBs, так и в пробах, не содержащих анти-HBs (7,8% и 6,9%, $p>0,05$). Полученные данные позволили предположить потенциальную вирусную опасность компонентов крови доноров, в которых обнаруживаются анти-HBc-IgM, даже при условии наличия высокого титра анти-HBs. Использование приведенного в литературе алгоритма [54, 197] и допуск анти-HBc/анти-HBs позитивных компонентов крови к клиническому применению небезопасны.

Ранее было показано, что доля доноров, в крови которых циркулировали анти-HBc в отсутствии HBsAg, в 2005 г. составляла 13,4% [55]. В настоящем исследовании частота обнаружения анти-HBc в образцах крови первичных доноров не имела статистически значимых различий и составляла от 2,6% до 7,8% (медиана 5,1%), что в 3 раза меньше значений 2005 г. Этот факт является следствием качественного отбора доноров, а, также результатом вакцинации, поскольку почти половина доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (47% – в 2015 г. и 48% – в 2016 г.) – это молодые люди, которые рождены после 1988 г. и вакцинированы против вирусного гепатита В в возрасте 13 лет. Можно предположить, что в ближайшие годы встречаемость анти-HBc в образцах крови доноров крови и ее компонентов будет снижаться, поскольку в 2016 г. достигли 18-летнего возраста и смогли сдавать кровь лица, вакцинированные при рождении, так как в 1998 г. в календарь профилактических прививок включена вакцинация новорожденных против вирусного гепатита В [27].

При исследовании в период с апреля 2014 г. по апрель 2016 г. отмечено статистически значимое снижение частоты выявления анти-HBc в образцах крови повторных доноров с 59 случаев до 1, что соответствует 8,5% и 0,1%, соответственно. Данная динамика объясняется тем, что были выявлены и отстранены от донорства лица с анти-HBc-положительными результатами тестирования, причем это не повлияло на общее число донаций повторных

доноров крови и ее компонентов, количество которых за время наблюдения значимо не менялось (от 483 до 971 в месяц, медиана – 693). Таким образом, в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России удалось сформировать когорту регулярных добровольных доноров крови и ее компонентов, не имеющих анти-НВс, без потери числа донаций.

В 6 образцах крови повторных доноров обнаружено появление анти-НВс, у ранее обследованных лиц (6 из 26113 кроводач, 0,02%). В трех случаях неспецифическая реактивность при лабораторном исследовании не была исключена. В двух – подтверждено наличие ВГВ-инфекции у доноров, поскольку были выявлены и другие маркеры вируса, в том числе ДНК. У одного донора, кроме наличия антител к ядерному антигену вируса гепатита В, обнаружена ВИЧ-инфекция. Однако в результате данного исследования не представилось возможным проследить отдаленные последствия, связанные с трансфузиями потенциально инфицированных компонентов крови, поскольку не были доступны последующие образцы крови реципиентов. В виду того, что согласно данным литературы, при заражении малыми дозами вирусных частиц чаще происходит формирование клинически бессимптомной формы ВГВ-инфекции и, учитывая, что иммуносупрессия у больных с заболеваниями системы крови может существенно удлинять и видоизменять иммунный ответ, не всегда представляется возможным выявить факт инфицирования ВГВ рутинными методами лабораторного обследования.

Благодаря исследованию на анти-НВс 598 компонентов крови доноров, содержащих только эти антитела, были не допущены для клинического применения и, следовательно, предотвращена потенциальная угроза заражения реципиентов вирусом гепатита В от донора, возможно, имеющего латентную форму вирусного гепатита В.

Allain с соавт. [79] используют следующий подход для адекватного расчета остаточного риска трансфузионного инфицирования – при оценке «фоновых» уровней инфицированности ВГВ будущих реципиентов компонентов крови

исключают лиц с признаками текущей или прошлой инфекции. Это лучше всего достигается путем предтрансфузионного тестирования – выявления HBsAg и анти-HBc в образцах крови потенциальных получателей. Однако применяемые при заболеваниях системы крови полихимиотерапия и гормонотерапия приводят к глубокой иммуносупрессии. На фоне угнетения гуморального и клеточного иммунитета нарушается жизненный цикл вирусов в организме больного, что может приводить к появлению или реактивации латентных форм инфекций или мутациям вируса, при которых не выявляются общепринятые серологические маркеры, а обнаруживаются только нуклеиновые кислоты ВГВ и ВГС. Согласно современным представлениям, у HBsAg-негативных пациентов, имеющих в серологическом профиле сочетанное наличие анти-HBc и анти- HBs - или только анти-HBs, наблюдается латентная форма вирусного гепатита В [325]. В образцах крови больных заболеваниями системы крови, в которых присутствовал HBsAg, в 92,6% случаев были обнаружены анти-HBc, а в 40,7% – серологические маркеры активной репликации ВГВ (HBeAg и/или анти-HBc IgM), при этом все они содержали ДНК ВГВ. При исследовании проб, отрицательных по HBsAg, установлено, что у 45,8% пациентов найдены изолированные анти-HBs и у 40,3% – изолированные анти-HBc или анти-HBc в сочетании с анти—HBs и/или анти-HBe. ДНК ВГВ обнаружена в 18% образцов, при этом во всех из них определялось сочетанное наличие анти-HBc и анти-HBs – или только анти-HBs [58]. Суммарная частота обнаружения серологических маркеров ВГВ и ВГС при первичном скрининге при поступлении в стационар в период с 2006 по 2007 гг. колебалась в разных группах пациентов от 51,6% до 73,7%; при этом статистически достоверных различий между группами найдено не было. Аналогичные данные приводят Kawatani с соавт. [231], не наблюдавшие статистической разницы в частоте индикации ВГВ и ВГС-инфекций у гематологических больных до начала терапии в зависимости от диагноза. Значимых различий в суммарной частоте обнаружения молекулярных маркеров ВГВ и ВГС (ДНК ВГВ и РНК ВГС) в образцах крови больных с различными

нозологическими формами заболеваний системы крови не было выявлено ($p>0,05$) [57].

В целом, частота обнаружения серологических и молекулярных маркеров ВГВ и ВГС у пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России при первичном скрининге образцов крови остается на высоком уровне: 52% -74% и 13% - 26%, соответственно; при этом только у 16,3% лиц не обнаружен ни один маркер ВГВ, в то время как больные гемофилией инфицированы ВГС в 100%.

Серологические и молекулярные методы, позволяющие выявить инфекционные маркеры, не являются альтернативными, они дополняют друг друга [62]. Методы детекции нуклеиновых кислот относятся к прямым методам, в которых происходит непосредственное определение геномов вирусов. Эти методы позволяют выявить наличие инфекции в ранние сроки, обладают высокой чувствительностью и специфичностью. Однако при хроническом течении заболевания концентрация вирусных нуклеиновых кислот в крови может быть ниже чувствительности используемых наборов реагентов. В этом случае будет получен отрицательный результат исследования на наличие ВГВ- или ВГС-инфекции. В данной ситуации использование методов, выявляющих белковые мишени, позволит определить наличие заболевания. Вирусные продукты белковой природы присутствуют в крови инфицированных лиц дольше, чем вирусные нуклеиновые кислоты. Противовирусные антитела, синтезирующиеся клетками иммунной системы в ответ на вирусную инфекцию, появляются через несколько недель после заражения и могут сохраняться на протяжении всей жизни в детектируемых концентрациях.

Было показано, что рутинная скрининг-диагностика вирусных гепатитов В и С у иммунокомпрометированных больных при наличии факторов высокого риска внутрибольничного инфицирования вирусными инфекциями, передающимися с кровью, однократно при только при поступлении в стационар недостаточна [11]. На фоне иммуносупрессивной терапии перестают выявляться антитела к HBsAg. В

двух независимых исследованиях показано, что после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов происходила повторная сероконверсия HBsAg, хотя клинически выраженный острый гепатит развивался редко [297, 386], поэтому большинство таких случаев могло быть пропущено. Следовательно, с целью выявления латентных форм заболевания, обследование таких больных при поступлении в стационар и перед началом химио- и гормонотерапии должно включать кроме обследования на наличие HBsAg, анти-ВГС, молекулярных маркеров ВГВ и ВГС, и исследование анти-HBc и анти-HBs. Был разработан протокол обследования образцов крови пациентов на инфекционные маркеры, внедренный в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Актуальность дополнительного обследования образцов крови пациентов ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России на инфекционные маркеры обусловлена следующим:

1. Согласно Постановлению Правительства РФ от 1.12.2004 г. №715 (в ред. Постановления Правительства РФ от 13.07.2012 №710) болезнь, вызванная ВИЧ, гепатит В, гепатит С и инфекции, передающиеся преимущественно половым путем, внесены в перечень социально значимых заболеваний, представляющих опасность для окружающих.

2. Согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.3112-13 «Профилактика вирусного гепатита С» обязательному обследованию на наличие анти-ВГС и РНК вируса через 30 дней после поступления и далее – ежемесячно подлежат пациенты отделений гематологии, трансплантации, гемодиализа, пребывающие в медицинской организации более 1 месяца. Кроме того, реципиенты крови и ее компонентов, органов и тканей подлежат обязательному обследованию на наличие анти-ВГС при подозрении на заболевание вирусным гепатитом С и в течение 6 месяцев после трансфузии, пересадки органов и тканей.

3. Согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.1.2341 – 08 «Профилактика вирусного гепатита В» обязательному обследованию на

наличие HBsAg подлежат реципиенты крови и ее компонентов в течение 6 месяцев с момента последней трансфузии.

4. Проведение эпидемиологических исследований в рамках НИР «Создание программы повышения инфекционной безопасности трансфузионной терапии онкогематологических больных» было затруднено, поскольку по результатам скрининговых исследований при поступлении без проведения расширенного тестирования невозможно идентифицировать инфицированность пациентов ВГВ и/или ВГС.

Мониторинг вирусных маркеров у пациентов с заболеваниями системы крови при лечении в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России позволяет выявлять случаи первичного инфицирования ВГВ. В период проведения работы с августа 2013 г. по июнь 2016 г. зафиксировано 6 таких случаев, причем 5 из них произошли до октября 2014 г. Не отмечено закономерности между возникновением первичной ВГВ-инфекции и нозологической формы заболевания у пациентов. В ходе проведенного эпидемиологического исследования двух таких случаев в одном из них трансфузионный путь инфицирования исключить не удалось, поскольку вызов доноров для повторного обследования оказался неэффективным. Из архивного материала наиболее информативными для проведения эпидемиологического исследования оказались образцы крови пациентов, которые поступали в лабораторию для исследования на наличие других вирусных инфекции, в отличие от архивного материала от доноров, который не позволил установить источник инфицирования реципиента. Поэтому из разработанного порядка обследования донорской крови и выбраковки компонентов по результатам лабораторного исследования на инфекционные маркеры была исключена фраза о необходимости архивирования всех ПЦР-отрицательных образцов крови доноров.

Введение в практику рутинного исследования образцов донорской крови на наличие анти-HBc изменило сложившуюся ситуацию. Спустя 6 месяцев после введения нового Протокола обследования доноров крови ее компонентов на

маркеры вирусных инфекций, начиная с октября 2014 г. на момент 01 января 2017 г., что составило 27 месяцев, инфицирование ВГВ зафиксировано только у одного пациента, и проведенное расследование данного случая первичной ВГВ-инфекции не дало подтверждения трансфузионному пути передачи инфекции.

Заключение

Заготовка компонентов крови для реципиентов, находящихся в состоянии иммунодепрессии, в частности для пациентов гематологических стационаров, должна осуществляться с повышенными требованиями, предъявляемыми к вирусной безопасности компонентов крови. Разработанный порядок скрининга донорской крови прошел проверку в условиях гематологического стационара, показавшую, что он эффективно обеспечивает вирусную безопасность трансфузий, поскольку не зафиксировано случаев возможного трансфузионного инфицирования ВГВ реципиентов компонентов крови после его внедрения в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Данный порядок может быть рекомендован в качестве рутинного скрининга в службе крови, поскольку обеспечивает выявление доноров с латентной формой ВГВ-инфекции, что позволяет сэкономить средства и проводить ПЦР-тестирование высокочувствительными наборами реагентов в пулах из 6 проб без риска пропуска образцов с низкими концентрациями ДНК ВГВ. Данные, полученные после введения скрининга на наличие анти-НВс в рутинную практику, показали его диагностическую значимость при первичном обследовании доноров крови и ее компонентов. Сформирована группа повторных доноров крови и ее компонентов, не инфицированных ВГВ, в крови которых отсутствуют анти-НВс.

Создан и апробирован двухэтапный порядок расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования ВГВ и ВГС пациентов, ранее отрицательных по маркерам этих вирусов. Внедрение лабораторной информационной системы позволяет оперативно и достоверно проводить такие расследования.

Разработан алгоритм обследования больных при поступлении в гематологический стационар, включающий исследование на анти-НВс и анти-НВс помимо тестирования на НВsAg, анти-ВГС, ДНК ВГВ, РНК ВГС. Алгоритм позволяет уже при поступлении в лечебное учреждение фиксировать наличие ВГВ- и/или ВГС-инфекции у пациентов. Данная информация важна для оценки

возможности проведения противовирусной терапии или вакцинопрофилактики больным до начала лечения иммуносупрессивными препаратами.

Практические рекомендации

1. С целью повышения вирусной безопасности трансфузий компонентов крови, целесообразно обследовать доноров на наличие анти-НВс, а в случае выявления этих антител – отстранять таких доноров от донорства.
2. Необходимо обследовать на наличие антител к ядерному, поверхностному антигенам и ДНК ВГВ, кроме регламентированного HBsAg, всех поступающих в стационар пациентов для диагностики латентных форм вирусного гепатита В, особенно это актуально для больных, которым планируется проведение химио- и иммуносупрессивной терапии, что может способствовать активации таких форм ВГВ-инфекции.

Выводы

1. Разработаны порядок обследования донорской крови, включающий скрининг на антитела к ядерному антигену ВГВ, и порядок выбраковки компонентов по наличию инфекционных маркеров, эффективно обеспечивающие вирусную безопасность гемотрансфузий.
2. Установлено статистически значимое снижение встречаемости регламентированных маркеров ВГВ и ВГС в образцах крови доноров в период с 1999 по 2016 гг. с 0,38% до 0,06% ($\chi^2=28,81$, $p<0,05$) и с 0,71% до 0,21% ($\chi^2=35,23$, $p<0,05$), соответственно; в образцах крови пациентов гематологического стационара в период 2003 - 2016 гг. с 5,0% до 2,8% ($\chi^2=29,56$, $p<0,00001$) и с 19,8% до 9,8% ($\chi^2=183,23$, $p<0,00001$), соответственно; что обусловлено комплексом мероприятий, проведенных в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.
3. Тестирование на наличие антител к ядерному антигену ВГВ позволило выявить 598 (2,3%) потенциально инфицированных образцов крови доноров, что привело к выбраковке и недопущению до клинического применения заготовленных от данных доноров компонентов крови.
4. Допускать к клиническому применению компонентов крови доноров, содержащих антитела к ядерному антигену ВГВ и в высоком титре антитела к поверхностному антигену ВГВ, небезопасно, поскольку в 8% таких образцов обнаружен маркер острой ВГВ-инфекции.
5. Исследование образцов крови доноров на наличие антител к ядерному антигену ВГВ обеспечивает максимальное выявление лиц с латентной формой ВГВ-инфекции, что позволяет проводить ПЦР-тестирование в пулах из 6 проб без риска пропуска образцов с низкими концентрациями ДНК ВГВ.

6. Двухэтапный порядок проведения расследования случаев вероятного трансфузионного инфицирования вирусами гепатитов В и С пациентов гематологического стационара, ранее отрицательных по маркерам этих вирусов, в рамках функционирования лабораторной информационной системы позволяет эффективно и достоверно проводить расследование, прослеживая пары донор-реципиент.
7. С целью выявления латентных форм заболевания алгоритм обследования больных при поступлении в стационар должен включать помимо тестирования HBsAg, ДНК ВГВ, анти-ВГС, РНК ВГС, обязательное исследование антител к ядерному и поверхностному антигену ВГВ.

Список сокращений

АА – апластическая анемия

АЛТ – аланинаминотрансфераза

Анти-ВГС – антитела к белкам ВГС

Анти-НВс – антитела к ядерному антигену вируса гепатита В

Анти-НВе – антитела к *e* антигену вируса гепатита В

Анти-НВс– антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В

ВГВ – вирус гепатита В

ВГС – вирус гепатита С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр

ДВИ – дата вероятного инфицирования

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДПВ – дата первичного выявления лабораторных маркеров

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХЛА – иммунный хемилюминесцентный анализ

ММ – множественная миелома

ОЛ – острый лейкоз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЛГВ – латентная форма вирусного гепатита В

ЛГС – латентная форма вирусного гепатита С

ФСВОК – Федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

ХМЛ – хронический миелолейкоз

ЦМВ – цитомегаловирус

CD4 – мономерный трансмембранный гликопротеин надсемейства иммуноглобулинов

CD8 – трансмембранный гликопротеин, служащий корецептором Т-клеточных рецепторов

HBeAg – *e* антиген вируса гепатита В

HBsAg – поверхностный антиген вируса гепатита В

UTR (Untranslated Region) - нетранслируемый участок

Список литературы

1. Алан Г.Б. Ву. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам/Г.Б.Ву. Алан. Москва: Лабора, 2013. – 216 с.
2. Апросина, З.Г. История изучения и актуальные аспекты аутоиммунного гепатита/З.Г. Апросина//Клиническая гепатология. – 2009. - № 1. С.3-14.
3. Бабко, А.К. Хемилюминисцентный анализ/А.К. Бабко, Л.И. Дубовенко, Н.М. Луковская. – Киев: Спецлит, 1966. – 251 с.
4. Баженов, А.И. Выявление антител к мутантным формам HBsAg у лиц, иммунизированных против гепатита В вакцинами разных субтипов/Баженов, Д.А. Эльгорт, А.А. Фельдшерова, П.З. Будницкая, Г.И. Никитина, Ю.С. Хац, М.В. Коноплева, М.А. Годков, В.Н. Борисова, Л.В. Ярош, Т.А. Семененко, А.П. Суслов//Эпидемиология и вакцинопрофилактика. -2011. -№5(60). – С.49-53.
5. Баринский, И.Ф. Герпес: этиология, диагностика, лечение / И.Ф. Баринский, А.К. Шубладзе, А. А. Каспаров. - Москва: Медицина, 1986. - 268 с.
6. Белякова, В.В. Совершенствование лабораторного тестирования для обеспечения вирусной безопасности аллогенных гемокомпонентов: дисс.... канд. биол. наук: 14.01.21/ Белякова Вера Владимировна. М., 2014. – 116 с.
7. Бубнова, Л.Н. Гемотрансмиссивные инфекции у первичных и регулярных доноров крови и ее компонентов/ Л.Н. Бубнова, Т.А. Матвеева, М.В. Беркос, А.В. Чечеткин//Трасфузиология. - 2015. - Т.16. - №4. - С.24-32.
8. Вирусные гепатиты и их диагностика в иммуноферментных системах: Метод. рекомендации/Бурков А.Н., Блинова Т.В., Маянский А.Н., Лапшина Г.М. - Н.Новгород., 1998. - 47с.
9. Вирусные гепатиты в Российской Федерации 2010 Справочник. Под ред. Г.Г. Онищенко, А.Б. Жербуна. – Санкт-Петербург: НИИЭМ им. Пастера; 2010. – 204 с.

10. Гаранжа, Т.А. Максимальное освобождение препаратов крови от лейкоцитов повышает вирусную безопасность гемотрансфузий/Т.А. Гаранжа, Н.Г. Ярославцева, Т.А. Туполева// Новое в трансфузиологии, информационный бюллетень. – 2001. - № 27, - с. 50-56.
11. Гармаева, Т.Ц. Вирусные гепатиты В и С у больных заболеваниями системы крови дисс....д-ра мед. наук: 14.01.21/Гармаева Татьяна Цыреновна. – М., 2012. – 233 с.
12. Гармаева, Т.Ц. Клинико-эпидемиологическая характеристика инфицированности вирусами гепатитов В и С больных с заболеваниями системы крови при поступлении в стационар/Т.Ц. Гармаева, С.М. Куликов, Е.А. Михайлова, Т.Ф. Шаматова, Э.Г. Гемджян, Т.А. Туполева, Л.О. Грумбкова, Н.Г. Ярославцева, А.В. Сомова, Ф.П. Филатов, И.С. Февралева, Т.В. Макарик, О.А. Глинщикова, А.Б. Судариков, В.Г. Савченко//Гематология и трансфузиология. – 2009. Т. 54. №1. – с 3-9.
13. Голосова Т.В. Серологические маркеры вирусного гепатита В у гематологических больных/Т.В. Голосова, Е.М. Власихина, И.И. Побединская//Гематология и трансфузиология. - 1997. - №1 - С. 7-10. №1. С. 7-10.
14. Голосова Т.В. организация и стратегия профилактики вирусных инфекций в учреждениях службы крови/Т.В. Голосова, А.В. Сомова, Е.П. Ковалева//Проблемы гематологии и переливания крови. – 1996. №1. с 5-10.
15. Голосова Т.В. Оценка риска передачи вирусных инфекций при гемотрансфузиях//Т.В. Голосова, Т.А. Туполева, А.В. Сомова, Н.Г. Ярославцева, С.Ю. Багрянцева, А.А. Гуляева, Е.И. Овчинникова, Ф.П. Филатов//Вестник службы крови России. – 2000. №2. с. 25-33.
16. ГОСТ Р ИСО 15189-2006. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности. - М.: Стандартинформ, 2007. – 34 с.

17. Губанова М.Н. Расчетный остаточный риск инфицирования при переливании крови//М.Н. Губанова, С.Р. Мадзаев, К.С. Аветисян, А.В. Бахметьев, М.В. Зарубин, А.В. Караваев, Е.А. Ключева, А.В. Коденев, К.В. Кузнецов, А.Р. Максимов, У.С. Султанбаев, Н.Г. Филина, К.В. Хальзов, Л.М. Яковлева, Е.Б. Жибурт// Гематология и трансфузиология. – 2014. - №S1. –с. 89-90.
18. Вирусные и токсические поражения печени у детей больных острым лимфобластным лейкозом, при использовании интенсивных программ химиотерапии/ Гусак Е.Н., Волков В.О., Иванова В.В. и др.//Бактериально-вирусные инфекции. – Саратов. – 1993. –т.43. с. 19-22.
19. Дерябин, П.Г. Гепатит С: современное состояние и перспективы/ П.Г. Дерябин//Вопросы вирусологии. - 2012. - №S1. - С. 91-103.
20. Зиновьева, Л.И. Клинико-иммунологическая характеристика вирусного гепатита В у детей, больных злокачественными новообразованиями кроветворной и лимфоидной ткани и вопросы иммунокорректирующей терапии: автореф. дис.... канд. мед. наук: 14.00.09, 14.00.14/Зиновьева Людмила Ивановна.- М., 1987. -24 с.
21. Ивашкин, В.Т. Диагностика, лечение и ведение пациентов с гепатитом С. Методические рекомендации. По материалам практических рекомендаций Американского общества по изучению заболеваний печени (AASLD)/В.Т. Ивашкин// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. -2006. - Т.8. - №2. - С. 102-129.
22. Инструкция (вкладыш) к набору реагентов HIV Ag/Ab Comb (Architect i1000_i2000) 4J27.
23. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HBV FL» версия от 11.05.2012.

24. Инструкция по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HCV FL» версия от 11.05.2012.
25. Карякин, А.В. Статистика выявления антител к вирусу гепатита С среди доноров крови Российской Федерации/А.А. карякин, Л.А. Терентьева// новое в трансфузиологии. – 2004. №38. – с.29-33.
26. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство в 2-х томах/ Под редакцией В.В. Долгова. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 1 т. – 808 с.
27. Клушкина, В.В. Оценка влияния массовой вакцинации против гепатита В на генетическое разнообразие вируса гепатита В, заболеваемость и неблагоприятные исходы инфекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.02/Клушкина Виталина Владимировна. - М., 2013. – 24 с.
28. Красняков, В.К. Обеспечение безопасности компонентов крови в учреждениях службы крови в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации/ В.К. Красняков, А.В. Чечеткин, В.В. Данильченко, Л.В. Щелкунова, В.Е. Солдатенков, М.Ш. Григорьян//Трансфузиология. - 2015. - Т.16. - №4. - С.4-11.
29. Кузин, С.Н. Проблема диагностического ускользания вируса гепатита В/С.Н. Кузин, Е.И. Самохвалов, Н.Н. Забелин, Е.Н. Кудрявцева, Т.А. Семененко, Л.Е. Кузина, Д.К. Львов// Вопросы вирусологии.- 2013. т.58, - №2. –с. 4-9.
30. Куликов, С.М. Вирусная безопасность гемотрансфузий и методы ее оценки/ С.М. Куликов, Т.Ц. Гармаева, Б.В. Зингерман, Ф.П. Филатов, А.Б. Судариков и др.//Гематология и трансфузиология. - 2008. - №4. – С.3-5.
31. Кюрегян К.К. Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов: автореферат дис.... д-ра биол. наук: 03.02.02/Кюрегян Карен Каренович. – М., 2012. – 48 с.

32. Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Справочник/Под редакцией В.И. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. – М.: БИНОМ, 2013. <http://www.cmd-online.ru/doctors/cat/26468/> - ixzz3pPzMNVSi– 648 с.
33. Лопаткина, Т.Н. Реактивация HBV инфекции у больных с лимфомой/ Т.Н. Лопаткина, Е.В. Волчкова, Д.Т. Абдурахманов, Е.Л. Танащук, Е.А. Арион, Т.М. Игнатова//Медицинский совет. - 2013. - № 5-6. - С. 40-45.
34. Львов, Д.К. Вирусные гепатиты от А до G и далее/Д.К. Львов//Журнал микробиологии. – 1997. - №1. - С.70-77.
35. Львов, Д.К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных/Д.К. Львов. - М.: Медицинское информационное агенство, 2013. - 1200 с.
36. Маджидов, В.М. Особенности течения вирусного гепатита В у больных с сопутствующими заболеваниями леченных глюкокортикостероидами/ В.М. Маджидов, И.И. Шаинский, С.В. Алимов// Клиническая медицина. – 1982. - №2. – с. 78-81.
37. Майер, К.П. Гепатит и последствия гепатита /К.П. Майер. – М., ГЕОТАР, Медицина, 1999. – 720 с.
38. Малашенкова, И.К. Клинические формы хронической Эпштейн-Барр-вирусной инфекции: вопросы диагностики и лечения/И.К. Малашенкова, Н.А. Дидковский, Ж.Ш. Сарсания//Лечащий врач. – 2003. - №9. – с.32-38.
39. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод ПЦР. Основные положения (утв. заместителем председателя Госкомсанэпиднадзора Г.Г. Онищенко 22 июня 1995 г. № 06-19/52-17) [Электронный ресурс] – режим доступа: Система ГАРАНТ, <http://base.garant.ru/#ixzz4P8MuZjI0>.

40 Методические указания МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности» Утверждено Главным Государственным Санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко, 04.03.2004 г., Москва.[Электронный ресурс] Режим доступа: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293851/4293851829.htm>.

41. Михайлов, М.И. Вирусные гепатиты – проблемы изучения [Электронный ресурс], М.И.Михайлов// Гастроэнтерологический портал России. - 2006. – Режим доступа: <http://top100.rambler.ru/top100/>.

42. Никитин, И.Г. Рекомендации по диагностике и подходам к лечению хронического гепатита В/И.Г. Никитин// Фарматека. - 2008. - №2. - С.58-68.

43. Осипов, Д. А. Маркеры вирусных гепатитов В и С у доноров и трансфузионнозависимых больных: дис.... канд. мед. наук: 14.00.29/ Осипов Дмитрий Александрович. - Новосибирск, 2006. - 160 с.

44. Пименов, Н.Н. Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора/ Пименов Н.Н., В.П. Чуланов, С.В. Комарова, И.В. Карандашова, А.Д. Неверов, Г.В. Михайловская, В.А. Долгин, Е.Б. Лебедева, К.В. Пашкина, Г.С. Коршунова// Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. -№3. – с.4-10.

45. Попцов, А.Л. Случай выявления РНК вируса гепатита А в плазме для фракционирования/А.Л. Попцов, И.В. Парамонов// Вестник службы крови России. – 2013. №4. – с.33-35.

46. Постановление от 1 декабря 2004 г. № 715 «Об утверждении перечня социально-значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих» (в редакции Постановлении Правительства РФ от 13.07.2012 № 710) [Электронный ресурс] - Режим доступа: <http://base.garant.ru/12137881/>.

47. Постановление Правительства Российской Федерации от 16 апреля 2012 г. № 291 «О лицензировании медицинской деятельности (за исключением указанной деятельности, осуществляемой медицинскими организациями и другими организациями, входящими в частную систему здравоохранения, на территории инновационного центра «Сколково»)». [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://ivo.garant.ru/#/document/70164724/paragraph/1:2>.
48. Приказ Минздрава РФ от 14.09.2001 г. № 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов» (в редакции Приказов Минсоцразвития РФ от 16.04.2008 № 175н, от 06.06.2008 № 261н). [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.zdrav.ru/library/regulations/detail.php?ID=44797>.
49. Савченко, В.Г. Острые лейкозы и беременность – некоторые постулаты/В.Г. Савченко// Терапевтический архив. – 2009. №7. – с.5-7.
50. Самохвалов, Е.И. Частота встречаемости отдельных субтипов вируса гепатита С в Московском регионе/Е.И. Самохвалов, Л.И. Николаева, Л.И. Альховский, И.Н. Хлопова, В.В. Макашова, Е.В. петрова, Г.В. Сапронов, Н.М. Беляева, Д.К. Львов//Вопросы вирусологии. – 2013. - №1. – с.36-40.
51. Самочатова, Е.В. Этиологическая роль вирусов гепатита В и С в поражении печени у детей с онкогематологическими заболеваниями/ Е.В. Самочатова, М.И. Михайлов, А.А. масчан и др.// Гематология и трансфузиология. – 1996. –т.41. №3. – с.4-14.
52. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3112-13 «Профилактика вирусного гепатита С» Утверждены постановлением Главного Государственного Санитарного врача Российской Федерации от 22.10.2013 № 58 [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/499056593>.

53. Селиванов, Е.А. Современное состояние донорства крови и ее компонентов в Российской Федерации/ Е.А. Селиванов, А.В. Чечеткин, М.Ш. Григорьян, А.Б. Макеев, Л.Г. Воробей//Трансфузиология. – 2012. том 13, №3. – с. 4-14.
54. Скрининг донорской крови на гемотрансмиссионные инфекции. Рекомендации. [Электронный ресурс] – Женева: ВОЗ. – 2010. Режим доступа: <http://www.who.int/bloodsafety/publications/ScreeningblooddonationsRU.pdf>.
55. Сомова, А.В. Частота выявления маркеров ВИЧ и вирусов гепатитов у доноров и в компонентах и в препаратах плазмы (в ИФА и ПЦР)/А.В. Сомова, Т.А. Туполева, Л.О. Грумбкова, Н.Г. Ярославцева, А.А. Гуляева, С.Ю. Багрянцева и др.//Вестник Службы крови России. – 2005. - №2. – с. 28-34.
56. Сомова, А.В. Уровень инфицирования ВИЧ и вирусами гепатитов гематологических больных и медперсонала ГНЦ/ А.В. Сомова, Т.А. Туполева, Л.О. Грумбкова, Н.Г. Ярославцева, А.А. Гуляева, С.Ю. Багрянцева, Т.В. Голосова, Ф.П. Филатов//Новое в трансфузиологии. – 2005. - № 40. – С. 63-73.
57. Сомова, А.В. Серологические и молекулярные маркеры вирусов гепатитов В и С (ВГВ и ВГС) у больных с различной патологией системы крови/ А.В. Сомова, Т.А. Туполева, Е.Н. Игнатова, Т.В. Голосова, Ф.П. Филатов//Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Материалы 14-ой Рос.конференции «Гепатология сегодня» 16-18 марта 2009 г. Москва. – 2009. Приложение №33. - С. 48.
58. Сомова, А.В. Изучение частоты выявления ДНК вируса гепатита В у гематологических больных, позитивных и негативных по HBsAg/А.В. Сомова, Т.А. Туполева, Н.Г. Ярославцева, Е.Н. Игнатова, Т.Ю. Романова, Т.В. Голосова, Ф.П. Филатов //Мир вирусных гепатитов. – 2009. - №3. - С.39.
59. Соринсон, С.Н. Вирусные гепатиты/С.Н.Соринсон. - Санкт-Петербург: Теза, 1997. - 306 с.

60. Тихомиров, Д.С. Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций у гематологических больных: дис.... канд. биол. наук: 14.00.29, 03.00.06/ Тихомиров Дмитрий Сергеевич. – М., 2009. – 142 с.
61. Туполева, Т.А. Имуннодиагностика синдрома приобретенного иммунодефицита в гематологии и трансфузиологии: автореферат дис.... канд. мед. наук: 14.00.29/Туполева Татьяна Алексеевна. – М., 1995, - с. 26.
62. Туполева, Т.А. Использование ПЦР для детекции ВГВ и ВГС на станции переливания крови/ Т.А. Туполева, Е.В. Богословская, Л.О. Грумбкова, Л.Ю. Башкирова, В.С. Зайцев, Н.Г. Ярославцева, Д.С. Тихомиров, П.А. Суворова, Т.Ю. Романова, А.А. Гуляева, Г.К. Орлова, Г.М. Цыганова, Г.А. Шипулин, Ф.П. Филатов//Сборник трудов 6-ой Всероссийской конференции «Молекулярная диагностика 2007». – 2007. – т. 3. – с. 230-238.
63. Туполева, Т.А. Маркеры вирусной инфекции при заболеваниях системы крови с сопутствующим диагнозом «гепатит неясной этиологии» /Т.А. Туполева, Т.А. Гаранжа, Д.С. Тихомиров, Н.Г. Ярославцева, Е.Н. Игнатова, Ф.П. Филатов//Справочник заведующего КДЛ. - 2013. - № 5. - С. 29-33.
64. Туполева, Т.А. Контаминация при ПЦР-исследованиях: проблемы и решения/Т.А.Туполева, Д.С. Тихомиров, Л.О. Грумбкова, Е.Н. Игнатова, Т.Ю. Романова, Ф.П. Филатов, Т.А. Гаранжа//Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – т. 60. № 1. – с. 26-42.
65. Учайкин, В.Ф. НВ-вирусная инфекция у детей, страдающих гемобластозами и солидными опухолями/ В.Ф. Учайкин, Л.А. Махонова, Л.А. Дурнов и др.// под редакцией А.Ф. Блюгера Успехи гепатологии. выпуск XV. Рига, 1990. с. 195-215.
66. Учайкин, В.Ф. Клиника, особенности течения и исходы вирусного гепатита С у детей с различными соматическими заболеваниями/ В.Ф. Учайкин, А.В. Смирнов, В.А. Кстыкачкинцев, И.Г. Дрыгай//Педиатрия. – 1993 № 6, с. 27-30.

67. Цыбуляк, С.Н. Некоторые аспекты проблемы гепатита ни А, ни В с парентеральным механизмом заражения/С.Н. Цыбуляк//Здравоохранение. – 1990. № 2. с. 52-56.
68. Чуланов, В.П. Роль молекулярных методов диагностики в оптимизации алгоритмов лечения вирусного гепатита С/В.П. Чуланов, Г.А. Шипулин//Лабораторная медицина. – 2006. - № . – С. 1–12.
69. Шульженко, А.Е. Современные подходы к диагностике и лечению герпесвирусных инфекций/А.Е. Шульженко, И.Н. Зуйкова//Лечащий врач. – 2007. - №5 - С.52-55.
70. Ющук, Н.Д., Климова, Е.А., Знойко, О.О., Вирусные гепатиты. Клиника, диагностика, лечение. (Библиотека врача-специалиста)/Н.Д. Ющук, Е.А. Климова, О.О. Знойко, Г.Н. Кареткина, С.Л. Максимов, И.В. Маев. М.. ГЭОТАР-Медиа, 2012. - с. 160.
71. Ярославцева, Н.Г. Вирусная безопасность гемотрансфузий: обеспечивают ли ее принятые лабораторные методы выбраковки донорской крови по гепатитам В и С/Н.Г. Ярославцева, Л.О. Грумбкова, Т.А. Туполева, Е.Н. Игнатова, А.В. Сомова, А.А. Гуляева и др.// Гематология и трансфузиология. – 2006. - №2. – с.22-26.
72. Ago, H. Crystal structure of the RNA dependet RNA polymerase of hepatitis C virus/ H. Ago, T. Adachi, A. Yoshida, M. Yamamoto, N. Habuka, K. Yatsunami//Structure with Folding and Design. – 1999. Vol 7. – V. 11. – p.1417-1426. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)80031-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(00)80031-3).
73. Al, R. H. Expression of recombinant hepatitis C virus non-structural protein 5B in Escherichia coli/ R. H. Al. Y. P. Xie.Y. H. Wang, C. H. Hagedorn//Virus Research. – 1998. –V. 53/ - p. 141-149.
74. Alberti A. Natural history of hepatitis C/ A. Alberti, L. Chemello, L. Benvegnù //Journal of Hepatology. – 1999. – V. 31. – P. 17-24.

75. Alberti A. Impact of sustained virological response on the long term outcome of hepatitis C/A. Alberti//Liver International. – 2011/ - V. 31. - № s1. – p. 18-22.
76. Allain, JP. International collaborative study proposal for the characterization of occult hepatitis B virus infection identified by nucleic acid or anti-HBc screening/ JP Allain//Vox Sang. – 2007. – V. 92. – N.3. – P.254–257. DOI: 10.1111 / j.1423-0410.2006.00874.x.
77. Allain, JP. Characterization of occult hepatitis B virus in South African blood donors/ JP. Allain, D. Belkhiri, M. Vermeulen, R. Crookes, R. Cable, A. Amiri, R. Reddy, A. Bird, D. Candotti//Hepatology. – 2009. № 49. – p.1868-1876.
78. Allain J. P. Challenges in hepatitis B detection among blood donors/ J. P. Allain, L. Cox //Current opinion in hematology. – 2011. – V. 18. – №. 6. – P. 461-466.
79. Allain J.P. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection/J.P. Allain, I. Michaljevic, M.I. Gonzalez-Frile, K. Gubbe, L. Holm-Harritshoj, J.M. Garcia, E. Brojer, C. Erikstrup, M. Saniewski, L. Wernish, L. Bianco, H. Ullum, D. Candotti, N. Lelie, W.H. Gerlich, M. Chudi//Transfusion. – 2013. V. 53. № 7. – p. 1405-1415. doi: 10.1111/trf.12096.
80. Allison, R.D. A 25-Year Study of the Clinical and Histologic Outcomes of Hepatitis C Virus Infection and Its Modes of Transmission in a Cohort of Initially Asymptomatic Blood Donors/R.D. Allison, C. Conry-Cantilena, D. Koziol, C. Schechterly, P. Ness, J. Gible, D.E. Kleiner, E. David, M.G. Ghany, H.J Alter//The Journal of Infectious Diseases. – 2012. - V. 206. - P.654–61.
81. Alvarez-Lafuente, R. Prevalens of herpesvirus DNA in MS patients and healthy blood donors/R. Alvarez- Lafuente, C. Martin-Estefani, V. de las Heras// Acta neurologica scandinavica. – 2002. – V. 105. № 2. – p. 95-99.
82. Anonymous National Institutes of Health Consensus Development. Conference Statement management of hepatitis C. 2002-June 10-12, 2002/ Anonimus// Hepatology. – 2002. V.36. – S3-S20.

83. Asabe, S. I. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS5A-dependent phosphorylation/ S.I. Asabe, Y. Tanji, S. Satoh, T. Kaneko, K. Kimura, K. Shimotohno//Journal of Virology. – 1997. – V.71. – p.790-796.
84. Barker, L.F. Relationship of virus dose to incubation time of clinical hepatitis and time of appearance of hepatitis-associated antigen/ L.F. Barker, R. Murray //The American journal of the medical sciences. – 1972. – V. 263. – №. 1. – P. 27-33.
85. Barril, G. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients/G. Barril, I. Castillo, M.D. Arenas, M. Espinosa, J. Garcia-Valdecasas, N. Garcia-Fernandez, E. Gonzalez-Parra, C. Sanchez, J.C. Diez-Baylon et al./Journal of the American Society of Nephrology. – 2008. – V. 19. № 12. – p. 2288-2292.
86. Barril, G. Hepatitis C virus (HCV)-specific T-cell responses are often detectable among hemodialysis patients at risk of occult HCV infection/ G. Barril, J.A. Quiroga, M. Espinosa, D. Arenas, J. García-Valdecasas, E. González-Parra, N. Garcia-Fernández, J.N. Alcazar, M.C. Sánchez-González, P. Martínez-Rubio et al //Clinical Kidney Journal. – 2009. - V.2. – N. 2. – P.1353.
87. Bartenschlager, R. The NS3}4A proteinase of hepatitis C virus unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy/R. Bartenschlager// Journal of Viral Hepatitis. – 1999. V.6. – p. 165-181.
88. Bartenschlager, R. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serinetype proteinase required for cleavage at the NS3}4 and NS4}5 junctions/ R. Bartenschlager, L. Ahlborn-Laake, J. Mous, H. Jacobsen//Journal of Virology. – 1993. – V. 67. – p. 3835-3844.
89. Bartenschlager, R Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing/ R. Bartenschlager, L. Ahlborn-Laake, J. Mous, H. Jacobsen//Journal of Virology. – 1994. – V. 68. – p. 5045-5055.
90. Bartenschlager, R. Replication of hepatitis C virus/ R. Bartenschlager, V. Lohmann//Journal of General Virology/ - 2000. – V. 81/ - № 7. – p. 1631-1648.

91. Bartolome, J. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C/ J. Bartolome, J.M. Lopez-Alcorocho, I. Castillo, E. Rodriguez-Inigo, J.A. Quiroga, R. Palacios, V. Carreno//Journal of Virology. – 2007. – V. 81. - № 14. – p. 7710-7715.
92. Barton, S.C. Beneficial effects of hepatitis in patients with acute myelogenous leukemia/ S.C. Barton, M.E. Canrad// Annals of internal medicine. – 1979. – V. 90. № 2. – p. 188-190.
93. Basaras, M. Distribution of HCV genotypes in patients infected by different sources / M. Basaras, N. Lombera, B. de las Heras, C. López, E. Arrese, R. Cisterna //Research in virology. – 1997. – V. 148. – №. 5. – P. 367-373.
94. Baumeister, M. Hepatitis B Virus e Antigen Specific Epitopes and Limitations of Commercial Anti-HBe Immunoassays/M. Baumeister, // Journal of Medical Virology. – 2000. - № 60. – p. 256-263.
95. Becker, S.A. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair/ S.A. Becker, T.H. Lee, J.S. Butel, B.L. Slagle //Journal of virology. – 1998. – V. 72. – №. 1. – P. 266-272.
96. Bedson, S. P. Complement-Fixation with Filtrable Viruses and Their Antisera / S. P. Bedson, J. O. Bland //British journal of experimental pathology. – 1929. – V. 10. – №. 6. – P. 393- 404.
97. Behrens, S.E. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus/S.E. Behrens, L. Tomei, R. De Francesco// EMBO Journal. – 1996. – V. 15. – p. 12-22.
98. Bellecave, P. Hepatitis B and C virus coinfection a novel model systems reveals the absence of direct viral interference/ P. Bellcave, J. Gouttenoire, M. Gajer, V. Brass, G. Koutsoudakis, H.E. Blum, R. Bartenschlager, M. Nassal, D. Moradpour// Hehatology. – 2009. – V. 50. – p. 46-55/

99. Belloni, L. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function/ L. Belloni, T. Pollicino, N.F. De, F. Guerrieri, G. Raffa, M. Fanciulli, G. Raimondo, M. Levrero// *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – V. 106. – p. 19975-19979.
100. Benn, J. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade/ J. Benn, R.J. Schneider// *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1994. – V. 91. – p. 10350-10354.
101. Bes, M. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection/ M. Bes, V. Vargas, M. Piron, N. Casamitjana, J.I. Esteban, N. Vilanova, A. Pinacho, J. Quer, L. Puig, J. Guardia, S. Sauleda// *J Hepatol*. – 2012. – V. 56. - № 4. – p.765-774. doi: 10.1016/j.jhep.2011.11.011.
102. Bhalerao, A. G. Comparative Study of ELISA and LATEX Agglutination Tests in Detecting HBsAg in Voluntary Blood Donors/ A. G. Bhalerao, A. R. Joshi, A. S. Kulkarni, P.P. Phulgirkar, R.S. Bindu // *Indian Medical Gazette*. – 2012. – V. 321. - P.320-323.
103. Blackberg, J. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation/ J. Blackberg, K. Kidd-Ljunggren// *J Hepatol*. – 2000. – V/ 33. – p. 992-997.
104. Blight, K. In situ hybridization and immunohistochemical staining of hepatitis C virus products/ K. Blight, E. Gowans// *Viral Hepatitis Reviews*. – 1995. – V. 1. – p. 143-155.
105. Bloom, D. C. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression/ D. C. Bloom, N. V. Giordani, D. L. Kwiatkowski // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. – 2010. – V. 1799. – №. 3. – P. 246-256.
106. Blum, H.E. Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro/ H.E. Blum, Z.S. Zhang, E. Galun, F. von Weizsacker, B. Garner, T.J. Liang, J.R. Wands // *J Virol*. – 1992. – V. 66. – P.1223-1227.

107. Blumberg, B.S. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis/ B.S. Blumberg, B.J. Gerstley, D.A. Hungerford, W.T. London, A.I. Sutnick //Annals of internal medicine. – 1967. – V. 66. – №. 5. – P. 924-931.
108. Blumberg, B. An alkylating agent for multiple myeloma melphalan / B.Blumberg, H.Alter, S.Visnich // JAMA. – 1965. – V. 191. – P. 547-549.
109. Bogard, M. GEMHEP multicenter quality control study of PCR detection of GB virus C/hepatitis G virus RNA in serum / M. Bogard, C. Buffet-Janvresse, J.F. Cantaloube, P. Biagini, G. Duverlie, S. Castelain, J. Izopet, M. Dubois, C. Defer, I. Lepot, J. Coste, P. Marcellin, M. Martinot-Peignoux, P. Halfon, V. Gerolami, L. Frangeul, J.M. Pawlotsky, F. Roudot-Thoraval, E. Dussaix, P. Loiseau, N. Ravera, P. Lewin, J. Lamoril, J. Lerable, P. Lebon //J Clin Microbiol. - 1997. – V.35. - P.3298–3300.
110. Bokharaei-Salim, F. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease/ F. Bokharaei-Salim, H. Keyvani, S.H. Monavari, S.M. Alavian, Z. Madjd, M.N. Toosi, A.H. Alizadeh //J Med Virol. – 2011. –v.83. p.989-995.
111. Borovski, P. Non-Structural Protein 3 of Hepatitis C Virus Inhibits Phosphorylation Mediated by cAMP-Dependent Protein Kinase/ P. Borovski, M. Heiland, K. Oehlmann, B. Becker, L. Kornetzky, H. Feucht, R. Laufs//European Journal of Biochemistry. – 1996. v. 237/ - № 3. – p. 611-618.
112. Borst, A. False-Positive Results and Contamination in Nucleic Acid Amplification Assays: Suggestions for a Prevent and Destroy Strategy/ A. Borst, A.T.A. Box, A/C/ Fluit//Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2004. v. 23. p. 289-299.
113. Bostan, N. An overview about hepatitis C: a devastating virus / N. Bostan, T. Mahmood // Crit Rev Microbiol. – 2010. – V.36. – P. 91–133.
114. Bouchard, M. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway/ M. Bouchard, S.

Giannakopoulos, E.H. Wang, N. Tanese, R.J. Schneider // J Virol. – 2001. – V. 75. P.4247-4257.

115. Bouchard, M.J. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication/ M.J. Bouchard, L.H. Wang, R.J. Schneider //Science. – 2001. – V. 294. – P.2376-2378.

116. Boxall, E. Transfusion-transmitted hepatitis E in a “nonhyperendemic” country/ E. Boxall, A. Herborn, G. Kochethu, G. Pratt, D. Adams, S. Ijaz, C.G. Teo // Transfus Med. – 2006. – V. 16. – N.2. – P. 79—83.

117. Brechot, C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms/ C. Brechot //Gastroenterology. – 2004. v. 127. № 5. p. S56-S61.

118. Bressanelli, S. Crystal structure of the RNAdependent RNA polymerase of hepatitis C virus/ S. Bressanelli, L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R.L. Vitale, M. Mathieu, R. de Francesco, F. A. Rey// Proceedings of the National Academy of Sciences, USA – 1999. v. 96. - № 23. p. 13034-13039.

119. Bukh, J. The hepatitis C virus. American Association for the Study of liver diseases post-graduate course 2000 / J. Bukh // Update on viral hepatitis, October 27-28, 2000, Dallas, Texas. p. 102-111.

120. Burger, R. Testing plasma donations for hepatitis B core antigen (anti-HBc) in order to improve safety of cellular blood components and of quarantined fresh frozen plasma/ R. Burger, R. Offeregeld // Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz – 2005. v. 48. № 6. p. 698-699.

121. Busch, M.P. Dynamics of HCV viremia and seroconversion in transfusion-acquired HCV infections/ M.P. Busch, B.D. Rawal, E.W. Feibig // Transfusion. – 1998. – V.38. – P. 72S.

122. Cacciola, I. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease / I. Cacciola, T. Pollicino, G. Squadrito, G. Cerenzia, M.E. Orlando, G. Raimondo // *New England Journal of Medicine*. – 1999. v. 341. № 1. p. 22-26.
123. Cacoub, P. Hepatitis C virus-induced vasculitis: therapeutic options/ P. Cacoub, B. Terrier, D. Saadoun // *Ann Rheum Dis*. – 2014. – V. 73. – P. 24–30.
124. Candotti, D. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection/ D. Candotti, J.P. Allain // *Journal of hepatology*. – 2009. v. 51. № 4. – p. 798-809.
125. Carreno, V. New perspectives in occult hepatitis C virus infection/ V. Carreno, J. Bartolome, I. Castillo, J.A. Quiroga // *World J Gastroenterol*. – 2012. v. 18. № 23. p. 2887-2894. Published online 2012 June 21/ doi: 10.3748/wgj.v18.i23.2887.
126. Carreno, V. Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the liver of healthy, anti-HCV antibody-positive, serum HCV RNA-negative patients with normal alanine aminotransferase levels/ V. Carreno, M. Prado, J.M. Lopez-Alcorocho, E. Rodriguez-Inigo, J. Bartolome, I. Castillo // *J Infect Dis* / - 2006. v. 194. p. 53-60.
127. Caselmann, W. H. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis/ W. H. Caselmann // *Journal of hepatology*. – 1994. – V. 22. – №. 1 Suppl. – P. 34-37.
128. Caselmann, W. H. Trans-activation of cellular genes by hepatitis B virus proteins: a possible mechanism of hepatocarcinogenesis / W. H. Caselmann // *Advances in virus research*. – 1996. – V. 47. – P. 253-302.
129. Castillo, I. Hepatitis C virus infection in the family setting of patient with occult hepatitis C/ I. Castillo, J. Bartolome, J.A. Quiroga, G. Barril, V. Carreno // *Journal of medical virology*. – 2009. v. 81. № 7. p. 1198-1203.
130. Castillo, I. Presence of HCV-RNA after ultracentrifugation of serum samples during the follow-up of chronic hepatitis C patients with a sustained virological response may predict reactivation of hepatitis C virus infection / I. Castillo, J.

Bartolome, J.A. Quiroga, G. Barril, V. Carreno // *Alimentary pharmacology & therapeutics*. – 2009. v. 30. № 5. – p. 477-486.

131. Castillo, I. Diagnosis of occult hepatitis C without the need for a liver biopsy / I. Castillo, J. Bartolome, J.A. Quiroga, G. Barril, V. Carreno // *Journal of medical virology*. – 2010. - v. 82. № 9. - p. 1554-1559.

132. Castillo, I. Long-term virological follow up patients with occult hepatitis C virus infection. / I. Castillo, J. Bartolome, J.A. Quiroga, G. Barril, V. Carreno // *Liver International*. – 2011. – v. 31. № 10. – p. 1519-1524.

133. Castillo, I. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown / I. Castillo, M. Prado, J. Bartolome, N. Ortiz-Movilla, E. Rodriguez-Inigo, S. de Lucas, C. Salas, J.A. Jimenez-Heffernan, A. Perez-Mota, J. Graus et al. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2004. v. 189. № 1. – p. 7-14.

134. Castillo, I. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection / I. Castillo, E. Rodriguez-Inigo, J. Bartolome, S. da Lucas, N. Ortiz-Movilla, J.M. Lopez-Alcorocho, M. Prado, V. Carreno // *Gut*. – 2005. – v. 54. - № 5. – p. 682-685.

135. Castillo, I. Hepatitis C virus replicates in the liver of patients who have a sustained response to antiviral treatment/ I. Castillo, E. Rodriguez-Inigo, J.M. Lopez-Alcorocho, M. Prado, J. Bartolome, V. Carreno // *Clin. Infect. Dis.* – 2006. - v.43. p. 1277-1283.

136. Cardoso, M.S. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results/ M.S. Cardoso, K. Kubanek // *Transfusion*. -1998/ - v. 38. – p. 905-907.

137. Chang, J. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in

cooperation with the H-ras oncogene / J. Chsng, S.H. Yang, Y.G. Cho, S.B. Hwang, Y.S. Hahn, Y.C. Sung // Journal of virology. – 1998. – v. 72. - № 4. – p. 3060-3065.

138. Chemin, I. Close monitoring of serum HBV DNA levels and liver enzymes levels is most useful in the management of patients with occult HBV infection / I. Chemin, O. Guillaud, P.C. Queyron, C. Trepo // Journal of hepatology/ - 2009. – v. 51. № 4. – p. 824-825.

139. Chen, D. S. Hepatitis B vaccination: the key towards elimination and eradication of hepatitis B / D. S. Chen //Journal of hepatology. – 2009. – V. 50. – №. 4. – P. 805-816.

140. Chen, C.M. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor / C.M. Chen, L.R. You, L.H. Hwang, Y.H. Lee // Journal of Virology. – 1997. – v. 71. - № 12. – p. 9417-9426.

141. Cheung, C.K. Occult hepatitis B virus infection of donor and recipient origin after liver transplantation despite nucleoside analogue prophylaxis / C/K/ Cheung, C.M. Lo, K. Man, G.K. Lau // Liver Transplantation. – 2010. – v. 16. - № 11. – p. 1314-1323.

142. Choi, B.H. Hepatitis B viral X protein overcomes inhibition of E2F1 activity by pRb on the human Rb gene promoter/ B.H. Choi, M. Choi, H.Y. Jeon, H.M. Rho //DNA and cell biology. – 2001. – V. 20. – №. 2. – P. 75-80.

143. Cholongitas, E. Liver grafts from anti-hepatitis B core positive donors: a systematic review / E. Cholongitas, G.V. Papatheodoridis, A.K. Burroughs // Journal of hepatology. – 2010. – v. 52. - № 2. – p. 272-279.

144. Choo, Q.L. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodbornenon-A, non-B viral hepatitis genome/ Q.L. Choo, G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, M. Houghton // Science. – 1989. – v. 244. – p. 359-362.

145. Cleland, A. Hepatitis E virus in Scottish blood donors / A. Cleland, L. Smith, C. Crossan, O. Blatchford, H.R. Dalton, L. Scobie et al.// *Vox Sang.* – 2013. - V.105. – N.4. – P.283-289.
146. Cobas ® TaqScreen MPX Test, version 2.0 package insert. Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg,NJ8876 USA, 2011.
147. Coffin, C.S. Hepatitis B virus quasispecies in hepatic and extrahepatic viral reservoirs in liver transplant recipients on prophylactic therapy / C.S. Coffin, P.M. Mulrooney-Cousins, G. van Marle, J.P. Roberts, T.I. Michalak, N.A. Terrault // *Liver Transplantation.* – 2011. – v. 17. - № 8. – p. 955-962. doi 10.1002/lt.22312.
148. Cohen Stuart, J.W. Occult hepatitis B in persons infected with HIV is associated with low CD4 counts and resolves during antiretroviral therapy / J.W. Choen Stuart, M. Velema, R. Schuurman, C.A. Boucher, A.I. Hoepelman // *J Med Virol.* – 2009. – v. 81. – p. 441-445. doi: 10.1002/jmv.21422.
149. Colson, P. Transfusion-associated hepatitis E, France/ P. Colson, C. Coze, P. Gallian, M. Henry, P. De Micco, C. Tamalet // *Emerg. Infect. Dis.* – 2007. – V. 13. – N.4. – P. 648—649.
150. Comar, M. HBV, HCV and TTV detection by in situ polymerase chain reaction could reveal occult infection in hepatocellular carcinoma comparison with blood markers / M. Comar, G. Dal Molin, P.D'Agaro, S.L. Croce, C. Tiribelli, C. Campello // *J Clin Pathol/* - 2006/ - v. 59. – p.526-529.
151. Coppola, N. Reactivation of overt and occult hepatitis B infection in various immunosuppressive setting/ N. Coppola, G. Tonziello, M. Pisaturo, V. Messina, S. Guastafierro, M. Fiore, V. Iodice, C. Sagnelli, M. Stanzione, N. Capoluongo, G. Pasquale, E. Sagnelli // *Journal of Medical Virology.* – 2011. – v. 83. - № 11. – p.1909-1916.
152. Cortés-Mancera, F.M. Occult hepatitis C virus infection in a re-transplanted patients with liver failure of unknown etiology/ F.M. Cortés-Mancera, J.C. Restrepo, G.

Osorio, S. Hoyos, G. Correa, M.C. Navas // *Rev Col Gastroenterol.* – 2010. – V.25. – P.72–80.

153. Cougot, D. Inhibition of PP1 phosphatase activity by HBx: A mechanism for the activation of hepatitis B virus transcription / D. Cougot, E. Allemand, L. Riviere, S. Benhenda, K. Duroure, F. Levillayer, C. Muchardt, M.A. Neuveut // *Science Signaling.* – 2012. – v. 5. – I. 205. ra 1. [doi: 10.1126/scisignal.2001906].

154. Crowcroft, N.S. PHLS Advisory Committee on Vaccination and Immunisation. Guidelines for the control of hepatitis A virus infection. / N.S. Crowcroft, B. Walsh, K.L. Davison, U. Gungabissoon // *Communicable disease and public health/PHLS.* – 2001. – v. 4. № 3. – p.213-227.

155. Deleersnyder, V. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes / V. Deleersnyder, A. Piliez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, J. Dubuisson // *Journal of Virology.* – 1997. – v. 71. № 1. – p.697-704.

156. De Marco, L. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease / L. De Marco, A. Gillio-Tos, V. Fiano, G. Ronco, V. Krogh, D. Palli, S. Panico, R. Tumino, P. Vineis, F. Merletti et al. // *PloS one.* – 2009. – v. 4. - № 12. – p.e8128.

157. Diao, J. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis/ J. Diao, R. Garces, C. D. Richardson // *Cytokine & growth factor reviews.* – 2001. – V. 12. – №. 2. – P. 189-205.

158. Dreier, J. Low-level viraemia of hepatitis B virus in an anti-HBc- and anti-HBs-positive blood donor/ J. Dreier, M. Kröger, J. Diekmann, C. Götting, K. Kleesiek // *Transfus. Med.* – 2004. – v. 14. № 2. – p.97-103.

159. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B// *Journal of Hepatology.* – 2009. v. 50. – p.227-242.

160. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B// Journal of Hepatology. – 2012. v. 57. – p.167-185.
161. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis C virus infection // Journal of Hepatology. – 2014. v. 60. – p.392-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.003>.
162. Echevarria, J.M. Sensitivity of modified version of the ARCHITECT Anti-HCV test in detecting samples with immunoblot-confirmed, low-level antibody to hepatitis C virus / J.M. Echevarria, A. Avellon, G. Jonas, M Hausmann, A. Vockel, H.P. Kapprell // J Clin Virol. – 2006/ - v. 35. – p. 368-372.
163. Eckart, M.R. The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor / M.R. Eckart, M. Selby, F. Masiarz, C. Lee, K. Berger, K. Crawford, C. Kuo, G. Kuo, M. Houghton, Q.L. Choo // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1993. – v. 193. – p.399-406/
164. El Chaar, M. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection / M. Chaar, D. Candotti, R.A. Crowther, J.P. Allain // Hepatology. – 2010. – v. 52. – p.1600-1610.
165. Elmore, L.W. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G / L.W. Elmore, A.R.Hancock, S.F.Chang, X.W.Wang, S. Chang, C.P. Callahan, E. Engvall, P.Perl man // Immunochemistry. – 1971. – V.8. – P.871–4.
166. El-Serag, H.B. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma / H.B. El-Serag //Gastroenterology. – 2012. – V.142. – P.1264–1273
167. Esaki, T. Hepatocellular carcinoma in a patient with liver cirrhosis associated with negative serum HCV tests but positive HCV RNA / T. Esaki, N. Suzuki, K. Yokoyama, K. Iwata, M. Irie, A. Anan, H. Nakane, M. Yoshikane, S. Nishizawa, S. Ueda, et al. //Internal medicine. – 2004. – v. 43. № 4. – p.279-282.

168. Esteban, J.I. The clinical picture of acute and chronic hepatitis C / J.I. Esteban, J. Cordoba, S. Sauleda //Hepatitis C Virus. Karger Publishers. – 1998. – v. 62. – p.102-118.
169. Esteban, J.I. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain / J.I. Esteban, R. Esteban, L. Viladomiu, J.C. Lopez-Talavera, A. Gonzalez, J.M. Hernandez, et al. / Lancet. -1989. –v. 2. № 8658. – p. 294-297.
170. Eyster, M.E. Suppressions of hepatitis C virus (HCV) replication by hepatitis D virus (HDV) in HIV-infected hemophiliacs with chronic hepatitis B and C / M.E. Eyster, J.C. Sanders, M. Battegay, et al. // Dig Dis Sci. – 1995. – v. 40. № 7. – p.1583-1588. doi: 10.1007/BF02285214.
171. Fagan, E.A. Candidate hepatitis F virus in sporadic non-A, non-B acute liver failure: exclusion in liver of hepatitis viruses A, E, Cand B by polymerase chain reaction / E.A. Fagan, T.J. Harrison // Journal of Hepatology. – 1994. - V:21. – Is.4, Publisher:Springer-Verlag, - P.587-591.
172. Fagan, E.A. Fulminant viral hepatitis / E.A. Fagan, R. Williams //British medical bulletin. – 1990. – V.46. – N.2. – P.462-80.
173. Falcón, V. Evidences of hepatitis C virus replication in hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients negative for viral RNA in serum / V. Falcón, N. Acosta-Rivero, M. Shibayama, J. Luna-Munoz, M. Miranda-Sanchez, d M.C.e la Rosa, I. Menéndez, B. Gra, S. Dueñas-Carrera, W. García, et al. / Am J Infect Dis. – 2005. – v.1. – p.34-42.
174. Failla, C. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins / C. Falla, L. Tomei, R.de Francesco // Journal of Virology. – 1994. – v. 68. – p.3753-3760.
175. Feitelson, M.A. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma / M.A. Feitelson, M. Zhu, L.X. Duan, W.T. London // Oncogene. – 1993. – v. 8. – p.1109-1117.

176. Fields Virology, 2 Volumes Set, 6th Edition, Jun 17, 2013, David M. Knipe, Peter Howley, LWW, ISBN: 9781451105636, Hardbound. Pages: 2664.
177. Fischer, M. HBx protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit / M. Fischer, L. Runkel, H. Schaller. // Virus Genes. - 1995. – V. 10. – P. 99-102.
178. Flodell, S. The apical stem-loop of the hepatitis B virus encapsidation signal folds into a stable tri-loop with two underlying pyrimidine bulges / S. Flodell, J. Schleucher, J. Croomsigt, H. Ippel, K. Kidd-Ljunggren, S. Wijmenga // Nucleic Acids Res.- 2002. – V. 30. – P.4803-4811.
179. Forgues, M. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1 dependent nuclear export pathway / M. Forgues, A.J. Marrogi, E.A. Spillare, C.G. Wu, Q. Yang, M. Yoshida, X.W. Wang // J Biol Chem. – 2001. – v. 276. – p.22797-22803.
180. Fwu, C.W. Hepatitis B virus infection and risk of intrahepatic cholangiocarcinoma and non-Hodgkin Lymphoma: a cohort study of parous women in Taiwan / C/W/ Fwu, Y.C. Chen, S.L. You, K.E. Nelson, G.D. Kirk, H.S. Kuo, M. Feinleib, C/J/ Chen // Hepatology. – 2011. – v. 53. – p.1217-1225.
181. Gaeta, G.B. Epidemiological and clinical burden of chronic hepatitis B virus/hepatitis C virus infection. A multicenter Italian study / G.B. Gaeta, G. Stornaiuolo, D.F. Frecone et al // J Hepatol. - 2003. – V. 20. – P. 1036-1041.
182. Galbraith, R.M. Fulminant hepatic failure in leukaemia and choriocarcinoma related to withdrawal of cytotoxic drug therapy / R.M. Galbraith, A.L. Eddleston, R. Williams, A.J. Zuckerman // Lancet. – 1975. – V. 2. – N. 7934. – P.528–530.
183. Gale, M.J. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation / M.J. Gale, Jr, S.M. Blakely, B. Kwieciszewski, S.-L. Tan, M. Dossett, N.M. Tang, M.J. Korth, S.J. Polyak, D.R. Gretch, M.G. Katze // Molecular and cellular biology. – 1998. – v. 18. № 9. – p. 5208-5218.

184. Gale, M.J. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein / M.J. Gale, M.J. Korth, N.M. Tang, S.L. Tan, D.A. Hopkins, T.E. Dever, S.J. Polyak, D.R. Gretch, M.G. Katze // *Virology*. – 1997. – v. 230. - № 2. – p. 217-227.
185. Ganem, D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles / D. Ganem // *Hepadnaviruses*. – Springer Berlin Heidelberg, 1991. – P. 61-83.
186. Ganem, D. Hepadnaviridae: the viruses and their replication / D. Ganem, R. J. Schneider // *Fields virology*. – 2001. – V. 2. – P. 2923-2969.
187. Gardner, P. S. Rapid virus diagnosis: Application of immunofluorescence / P. S. Gardner, J. McQuillin, M. Grandien – London : Butterworths, 1974. – P. 103.
188. Gerlich, W.H. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation / W.H. Gerlich // *J Clin. Virol.* – 2006; 36(Suppl. 1): S18-21.
189. Gerlich, W.H. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now / W.H. Gerlich // *Virology Journal*. – 2013. – v. 10. – p. 239. <http://www.virologyj.com/content/10/1/239>.
190. Ghany, M.G. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update / M.G. Ghany, D.B. Strader, D.L. Thomas, L.B. Seeff / *Hepatology*. – 2009. – v. 49. – p. 1335-1374.
191. Glebe, D. Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture / D. Glebe, A. Berting, S. Broehl, H. Naumann, R. Schuster, N. Fiedler, T.K. Tolle, S. Nitsche, M. Seifer, W.H. Gerlich, S. Schaefer // *Intervirology*. – 2002. – V. 44. – №. 6. – P. 370-378.
192. Gowland, P. Molecular and serologic tracing of a transfusion hepatitis A virus / P. Gowland, S. Fontana, C. Niederhauser // *Transfusion*. – 2004. – v. 44. – p. 1555-1561.

193. Grakoui, A. A second hepatitis C virus-encoded proteinase / A. Grakoui, D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinston, C.M. Rice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1993. – v. 90. - № 22. – p. 10583-10587.
194. Grakoui, A. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites / A. Grakoui, D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinston, C.M. Rice // *Journal of virology*. – 1993. – v. 67. - № 5. – p.2832-2843.
195. Gresham, D. Optimized detection of sequence variation in heterozygous genomes using DNA microarrays with isothermalmelting probes / D. Gresham, B. Curry, A. Ward et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – v. 107. - № 4. – p. 1482-1487.
196. Grewal, J. Fatal reactivation of hepatitis B with temozolomide / J. Grewal, C.A. Dellinger, W.K.A. Yung // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – v. 356. - № 15. – p. 1591-1592.
197. Grob, P. Serological pattern “anti-HBc alone”: report on a workshop / P. Grob, W. Jilg, H. Bornhak, G. Gerken, W. Gerlich, S. Günther, et al. // *Journal of medical virology*. – 2000. – v. 62. - № 4. – p. 450-455.
198. Guarnieri, G. Ricerche sulla patogenesi ed etiologia dell'infezione vaccinica e vaiolosa / G. Guarnieri // *Archivio per le scienze mediche*. – 1892. –V.16. – P.403–423.
199. Guidotti, L.G. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response / L.G. Guidotti, F.V. Chisari // *Annual review of immunology*. – 2001. – v. 19. - № 1. – p. 65-91.
200. Guo, J.T. Conditional replication of duck hepatitis B virus in hepatoma cells / J.T. Guo, M. Pryce, X. Wang, M.I.Barrasa, J.Hu, C. Seeger // *Journal of virology*. – 2003. – V. 77. – №. 3. – P. 1885-1893.

201. Gwack, Y. Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein / Y. Gwack, D.W. Kim, J.H. Han, J. Choe // Biochemical and biophysical research communications. – 1996. – v. 225. - № 2. – p. 654-659.
202. Hass, M. Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals / M. Hass, C. Hannoun, T. Kalinina, G. Sommer, C. Manegold, S. Günther // Hepatology. – 2005. – v. 42. - № 1. – p. 93-103.
203. Hatzakis, A. Antibody Responses to Hepatitis C Virus by Second-Generation Immunoassays in a Cohort of Patients with Bleeding Disorders / A. Hatzakis, H. Polychronaki, V. Miriagou, A. Yannissiotis, J. Chrispeels, T.H. Roonen, A. Karafoulidou, A. Gialeraki, K. Katsouyanni, T. Mandalaki // Vox sanguinis. – 1992. – v. 63. - № 3. – p. 204-209.
204. Heermann, K.H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence / K.H. Heermann, U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, W.H. Gerlich // Journal of virology. – 1984. – v. 52. - № 2. – p. 396-402.
205. Higuchi, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences / R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, et al. // Biotechnology (N Y). – 1992. – V.10. – P. 413–417.
206. Hijikata, M. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus / M. Hijikata, H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura, K. Shimomoto // Journal of virology. – 1993. – v. 67. - № 8. – p. 4665-4675.
207. Holland, J.J. RNA virus populations as quasispecies / J.J. Holland, J.C. de la Torre, D.A. Steinhauter // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 1992. – v. 176. – p. 1-20.

208. Holland, P. Viral testing of blood donors: where will it end? / P. Holland // VI regional European congress of the international society of Blood transfusion. Jerusalem, Israel, may 9-13, 1999. Abstracts. – p. 47.
209. Hollinger, F.B. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays / F.B. Hollinger // Journal of viral hepatitis. – 2007. – v. 14. - № 1. – p. 11-15.
210. Hollinger, F.B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult / F.B. Hollinger // Transfusion. – 2008. – v. 48. - № 5. – p. 1001-1026.
211. Hollinger, F.B. Hepatitis B virus / F. B. Hollinger, T.J. Liang //Fields virology. – 2001. – V. 4. – P. 2971-3036.
212. Hollinger, F.B., Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation / F.B. Hollinger, G. Sood // Journal of viral hepatitis. – 2010. – v. 17. - № 1. – p. 1-15.
213. Hong, Z. Enzymatic characterization of hepatitis C virus NS3/4A complexes expressed in mammalian cells by using the herpes simplex virus amplicon system / Z. Hong, E. Ferrari, J. Wright-Minogue, R. Chase, C. Risano, G. Seelig, C.G. Lee, A.D. Kwong // Journal of virology. – 1996. – v. 70. - № 7. – p. 4261-4268.
214. Horner, S. M. Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus / S. M. Horner //Journal of molecular biology. – 2014. – V. 426. – №. 6. – P. 1198-1209.
215. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1976/blumberg/facts/>
216. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://ok-t.ru/studopediaru/baza5/1780124435968.files/image017.gif>
217. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://works.doklad.ru/images/kqYLlNbfDc/m78f27a68.png>
218. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://img.china.alibaba.com/img/ibank/2011/662/635/415536266_1908996838.jpg

219. Hu, J. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids / J.Hu, D. O.Toft, C. Seeger //The EMBO Journal. – 1997. – V. 16. – №. 1. – P. 59-68.
220. Hu, Z. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex / Z. Hu, Z. Zhang, E. Doo, O. Cux, A.L. Goldberg, T.J. liang // Journal of virology/ - 1999. – v. 73. - № 9. – p. 7231-7240.
221. Idrees, M. Occult hepatitis C virus infection and associated predictive factors: the Pakistan experience / M. Idrees, A. Lal, F.A. Malik, A. Hussain, I. Rehman, H. Akbar, S. Butt, M. Ali, L. Ali, F.A. Malik //Infect Genet Evol. – 2011. – V.11. – P.442–445.
222. Ie, S.I. Prediction of conformational changes by single mutation in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) identified in HBsAg-negative blood donors / S.I. Ie, M.D. Thedja, M. Roni, D.H. Muljono //Virology Journal. – 2010. – v. 7. – p/ 326. <http://www.virologyj.com/content/7/1/326>
223. Irshad, M. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection / M. Irshad, D.S. Mankotia, K. Irshad // World J. Gastroenterol. – 2013. – V. 19. – N.44. – P. 7896–909.
224. Janben, G. Hepatitis B-infectionen bei zytostatisch behandelten kindern / G. Janben, D. Schwamborn, F. Hornschuh et al. // Klinische Pädiatrie. – 1986. – V. 198. – №. 03. – P. 285-290.
225. Jazwinski, A.B. Etanercept treatment to enable successful hepatitis C virus clearance in a patient with rheumatoid arthritis / A.B.Jazwinski, J. Jezsik, H.L. Tillmann // Gastroenterology & hepatology. – 2011. – V. 7. – №. 11. – P. 772–774.
226. Kannangai, R. Liver enzyme flares and occult hepatitis B in persons with chronic hepatitis C infection / R. Kannangai, P. Vivekanandan, D. Netski, S. Mehta, G.D. Kirk, D.L. Thomas, M. Torbenson // Journal of clinical virology. – 2007. – v. 39. - № 2. – p. 101-105.

227. Kane, M. Global program for control of hepatitis B infection / M. Kane // Vaccine. – 1995. – № 131(Suppl. 1). p. 47.
228. Kaneko, T. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome / T. Kaneko, Y. Tanji, S. Satoh, M. Hijikata, S. Asabe, K. Kimura, K. Shimotohno // Biochemical and biophysical research communications. – 1994. – v. 205. - № 1. – p. 320-326.
229. Katz, L. Performance of an algorithm for the reentry of volunteer blood donors deferred due to false-positive test results for antibody to hepatitis B core antigen / L. Katz, D.M. Strong, G. Tegtmeier, S. Stramer // Transfusion. – 2008. – v. 48. - № 11. – p. 2315-2322. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01844.x.
230. Kaur, P. DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection / P. Kaur, A. Paliwal, D. Durantel, P. Hainaut, J.Y. Scoazec, F. Zoulim, I. Chemin, Z. Herceg // Journal of Infectious Diseases. – 2010. – v. 202. №5. – p. 700-704.
231. Kawatani, J. Incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies / J. Kawatani, T. Suou, F. Tajima et al. // Eur. J. Hematol. – 2001. – v. 67. – p. 45-50.
232. Kazemi-Shirazi, L. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C / L. Kazemi-Shirazi, D. Petermann, C. Müller // Journal of Hepatology. – 2000. – v. 33. - № 5. – p. 785-790.
233. Kiely, P. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection / P. Kiely, A.R. Margaritis, C.R. Seed, H. Yang // Transfusion. – 2014. – v. 54. - № 8. – p. 2084-2091/ doi: 10.1111/trf.12556.
234. Kim, D.W. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity / D.W. Kim, Y. Gwack, J.H. Han, J. Choe // Biochemical and biophysical research communications. – 1995. – v. 215. - № 1. – p. 160-166.

235. Kim, J.L. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide / J.L. Kim, K.A. Morgenstern, C. Lin, T. Fox, M.D. Dwyer, J.A. Landro, S.P. Chambers, W. Markland, C.A. Lepre, E.T. O'Malley, S.L. Harbeson, C.M. Rice, M.A. Murcko, P.R. Caron, J.A. Thomson // *Cell*. - 1996. – v. 87. - № 2. – p. 343-355.
236. Kim, J.L. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding / J.L. Kim, K.A. Morgenstern, J.P. Griffith, M.D. Dwyer, J.A. Thomson, M.A. Murcko, C. Lin, P.R. Caron // *Structure*. - 1998. – v. 6. - № 1. – p. 89-100.
237. Klein, N. P. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras / N. P. Klein, R. J. Schneider // *Molecular and cellular biology*. – 1997. – V. 17. – №. 11. – P. 6427-6436.
238. Knoll, A. Solid-organ transplantation in HBsAg negative patients with antibodies to HBV core antigen: low risk of HBV reactivation / A. Knoll, M. Pietrzyk, M. Loss, W.A. Goetz, W. Jilg // *Transplantation*. – 2005. – v. 79. - p. 1631-1633.
239. Koch, J.O. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B / J.O. Koch, R. Bartenschlager // *Journal of Virology*. – 1999. – v. 73. - № 9. – p. 7138-7146.
240. Kohler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // *Nature*. – 1975. – v. 256. – p. 495-497.
241. Kolykhalov, A.A. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo / A.A. Kolykhalov, K. Mihalik, S.M. Feinstone, C.M. Rice // *Journal of virology*. – 2000. – v. 74. - № 4. – p. 2046-2051.
242. Komiya, Y. Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and C / Y. Komiya, K.

Katayama, H. Yugi, M. Mizui, H. Matsukura, T. Tomoguri, Y. Miyakawa, A. Tabuchi, J. Tanaka, H. Yoshizawa // *Transfusion*. – 2008. – v. 48. - № 2. – p. 286-294.

243. Krugman, S. Hepatitis B vaccine. In: Plotkin SA, Mortimer EA Jr, eds. *Vaccines* / S. Krugman. Philadelphia: WB Saunders Co, 1988; 458-473.

244. Kuniholm, M.H. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994 / M.H. Kuniholm, R.H. Purcell, G.M. McQuillan et al. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – v. 200. - № 1. – p. 48-56.

245. Kusumoto, S. Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma / S. Kusumoto, Y. Tanaka, M. Mizokami, R. Ueda // *International Journal of hematology*. – 2009. – v. 90. - № 1. – p. 13-23.

246. Lalazar, G. Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with hematological malignancies / G. Lalazar, D. Rund, D. Shouval // *British Journal of hematology*. – 2007. – v. 136. - № 5. – p. 699-712.

247. Lara-Pezzi, E. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression / E. Lara-Pezzi, M.V.Gomez-Gavero, B.G.Galvez, E. Mira, M.A. Iniguez, M. Fresno, A.C. Martinez, A.G. Arroyo, M. Lopez-Cabrera // *The Journal of clinical investigation*. – 2002. – V. 110. – №. 12. – P. 1831-1838.

248. Lee, W.M. Reemergence of hepatitis C virus after 8.5 years in a patient with hypogammaglobulinemia: evidence for an occult viral reservoir / W.M. Lee, J.E. Polson, D.S.Carney, B. Sahin, M. Gale // *Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – V. 192. – №. 6. – P. 1088-1092.

249. Lee, Y. H. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling / Y. H. Lee, Y. Yun // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – №. 39. – P. 25510-25515.

250. Leparc, G.F. Safety of the Blood Supply / G.F. Leparc // Cancer Control. – 2015. - V. 22. , - N. 1, - P.7-15.
251. Lesburg, C.A. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site / C.A. Lesburg, M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. Mannarino, P.C. Weber // Nature Structural & Molecular Biology. – 1999. – v. 6. - № 10. – p. 937-943.
252. Levrero, M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection / M. Levrero, T. Pollicino, J. Petersen, L. Belloni, G. Raimondo, M. Dandri // Journal of hepatology. – 2009. – v. 51. - № 3. – p. 581-592.
253. Liaw, Y.T. Displacement of hepatitis B virus by hepatitis C virus as the cause of continuing chronic hepatitis / Y.T. Liaw, S.L.Tsai, J.J. Chang et al. // Gastroenterology. – 1994. – V. 106. – №. 4. – P. 1048-1053.
254. Liaw, Y.F. Impact of acute hepatitis B virus superinfection on chronic hepatitis C virus infection / Y. Liaw, C.T. Yeh, S.L. Tsai // The American Journal of gastroenterology. – 2000. – v. 95. - № 10. – p. 2978-2980.
255. Lieberman, P. M. Chromatin organization and virus gene expression / P. M. Lieberman //Journal of cellular physiology. – 2008. – V. 216. – №. 2. – P. 295-302.
256. Lin, A. Immune suppression leading to hepatitis C virus re-emergence after sustained virological response / A. Lin, A. Thadareddy, M.J. Goldstein, G. Lake-Bakaar //Journal of medical virology. – 2008. – V. 80. – №. 10. – P. 1720-1722.
257. Lin, C. Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics / C. Lin, B. Pragai, A. Grakoui, J. Xu, C.M. Rice // Journal of virology. – 1994. – v. 68. - № 12. – p. 8147-8157.
258. Lindenbach, B.D. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro / B.D. Lindenbach, P. Meuleman, A. Ploss, T. Van

Wollegghem, A.J. Syder, J.A. McKeating, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – v. 103. - № 10. – p. 3805-3809.

259. Lo, Y.M.D. False-positive results and the polymerase chain reaction / Y.M.D. Lo, W.Z. Mehal, K.A. Fleming // The Lancet. – 1988. – v. 332. - № 8612. – p. 679.

260. Locasciulli, A. Hepatitis C virus infection in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation / A. Locasciulli, A. Bacigalupo, M.T. VanLint, A. Tagger, C. Uderzo, B. Portmann, H.M. Shulman, A. Alberti // Transplantation. – 1991. – V. 52. – №. 2. – P. 315-317.

261. Locasciulli, A. Evidence against the role of hepatitis C virus in severe liver damage occurring early in the course of acute leukemia in children / A. Locasciulli, P. Pontisso, D. Cavalletto, D. Frascini, C. Uderzo, G. Masera, A. Alberti // Leuk.-Lymphoma. – 1994. – v. 13. - № 1-2. – p. 119-122.

262. Lohmann, V. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino-acid sequence motifs essential for enzymatic activity / V. Lohmann, F. Körner, U. Herian, R. Bartenschlager // Journal of virology. – 1997. – v. 71. - № 11. – p. 8416-8428.

263. Loomba, R. Systematic review: the effect of preventive lamivudine on hepatitis B reactivation during chemotherapy / R. Loomba, A. Rowley, R. Wesley, T.J. Liang, J.H. Hoofnagle, F. Pucino, G. Csako // Annals of Internal Medicine. – 2008. – v. 148/ - № 7. – p. 519-528.

264. Love, R.A. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site / R.A. Love, H.E. Parge, J.A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E.W. Moomaw, T. Adachi, Z. Hostomska // Cell. – 1996. – v. 87. - № 2. – p. 331-342.

265. Lucifora, J. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells / J. Lucifora, D. Durantel, B. Testoni, O. Hantz, M. Levrero, F. Zoulim // Hepatology. – 2010. – v. 51. - № 1. – p. 63-72.

266. Magnius, L.O. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen / L.O. Magnius, A. Espmark // *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*. – 1972. – V. 80. – №. 2. – P. 335-337.
267. Mahony, J. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay / J.Mahony, S. Chong, F. Merante et al. // *J Clin Microbiol*. – 2007. – V.45. – P.2965–2970.
268. Marcellin, P. Redevelopment of hepatitis-B surface-antigen after renal-transplantation / P. Marcellin, E. Giostra, M. Martinotpeignoux, M.A. Lorient, M.L. Jaegle, P. Wolf et al. // *Gastroenterology*. – 1991. – v. 100. – p. 1432-1434.
269. Marcucci, F. High prevalence of hepatitis B virus infection in B-cell non-Hodgkin's lymphoma / F. Marcucci, A. Mele, E. Spada, A. Candido, E. Bianco, A. Pulsoni, P. Chionne, E. Madonna, R. Cotichini, A. Barbui, R.A. De, F. Dore, E. Iannitto, V. Liso, B. Martino, M. Montanaro, L. Pagano, P. Musto, M. Rapicetta // *Hematologica*. – 2006. – v. 91. – p. 554-557.
270. Martin, C.M. Cytokine expression during chronic versus occult hepatitis B virus infection in HIV co-infected individuals / C.M. Martin, J.A. Welge, N.J. Shine, M.T. Shata, K.E. Sherman, J.T. Blackard // *Cytokine*. – 2009. – v. 47. - № 3. – p. 194-198.
271. Marusava, H. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen / H. Marusava, S. Uemoto, M. Hijikata et al. // *Hepatology*. -2000. – v. 31. - № 2. – p. 488-495.
272. Marzano, A. Prophylaxis and treatment of hepatitis B in immunocompromised patients / A. Marzano, E. Angelucci, P. Andreone, M. Brunetto, R. Bruno, P. Burra, P. Caraceni, B. Daniele, V. di Marco, F. Fabrizi, S. Fagioli, P. Grossi, P. Lampertico, R. Meliconi, A. Mangia, M. Puoti, G. Raimondo, A. Smedile // *Digestive and Liver Disease*. – 2007. – v. 39. - № 5. – p. 397-408.

273. Mason, A.L. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen / A.L. Mason, L. Xu, L. Guo, M. Kuhns, R.P. Perrillo // *Hepatology*. – 1998. – v. 27. - № 6. – p. 1736-1742.
274. Mason W.S. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus / W.S. Mason, G. Seal, J. Summers // *Journal of virology*. – 1980. – v. 36. - № 3. – p. 829-836.
275. Matsumoto, C. Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository / C. Matsumoto, K. Tadokoro, K. Fujimura, S. Hirakawa, S. Mitsunaga, T. Juji // *Transfusion*. – 2001. – v. 41. - № 7. – p. 878-884.
276. Matsumoto, M. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor / M. Matsumoto, T.Y. Hsieh, N. Zhu, T. Van Arsdail, S.B. Hwang, K.S. Jeng, A.E. Gorbalenya, S.Y. Lo, J.H. Ou, C.F. Ware, M.C. Lai// *Journal of Virology*. – 1997. – v. 71. - № 2. – p. 1301-1309.
277. McClary, H. Inhibition of hepatitis B virus replication during schistosoma mansoni infection in transgenic mice/ H. McClary, R. Koch, F.V. Chisari, L.G. Guidotti // *The Journal of experimental medicine*. – 2000. – v. 192. - № 2. – p. 289-294.
278. Melisko, M. E. Reactivation of hepatitis C virus after chemotherapy for colon cancer / M. E. Melisko, R. Fox, A. Venook // *Clinical oncology*. – 2004. – V. 16. – №. 3. – P. 204-205.
279. Melon, S. Hepatitis C virus reactivation in anti-hepatitic C virus-positive renal transplant recipients / S. Melon, M.C. Galarraga, M.Villar, A. Laures, J.A. Boga, M. de Oña, E.Gomez // *Transplantation proceedings*. – Elsevier, 2005. – V. 37. – №. 5. – P. 2083-2085.
280. Milich, D.R. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence / D.R. Milich, M.K. Chen,

J.L. Hughes, J.E. Jones // *The Journal of Immunology*. – 1998. –v. 160. - № 4. – p. 2013-2021.

281. Mimms, L.T. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection / L.T. Mimms, J.W. Mosley, F.B. Hollinger et al. // *Br Med J*. – 1993. – V. 307. – №. 6912. – P. 1095-1097.

282. Miyanari, Y. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production / Y. Miyanari, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas et al. // *Nature cell biology*. – 2007. – v. 9. - № 9. – p. 1089-1097.

283. Modrow, S. Prevalence of nucleic acid sequences specific for human parvoviruses, hepatitis A and hepatitis E viruses in coagulation factor concentrates / S. Modrow, J.J. Wenzel, S. Schimanski et al. // *Vox Sanguinis*. – 2011. – V. 100. – P. 351-358.

284. Moriya, K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice / K. Moriya, H. Fujie, Y. Shintani, H. Yotsuyanagi, T. Tsutsumi, K. Ishibashi, Y. Matsuura, K. Koike // *Nature medicine*. – 1998. – v. 4. - № 9. – p. 1065-1067.

285. Mulrooney-Cousins, P.M. Persistent occult hepatitis B virus infections: experimental findings and clinical implications / P.M. Mulrooney-Cousins, T.I. Michalak, // *World Journal of Gastroenterology*. – 2007. – v. 13. – p. 5682-5686.

286. Murphy, F.A. *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* / F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers – 1995. Vienna & New York Springer-Verlag. – p. 424-426.

287. Murphy, M.F. Hepatitis C infection in multitransfused patients with acute leukemia / M.F. Murphy, A.H. Waters, P.C.A. Grint, A.E. Hardiman, T.A. Lister // *Lancet*. – 1990. – v. 335. – p. 58-59.

288. Nagel, M. The varicella zoster virus vasculopathies: clinical, CSF, imaging, and virologic features / M.A. Nagel, R.J. Cohrs, R. Mahalingam et al. // *Neurology*. – 2008. – V.70. – P.853–860.
289. Neddermann, P. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein / P. Neddermann, A. Clementi, R. de Francesco // *Journal of Virology*. – 1999. – v. 73. - № 12. – p. 9984-9991.
290. Neiderhauser, C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection/ C. Neiderhauser // *Journal of Blood Med.* – 2011. – v. 2. – p. 91-102. doi: 10.2147/JBM.S12899.
291. Neilsen, S.U. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients / S.U. Nelsen, M.F. Bassendine, B. A. Durt, C. Martin, W. Pumeechockchai, G.L. Toms // *Journal of Virology*. – 2006. – v. 80. - № 5. – p. 2418-2428.
292. Noordhoek, G.T. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories / G.T. Noordhoek, J.D. Van Embden, A.H. Kolk // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1996. – v. 34. - № 10. – p. 2522-2525.
293. Nowak, M.A. Viral dynamics in hepatitis B virus infection / M.A. Nowak, S.Bonhoeffer, A.M.Hill, R. Boehme, H.C. Thomas, H. McDade // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – №. 9. – P. 4398-4402.
294. Ohkawa, K. Long-term follow-up of hepatitis B virus and hepatitis C virus replicative levels in chronic hepatitis patients coinfectd with both viruses / K. Ohkawa, N. Hayashi, N. Yuki et al. // *Journal of medical virology*. – 1995. – V. 46. – №. 3. – P. 258-264.

295. Ohori, H. Antigenic conversion from HBcAg to HBeAg by degradation of hepatitis B core particles / H. Ohori, M. Yamaki, S. Onodera, E. Yamada, N. Ishida // *Intervirology*. – 1980. – V. 13. – №. 2. – P. 74-82.
296. Ohto, H. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group / H. Ohto, S. Terazawa, N. Sasaki, K. Hino, C. Ishivata, M. Kako, N. Ujiie, C. Endo, A. Matsui et al. // *N. Eng. J Med.* – 1994 Mar 17; 330(11):744-750.
297. Onozava, M. Progressive disappearance of anti-hepatitis B surface antigen antibody and reverse seroconversion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with previous hepatitis B virus infection / M. Onozava, S. Hashino, K. Izumiyama, K. Kahata, M. Chuma, A. Mori, T. Kondo, N. Toyoshima, S. Ota, S. Kobayashi, S. Hige, T. Toubai, J. Tanaka, M. Imamura, M. Asaka // *Transplantation*. – 2005. – v. 79. - № 5. – p. 616-619.
298. Ou, J. H. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen / J. H. Ou, O. Laub, W. J. Rutter // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1986. – V. 83. – №. 6. – P. 1578-1582.
299. Prado, M. Comparative study between occult hepatitis C virus infection and chronic hepatitis C / M. Prado, J.M. López-Alcorocho, E. Rodríguez-Iñigo, I. Castillo, V. Carreño // *J Viral Hepat.* – 2007. – v. 14. – p. 36-40.
300. Pawlotsky, J.M. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment / J.M. Pawlotsky // *Adv. Pharmacol.* – 2013. – v. 67. – p. 69-215.
301. Pei, S.N. Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-based regimens a serious complication in both HBsAg-positive and HBsAg-negative patients / S.N. Pei, C.H. Chen, C.M. Lee, M.C. Wang, M.C. Ma, T.H. Hu, C.Y. Kuo // *Annals of hematology*/ - 2010. – v. 89. - № 3. – p. 255-262.

302. Penna, A. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B / A. Penna, M. Artini, A. Cavalli, M. Levrero, A. Bertoletti, M. Pilli, F.V. Chisari, B. Rehermann, P.G. Del, F. Fiaccadori, C. Ferrari // *Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – v. 98. - № 5. – p. 1185.
303. Percivalle, E. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement / E. Percivalle, M.G.Revello, F. Vago et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1993. – V. 92. – №. 2. – P. 663-67
304. Perumal, V. Hepatitis C and hepatitis B nucleic acids are present in intrahepatic cholangiocarcinomas from the United States / V. Perumal, J. Wang, P. Thuluvath, M. Choti, M. Torbenson // *Human pathology*. – 2006. – v. 37. - № 9. – p. 1211-1216.
305. Pham, T.N. Hepatitis C virus persistence after sustained virological response to antiviral therapy in patients with or without past exposure to hepatitis B virus / T. N. Pham, C. S. Coffin, N.D.Churchill, S.J. Urbanski, S.S. Lee, T.I. Michalak // *Journal of viral hepatitis*. – 2012. – V. 19. – №. 2. – P. 103-111.
306. Pham, T.N.Q. Occult hepatitis C virus infection: what does it mean? / T.N.Q. Pham, C.S. Coffin, T.I. Michalak // *Liver International*. – 2010. – v. 30. - № 4. – p. 502-511.
307. Pham, T.N. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C / T.H. Pham, S.A. MacParland, P.M. Mulrooney, H. Cooksley, N.V. Naoumov, T.I. Michalak // *Journal of Virology*. – 2004. – v. 78. - № 11. – p. 5867-5874.
308. Pham, T.N.Q. Chronic hepatitis C and persistent occult hepatitis C virus infection are characterized by distinct immune cell cytokine expression profiles / T.N.Q. Pham, S.E. Merse, T.I. Michalak // *Journal of viral hepatitis*. – 2009. – v. 16. - № 8. – p. 547-556/

309. Pillonel, J. Evolution du risqué transfusionnel de transmission d'infections virales (VIH, VHC, VHB) entre 1992 et 2003 en France et impact du dépistage génomique viral / J. Pillonel, S. Laperche // *Euro Surveill.* – 2005. – v. 10. - № 2. – p. 1002-1223.
310. Pinato, D.J. Hepatitis B virus and lymphomagenesis: novel insights into an occult relationship / D.J. Pinato, D.Rossi, M.T. Minh et al // *Digestive and Liver Disease.* – 2012. – V. 44. – №. 3. – P. 235-238.
311. Plagemann, P. G. W. Hepatitis C virus / P. G. W Plagemann // *Archives of virology.* – 1991. – V. 120. – №. 3-4. – P. 165-180.
312. Pollicino, T. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels / T. Pollicino, G. Amaddeo, A. Restuccia, G. Raffa, A. Alibrandi, G. Cutroneo, A. Favaloro, S. Maimone, G. Squadrito, G. Raimondo // *Hepatology.* – 2012. – v. 56. - № 2. – p. 434-443.
313. Pollicino, T. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones / T. Pollicino, L. Belloni, G. Raffa, N. Pedicini, G. Squadrito, G. Raimondo, M. Levrero // *Gastroenterology.* – 2006. – v. 130. - № 3. – p. 823-837.
314. Pollicino, T. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patient with hepatocellular carcinoma / T. Pollicino, G. Raffa, L. Constantino, A. Lisa, C. Campello, G. Squadrito, M. Levrero, G. Raimondo // *Hepatology.* – 2007. – v. 45. - № 2. – p. 277-285.
315. Pollicino, T. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus / T. Pollicino, C. Saitta, G. Raimondo // *Carcinogenesis.* – 2011. – v. 32. - № 8. – p. 1122-1132.
316. Pollicino, T. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection / T. Pollicino, G. Squadrito, G. Cerenza, I. Cfcciola, G. Raffa, A. Craxi, F. Farinati, G. Missale, A. Smedile, C. Tiribelli, E. Villa, G. Raimondo // *Gastroenterology.* – 2004. – v. 126. - № 1. – p. 102-110.

317. Post, J.J. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort / J.J. Post, Y. Pan, A.J. Freeman, C.E. Harvey, P.A. White, P. Palladinetti, P.S. Haber, G. Marinos, M.H. Levy, J.M. Kaldor et al. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2004. – v. 189. - № 10. – p. 1846-1855.
318. Quint, W.G. Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection / W.G. Quint, R.A. Heijntink, J. Schirm, W.H. Gerlich, H.G. Niesters // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1995. – v. 33. - № 1. – p. 225-228.
319. Quiroga. J.A. Identification of serologically silent occult hepatitis C virus infection by detecting immunoglobulin G antibody to a dominant HCV core peptide epitope / J.A. Quiroga, I. Castillo, S. Llorente, J. Bartolomé, G. Barril, V. Carreño // *Journal Hepatology*. – 2009. – v. 50. – p. 256-263.
320. Quiroga. J.A. Combined hepatitis C virus (HCV) antigen-antibody detection assay does not improve diagnosis for seronegative individuals with occult HCV infection / J.A. Quiroga, I. Castillo, M. Prado, E. Rodríguez-Iñigo, V. Carreño // *J Clin Microbiol*. – 2006. – v. 44. – p. 4559-4560.
321. Quiroga, J.A. Tracking intrafamilial spread of serologically silent occult HCV infection through humoral and cellular HCV-specific responses / J.A. Quiroga, S. Llorente, I. Castillo, J. Bartolomé, G. Barril, V. Carreño // *J Hepatol* . – 2009 (suppl 2). V. 50. – P. S149.
322. Quiroga. J.A. Virus-specific T-cell responses associated with hepatitis C virus (HCV) persistence in the liver after apparent recovery from HCV infection / J.A. Quiroga, S. Llorente, I. Castillo, E. Rodríguez-Iñigo, J.M. López-Alcorocho, M. Prado, V. Carreño // *J Med Virol*. – 2006. – v. 78. – p. 1190-1197.
323. Radkowski, M. Evidence for viral persistence in patients who test positive for anti-hepatitis C virus antibodies and have normal alanine aminotransferase levels / M.

Radkowski, A. Horban, J.F. Gallegos-Orozco, A. Pawelczyk, J. Jablonska, J. Wilkinson, D. Adair, T. Laskus // *J Infect Dis.* – 2005. – v. 191. – p. 1730-1733.

324. Radkowski, M. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C / M. Radkowski, J.F. Gallegos-Orozco, J. Jablonska, T.V. Colby, B. Walewska-Zieleka, J. Kubicka, J. Wilkinson, D. Adair, J. Rakela, T. Laskus // *Hepatology.* – 2005. – v. 41. – p. 106-114.

325. Raimondo, G. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection / G. Raimondo, J.P. Allain, M.R. Brunetto, M.A. Buendia, D.S. Chen, M. Colombo, A. Craxi, F. Donato, C. Ferrari, G.B. Gaeta, W.H. Gerlich, M. Levrero, S. Locarnini, T. Michalak, M.U. Mondelli, J.M. Pawlotsky, T. Pollicino, D. Prati, M. Puoti, D. Samuel, D. Shouval, A. Smedile, G. Squadrito, C. Trepo, E. Villa, H. Will, A.R. Zanetti, F. Zoulim // *Journal of Hepatology.* – 2008. – v. 49. – p. 652-657.

326. Raimondo, G. Longitudinal evaluation reveals a complex spectrum of virological profiles in hepatitis B virus/hepatitis C virus-coinfected patients / G. Raimondo, M.R. Brunetto, P. Pontisso et al. // *Hepatology.* – 2006. – v. 43. - № 1. – p. 100-107.

327. Raimondo, G. Occult HBV infection / G. Raimondo, G. Caccamo, R. Filoma, T. Pollicino // *Semin Immunopathol.* – 2013. – v. 35. – p. 39-52. doi: 10.1007/s00281-012-0327-7

328. Raimondo, G. Hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection: additive players in chronic liver disease / G. Raimondo, G. Cacciamo, C. Saitta, // *Ann Hepatol.* – 2005. – v. 4. - № 2. – p. 100-106.

329. Raimondo, G. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease / G. Raimondo, G. Navarra, S. Mondello, L. Cosantino, G. Colloredo, E. Cucinotta, V.G. di C. Scisca, G. Squadrito, T. Pollicino // *Journal of Hepatology.* – 2008. – v. 48. - № 5. – p. 743-746.

330. Raimondo, G. Occult hepatitis B virus infection / G. Raimondo, T. Pollicino, I. Cacciola, G. Squadrito // *Journal of Hepatology.* – 2007. – v. 46. - № 1. – p. 160-170.

331. Raimondo, G. What is the clinical impact of occult hepatitis B virus infection? / G. Raimondo, T. Pollicino, G. Squadrito // *The Lancet*. – 2005. – v. 365. - № 9460. – p. 638-640.
332. Ramos, B. Changes in the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes over time in Spain according to HIV serostatus: implications for HCV therapy in HCV/HIV-coinfected patients / B. Ramos, M. Núñez, C. Toro, J. Sheldon, J. García-Samaniego, P. Ríos, V. Soriano // *J Infect*. – 2007. – V. 54. – P.173–179.
333. Ramsey, G. Blood component recalls in the United States / G. Ramsey, L.A. Sherman // *Transfusion*. – 1999. – V.39. – N.5. – P. 473-478.
334. Reed, K.E. Identification of the major phosphorylation of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321 / K.E. Reed, C.M. Rice // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – v. 274. - № 39. – p. 28011-29018.
335. Rehermann, B. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response / B. Rehermann, C. Ferrari, C. Pasquinelli, F.V. Chisari // *Nature Medicine*. – 1996. – v. 2. - № 10. – p. 1104-1108.
336. Rizzetto, M. Hepatitis delta virus as a global health problem / M. Rizzetto, A. Ponzetto, I. Forzani // *Vaccine*. – 1990. – V.8. - P. 10-14.
337. Ritchie, D. Reactivation of DNA viruses in association with histone deacetylase inhibitor therapy: a case series report / D. Ritchie, R.L. Piekarz, P. Blombery, L.J. Karai, S. Pittaluga, E.S. Jaffe, M. Raffeld, J.E. Janik, H.M. Prince, S.E. Bates // *Haematologica*. – 2009. – v. 94. - № 11. – p. 1618-1622.
338. Roger, P.M. Report of EPF A/NIBS C workhop «Nucleic asides amplification tests (NAT) for the detection of blood borne viruses» held on 31 October 1996 in Amsterdam. The Netherlands / P.M. Roger, J. Saldanha, J.P. Allain // *Vox Sanguinis*. – 1997. – V.72. – P. 199-206

339. Rossi, D. Occult hepatitis B virus infection of peripheral blood mononuclear cells among treatments-naïve patients with chronic lymphocytic leukemia / D. Rossi, L. Sala, R. Minisini, C. Fabris, E. Falletti, M. Cerri, M.E. Burlone, P. Toniutto. G. Gaidano, M. Pirisi // *Leukemia & Lymphoma*. – 2009. – v. 50. - № 4. – p. 604-611.
340. Rupp, D. Targets for antiviral therapy of hepatitis C. *Semin* / D. Rupp, R. Bartenschlager // *Liver Dis.* – 2014. – V. 34. - N.1. – P. 9-21.
341. Saiki, R.K. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona et al. // *Science*. – 1985. – v. 230. – p. 1350-1354.
342. Sakamuro, D. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells / D. Sakamuro, T. Furukawa, T. Takegami // *Journal of virology*. – 1995. – v. 69. - № 6. – p. 3893-3896.
343. Sanchez, M.J. Successful use of entecavir for a severe case of reactivation of hepatitis B virus following polychemotherapy containing rituximab / M.J. Sanchez, M. Buti, M. Homs, A. Palacios, F. Rodriguez-Frias, R. Esteban // *Journal of hepatology*. – 2009. – v. 51. - № 6. – p. 1091-1096.
344. Satake, M. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program / M. Satake, R. Taira, H. Yugi, S. Hino, K. Kanemitsu, H. Ikeda, K. Tadokoro // *Transfusion*. – 2007. – v. 47. - № 7. – p. 1197-1205.
345. Sato, S. Hepatitis B Virus Strains with Mutations in the Core Promoter in Patients with Fulminant Hepatitis / S. Sato, K. Suzuki // *Annals of Internal Medicine*. – 1995. - № 122. – p. 241-248.
346. Sato, S. Coinfection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B infection / S. Sato, S. Fujiyama, M. Tanaka et al. // *Journal of hepatology*. – 1994. – v. 21. - № 2. – p. 159-166.

347. Sato, S. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay / S. Sato, W. Ohhashi, H. Ihara, S. Sakaya, T. Kato, H. Ikeda // *Transfusion*. – 2001. – v. 41. - № 9. – p. 1107-1113.
348. Schaefer, S. Hepatitis B virus: significance of genotypes / S. Schaefer // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2005. – V. 12. – P. 111-124.
349. Schreiber, G.B. The risk of transfusion-transmitted viral infections / G.B. Schreiber, M.P. Busch, S.H. Kleinman et al. // *N. Eng. J Med.* – 1996. – v. 334. – p. 1685-1690/
350. Seed, C.R. A method for estimating the residual risk of transfusion-transmitted HBV infection associated with occult hepatitis B virus infection in a donor population without universal anti-HBc screening / C.R. Seed, P. Kiely // *Vox Sanguinis*. – 2013. – v. 105. - № 4. – p. 290-298. doi: 10.1111/vox.12060.
351. Seeger, C. The hepatitis B virus X protein: the quest for a role in viral replication and pathogenesis / C. Seeger // *Hepatology*. – 1997. – V. 25. – №. 2. – P. 496-498.
352. Semmo, N. T-cell responses and previous exposure to hepatitis C virus in indeterminate blood donors / N. Semmo, E. Barnes, C. Taylor, J. Kurtz, G. Harcourt, N. Smith, P. Klenerman // *Lancet*. – 2005. – v. 365. – p. 327-329.
353. Sheen, I.S. Role of hepatitis C virus infection in spontaneous hepatitis B surface antigen clearance during chronic hepatitis B virus infection / I.S. Sheen, Y.F. Liaw, C.M. Chu et al.// *Journal of Infectious Diseases*. – 1992. – v. 165. - № 5. – p. 831-834.
354. Shepard, C.W. Global epidemiology of hepatitis C virus infection / C.W. Shepard, L. Finelli, M.J. Alter // *The Lancet infectious diseases*. – 2005. – v. 5. - № 9. – p. 558-567.
355. Sheridan, D.A. Apolipoprotein-E and hepatitis C lipoviral particles in genotype 1 infection: Evidence for an association with interferon sensitivity / D.A. Sheridan, S.H. Bridge, D.J. Felmlee, M.M.E. Grossey, H.C. Thomas, S.D. Taylor-Robinson, G.L.

Toms, R.D.G. Neely, M.F. Bassendine // *Journal of Hepatology*. – 2012. – v. 57. – p. 32-38.

356. Shi, Y. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis / Y. Shi, Y.H. Wu, W.J. Zhang, J. Yang, Z. Chen // *Liver International*. – 2012. – v. 32. - № 2. – p. 231-240.

357. Slot, E. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. / E. Slot, B.M. Hogema, A. Riezebos-Brilman, T.M. Kok, M. Moler, H.L. Zaaijer // *Euro Surveill.* – 2013. – v. 18. - № 31. – p. 20550.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20550>.

358. Stramer, S.L. Viral diagnostics in the arena of blood donor screening / S.L. Stramer // *Vox Sang.* – 2004. – v. 87. (Suppl. 2). – p. 180-183.

359. Stramer, S.L. Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors / S.L. Stramer, U. Wend, D. Candotti, G.A. Foster, F.B. Hollinger, R.Y. Dodd, J.P. Allain, W. Gerlich // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – v. 364. - № 3. – p. 236-247.

360. Stramer, S.L. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? / S.L. Stramer, S. Zou, E.P. Notari, G.A. Foster, D.E. Krysztof, F. Musavi, R.Y. Dodd // *Transfusion*. – 2012. – v. 52. - № 2. – p. 440-446. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03283.x.

361. Su, F. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cell to apoptotic killing by tumor necrosis factor α / F. Su, R.J. Schneider // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – v. 94. - № 16. – p. 8744-8749.

362. Su, T.H. The clinical significance of occult hepatitis B transfusion in Taiwan—a look-back study / T.H. Su, P.J. Chen, T.C. Chen et al. // *Transfusion Medicine*. – 2011. – V. 21. – №. 1. – P. 33-41.

363. Suk, F.M. Replication advantage and host factor-independent phenotypes attributable to a common naturally occurring capsid mutation (I97L) in human hepatitis

B virus / F.M. Suk, M.H. Lin, M. Newman, S. Pan, S.H. Chen, J.D. Liu, C. Shih // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 23. – P. 12069-12077.

364. Taira, R. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan / R. Taira, M. Satake, S. Momose et al. // *Transfusion*. – 2013. – V. 53. - № 7. – p. 1393-1404.

365. Takacs, M. Epigenetic regulator of latent Epstein-Barr virus promoters / M. Takacs, F. Banati, A. Koroknai, J. Segesdi, D. Salomon, H. Wolf, H.H. Niller, J. Minarovits // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. – 2010. – v. 1799. - № 3. – p. 228-235.

366. Takaki, A. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C / A. Takaki, M. Wiese, G. Maertens, E. Depa, U. Seifert, A. Liebetrau, J.L. Miller, M.P. Manns, B. Rehermann // *Nature medicine*. – 2000. – v. 6. - № 5. – p. 578-582.

367. Tanaka, M. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma: a possible role of hepatitis B virus / M. Tanaka, H. Tanaka, H. Tsukuma, A. Ioka, A. Oshima, T. Nakahara // *Journal of viral hepatitis*. – 2010. – v. 17. - № 10. – p. 742-748.

368. Tang, H. Avian and Mammalian hepadnaviruses have distinct transcription factor requirements for viral replication / H. Tang, A. McLachlan // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 15. – P. 7468-7472.

369. Tanji, Y. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing / Y. Tanji, M. Hijikata, S. Satoh, T. Kaneko, K. Shimotohno // *Journal of Virology*. – 1995. – v. 69. - № 3. – p. 1575-1581.

370. Tanji, Y. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A / Y. Tanji, T. Kaneko, S. Satoh, K. Shimotohno // *Journal of Virology*. – 1995. – v. 69. - № 7. – p. 3980-3986.

371. Tennant, B. C. The woodchuck model of hepatitis B virus infection / B. C. Tennant, J. L. Gerin // *ILAR Journal*. – 2001. – V. 42. – № 2. – P. 89-102.
372. Terradillos, O. p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro / O. Terradillos, T. Pollicino, H. Lecoeur, M. Tripodi, M.L. Gougeon, P. Tiollais, M.A. Buenda // *Oncogene*. – 1998. – v. 17. – p. 2115-2123.
373. Toniutto, P. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C: relationship with donor age and fibrosis progression / P. Toniutto, R. Minisini, C. Fabris, F.T. De, F. Marangoni, M. Burlone, C. Avellini, D. Bitetto, E. Fornasiere, E. Fumolo, U. Baccarani, M. Pirisi // *Cln Transplant*. – 2009. – v. 23. – p. 184-190.
374. Torbenson, M. Occult hepatitis B / M. Torbenson, D.L. Thomas // *The Lancet infectious diseases*. – 2002. – v. 2. - № 8. – p. 479-486.
375. Toyoda, H. Changes in hepatitis C virus (HCV) antibody status in patients with chronic hepatitis C after eradication of HCV infection by interferon therapy / H. Toyoda, T. Kumada, S. Kiriya, Y. Sone, M. Tanikawa, Y. Hisanaga, T. Kuzuya, T. Honda, K. Hayashi, I. Nakano et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2005. – v. 40. - № 6. – p. e49-e54.
376. Tsai, J.F. Independent and additive effect modification of hepatitis C and B viruses infection on the development of chronic hepatitis / J.F. Tsai, J.E. Jeng, M.S. Ho et al. // *J Hepatology* – 1996. – V. 24. – P. 271-276.
377. Tsai, S-L. Cellular immune responses in patients with dual infection of hepatitis B and C viruses: Dominant role of hepatitis C virus / S-L. Tsai, Y.F. Liaw, C-T. Yeh et al. // *Hepatology*. – 1995. – v. 24. – p. 271-276.
378. Tseng, T.C. Determinants of Spontaneous Surface Antigen Loss in Hepatitis B e Antigen–Negative Patients with a Low Viral Load / T.C. Tseng, C.J. Liu, H.C. Yang, T.H. Su, C.C. Wang, C.L. Chen, S. F.T. Kuo, C.H. Liu, P.J. Chen, D.S. Chen, J.H. Kao // *Hepatology*. – 2012. - V. 55. - N. 1. - P. 68-76.

379. Tsukiyama-Kohara, K. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA / K. Tsukiyama-Kohara, N. Iizuka, M. Kohara, A. Nomoto // *Journal of Virology*. – 1992. – v, 66. – p. 1476-1483.
380. Twu, J.S. Activation of orotooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus / J.S. Twu, M.Y. Lai, D.S. Chen, W.S. Robinson // *Virology*. – 1993. –v. 192. – p. 346-350.
381. Umemura, T. Quantitative analysis of anti-hepatitis C virus antibody-secreting B cells in patients with chronic hepatitis C / T. Umemura, R.Y. Wang, C. Schechterly, J.W. Shih, K. Kiyosawa, H.J. Alter // *Hepatology*. – 2006. – V.43. – P.91–99.
382. Veerapu, N.S. Sporadic reappearance of minute amounts of hepatitis C virus RNA after successful therapy stimulates cellular immune responses / N.S. Veerapu, S. Raghuraman, T.J. Liang, T. Heller, B. Rehermann // *Gastroenterology*. – 2011. – v. 140. – p. 676-685.
383. Vento, S. Reactivation of replication of hepatitis B and C viruses after immunosuppressive therapy: an unresolved issue / S. Vento, F.Cainelli, M. S. Longhi // *The lancet oncology*. – 2002. – V. 3. – №. 6. – p. 333-340.
384. Vento, S. Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C / S. Vento, T. Garofano, C. Renzini et al. // *New England Journal of Medecine*. – 1998. – V. 338. - № 5. – p. 286-290.
385. Vermeulen, M. Hepatitis B virus transmission by blood transfusion during 4 years of individual-donation nucleic acid testing in South Africa: estimated and observed window period risk / M. Vermeulen, C. Dickens, N. Lelie, E. Walker, C. Coleman, M. Keyter, R. Reddy, R. Crookes, A. Kramvis // *Transfusion*. – 2012. – v. 52. – p. 880-892.
386. Vigano, M. Risk of hepatitis B surface antigen seroreversion after allogeneic hematopoietic SCT / M. Vigano, C. Vener, P. Lampertico, C. Annaloro, C. Pichoud, F. Zoulim, F. Facchetti, F. Poli, M. Scalamogna, G.L. Deliliers, M. Colombo // *Bone marrow transplantation*. – 2011. – v. 46. - № 1. – p. 125-131.

387. Vivekanandan, P. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples / P. Vivekanandan, R. Kannangai, S.C. Ray, D.L. Thomas, M. Torbenson // *Clinical infectious diseases*. – 2008. – v. 46. - № 8. – p. 1227-1236.
388. Vivekanandan, P. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression / P. Vivekanandan, R. Kannangai, Thomas, M. Torbenson // *Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – v. 199. - № 9. – p. 1286-1291.
389. Wands, J.R. Liver physiology and disease. Serial studies of hepatitis associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders / J.R. Wands, C.M. Chura, F.J. Roll, W.C. Maddrey // *Gastroenterology*. – 1975. – v. 68. – p. 105-112.
390. Wang, Y. Testing for hepatitis B infection in prospective chemotherapy patients: A retrospective study / Y. Wang, X.M. Luo, D. Yang, J. Zhang, H.Y. Zhuo, J. Zhang, Y. Jiang // *World J Gastroenterol*. – 2013. – V.19. – N.6. – P. 923-930.
391. Wang, C. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism / C. Wang, P. Sarnow, A. Siddiqui // *Journal of Virology*. – 1993. – v. 67. – p. 3338-3344.
392. Wasley, A. The Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in the United States in the Era of Vaccination / A. Wasley, D. Kruszon-Moran, W. Kuhnert, E.P. Simard, L. Finelli, G. McQuillan, B. Bell // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – v. 202. - № 2. – p. 192-201.
393. Weber, B. Genetic variability of the gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact / B. Weber // *Journal of Clinical Virology*. – 2005. – v. 32. - № 2/ - p. 102-112.
394. Weber, G. Identification of foreign gene sequences by transcript filtering against the human genome / G. Weber, J. Shendure, D.M. Tanenbaum et al. // *Nature genetics*. – 2002. – V. 30. – №. 2. – P. 141-142.

395. Weller T. H., Enders J. F. Production of hemagglutinin by mumps and influenza A viruses in suspended cell tissue cultures / Weller T. H., Enders J. F. // *Experimental Biology and Medicine*. – 1948. – V. 69. – №. 1. – P. 124-128
396. Werle-Lapostolle, B. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy / B. Werle-Lapostolle, S. Bowden, S. Locarnini, K. Wurstrorn, J. Petersen, G. Lau, C. Trepo, P. Marcellin, Z. Goodman, W.E. Delaney, S. Xiong, C.L. Brosgart, S.S. Chen, C.S. Gibbs, F. Zoulim // *Gastroenterology*. – 2004. – v. 126. – p. 1750-1758.
397. World Health Organization. Hepatitis B Fact sheet, July 2012. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed November 1, 2012.
398. Wittkop, L. Inhibition of protein kinase C phosphorylation of hepatitis B virus capsids inhibits virion formation and causes intracellular capsid accumulation / L. Wittkop, A. Schwarz, A. Cassany, S. Grün-Bernhard, M. Delaleau, B. Rabe, C. Cazenave, W. Gerlich, D. Glebe, M. Kann // *Cell Microbiol.* – 2010. – V. 12. – P.962–975.
399. Wong. D.K. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma / D.K. Wong, F.Y. Huang, C.L. Lai, R.T. Poon, W.K. Seto, J. Fung, I.F. Hung, M.F. Yuen // *Hepatology*. – 2011. – v. 54. – p. 829-836.
400. Wynne, S. A. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid / S. A. Wynne, R. A. Crowther, A. G. W. Leslie // *Molecular cell*. – 1999. – V. 3. – №. 6. – P. 771-780.
401. Yaginuma, K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell system by transient expression of transfected HBV DNA / K. Yaginuma, Y. Shirakata, M. Kobayashi, K. Koike // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1987. – v. 84. - № 9. – p. 2678-2682.

402. Yamashita, T. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region / T. Yamashita, S. Kaneko, Y. Shiota, W. Qin, T. Nomura, K. Kobayashi, S. Murakami // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – v. 273. – p. 15479-15486.
403. Yan, H. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus / H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, W. Li // *Elife* / - 2012. – № 1. – p. 00049.
404. Yan, Y.W. Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2+2 angstrom resolution structure in a hexagonal crystal form / Y.W. Yan, Y. Li, S. Munshi, V. Sardana, J.L. Cole, M. Sardana, C. Steinkuehler, L. Tomei, R. de Francesco, L.C. Kuo, Z.G. Chen // *Protein Science*. – 1998/ - v/ 7. – p. 837-847.
405. Yao, N. Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain / N. Yao, T. Hesson, M. Cable, Z. Hong, A.D. Kwong, H.V. Le, P.C. Weber // *Nature Structural Biology*. – 1997. – v. 4. – p. 463-467.
406. Yasui, K. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein / K. Yasui, T. Wakita, K.K. Tsukiyama, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J.R. Wands, M. Kohara // *Journal of Virology*. – 1998. – v. 72. – p. 6048-6055.
407. Yeo, W. Hepatitis B virus reactivation in lymphoma patients with prior resolved hepatitis B undergoing anticancer therapy with or without rituximab / W. Yeo, T.C. Chan, N.W. Leung, W.Y. Lam, F.K. Mo, M.T. Chu, H.L. Chan, E.P. Hui, K.L. Lei, T.S. Mok, P.K. Chan // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – v. 27. - № 4. – p. 605-611.
408. Yoshikawa, A. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. HBV NAT positive [corrected] blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA / A. Yoshikawa, Y. Gotanda, M. Itabashi, K. Minegishi, K. Nishioka // *Vox Sang*. – 2005. –v. 88. - № 2. – p. 77-86.

409. Yu, M.Y.W. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma / M.Y.W. Yu, B. Bartosch, P. Zhang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – v. 101. - № 20. – p. 7705-7710.
410. Yuan, Z.H. Expression, purification, and partial characterization of HCV RNA polymerase / Z.H. Yuan, U. Kumar, H.C. Thomas, Y.M. Wen, J. Monjardino // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1997. – v. 232. - № 1. – p. 231-235.
411. Yuen, M.F. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection / M.F. Yuen, D.K. Wong, C.K. Lee et al. // *Clin Infect Dis*. – 2011. – v. 52. – p. 624-632.
412. Yuge, A. Persistent hepatitis associated with chronic active Epstein-Barr virus infection / A. Yuge, E. Kinoshita, M. Moriuchi et al. // *The Pediatric infectious disease journal*. – 2004. – V. 23. – №. 1. – P. 74-76.
413. Yuki, N. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B / N. Yuki, T. Nagaoka, M. Yamashiro, K. Kaneko, K. Yamamoto, M. Omura, K. Hikiji, M. Kato // *Hepatology*. – 2003. – v. 37. – p. 1172-1179.
414. Zaaijer, H.L. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus / H.L. Zaaijer, H.T. Cuyppers, H.W. Reesink, I.N. Winkel, G. Gerken, P.N. Lelie // *Lancet*. – 1993. – v. 341. – p. 722-724.
415. Zaghloul, H. Detection of occult hepatitis C and hepatitis B virus infections from peripheral blood mononuclear cells / H. Zaghloul, W. El-Sherbiny // *Immunological investigations*. – 2010. – v. 39. - № 3. –p. 284-291.
416. Zekri, A.R. Risk factors for cytomegalovirus, hepatitis B and C virus reactivation after bone marrow-transplantation / A.R. Zekri, W.S. Mohamed, M.A. Samra, G.M. Sherif, A.M. El-Shehaby, M.H. El-Sayed // *Transpl Immunol*. – 2004. – v. 13. – p. 305-311.

417. Zerbini, A. The characteristic of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection / A. Zerbini, M. Pilli, C. Boni, P. Fisicaro, A. Penna, V.P. Di, T. Giuberti, A. Orlandini, G. Raffa, T. Pollicino, G. Raimondo, C. Ferrari, G. Missale // *Gastroenterology*. – 2008. – v. 134. - № 5. – p. 1470-1481.
418. Zhong, J. Robust hepatitis C virus infection in vitro / J. Zhong, P. Gastaminza, G. Cheng, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – v. 102. - № 26. – p. 9294-9299.
419. Zou, S. Donor testing and risk: current prevalence, incidence, and residual risk of transfusion-transmissible agents in US allogeneic donations / S. Zou, S.L. Stramer, R.Y. Dodd // *Transfusion medicine reviews*. 2012. – v. 26. - № 2. – p. 119-128.
420. Zoulim, F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA / F. Zoulim // *Journal of Hepatology*. – 2005. – v. 42. - № 3. – p. 302-308.

Приложения

Приложение 1

АКТ ОТСТРАНЕНИЯ ОТ ДОНОРСТВА

От _____ № _____

Группа крови _____ Резус-фактор _____ Эритроциты _____

Дата регистрации _____

ФИО донора _____

Дата рождения _____ Паспорт _____

Адрес _____

Категория донора: _____

Дата последней донации _____

Номер донации _____

Результат клинико-лабораторного исследования _____

Характеристика случая экспертизы: 1- допустить до донации, 2- отстранить от донорства.

Причина: наличие противопоказаний к донорству: абсолютные – 1, не выявлены - 2

Предмет экспертизы: результат клинико-лабораторного исследования крови донора _____

Скрининг _____ Подтверждение _____ Другое _____

Дефекты, нарушения, ошибки _____

Заключение экспертов: 1- допустить до донации, 2- отстранить от донорства, 3- другое.

Составил - врач _____ (_____)

СОГЛАСИЕ донора крови и (или) ее компонентов

ФИО донора

на проведение расширенного исследования образцов его крови, на маркеры вирусного гепатита В

(анти-НВс_{ге}) без увеличения объема изъятой крови.

Рутинная диагностика инфекции, вызванной вирусом гепатита В, основана на определении в сыворотке или плазме крови поверхностного антигена вируса -- НВsAg. Но в состав вирусной частицы входят и другие антигены.

Один из них - НВс_{ге}-антиген (НВсAg) - ядерный антиген вируса гепатита В, который не определяется в сыворотке или плазме крови в свободном виде, а содержится только в клетках печени. Этот антиген обладает сильными иммуногенными свойствами, то есть вызывает активное образование в организме специфических антител, так называемых анти-НВс_{ге}. Эти антитела образуются только в случае заражения. Они не образуются, как результат вакцинации против вируса гепатита В. Эти антитела появляются вскоре после заражения вирусом гепатита В и могут обнаруживаться в сыворотке крови вслед за появлением НВsAg.

Анти-НВс сохраняются в крови человека, который перенес инфекцию, даже если она прошла бессимптомно. Таким образом, наличие этих антител в крови может являться как признаком текущего, так и перенесенного ранее вирусного гепатита В.

Кровь, заготовленная от донора, который перенес (даже бессимптомно) вирусный гепатит В, может представлять потенциальную угрозу для пациентов, получающих иммуносупрессивную или химиотерапию. Этот факт определяет особые требования безопасности донорской крови и (или) ее компонентов для гематологических пациентов.

Я согласен с тем, что в случае получения положительного результата при исследовании моего образца крови на маркеры вирусного гепатита (анти-НВс) я буду отстранен от донорства
Да Нет.

Я прочитал (а) и понял (а) прочитанное. У меня была возможность задать любой вопрос и все ответы меня удовлетворили.
Да Нет

Я согласен(а) на донацию крови и/или ее компонентов.

Я согласен(а) с тем что моя кровь будет обследована на маркеры инфекционных заболеваний.

Я понимаю, что моя кровь не будет перелита пациенту в случае обнаружения маркеров инфекционных заболеваний.
Да Нет

Я осознаю, что буду проинформирован о результатах тестов, которые могут иметь значение для моего здоровья.
Да Нет

Я согласен(а) с тем, что часть моей крови и мои деперсонифицированные данные из банка крови будут использованы для научных изысканий с целью сделать трансфузии компонентов крови безопасными и эффективными.

Так же я проинформирован(а), что, если научные исследования обнаружат нарушения, которые могут быть значимыми для моего здоровья, я буду оповещен(а). Да Нет

Я заявляю, что вся информация, которую я предоставил(а), является правдой, насколько мне известно.

Я согласен (а) получать смс оповещение и email - рассылку, о результате моих анализов и другой информации для доноров ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Да Нет

Согласен(а) с предложенным планом обследования

Дата.

(подпись).

**Карта инициации эпидемиологического расследования случая вероятного
трансфузионного инфицирования вирусом гепатитов В или С пациента ФГБУ «НМИЦ
гематологии» Минздрава России**

1. Данные пациента ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, у которого впервые обнаружены маркеры вируса гепатита В или С	
1.1 Ф.И.О. пациента полностью	
1.2 Пол	
1.3 Возраст	
1.4 Отделение	
1.5 Основной диагноз	
1.6 Доп. информация	
1.7 Проживает (зарегистрирован) по адресу	

2. Сбор данных по инфекционным маркерам			
2.1 Дата первичного выявления лабораторных маркеров вирусов гепатитов В и/или С			
2.2 Какие маркеры были выявлены:			
2.3 Результаты исследования на остальные маркеры вирусных гепатитов			
Дата	Тест (мнемоника, код)	Результат исследования	Серия реагентов
Маркеры вируса гепатита В			
	HBsAg		
	ДНК ВГВ		
	ДНК ВГВ количественно		
	а-HBs		
	а-HBc		
	а-HBc-IgM		
	HBeAg		

	a-HBe		
Маркеры вируса гепатита С			
	a-BГC		
	РНК ВГC		
	РНК ВГC количественно		
	Генотип ВГC		

3. Расчет даты вероятного инфицирования пациента						
3.1 Период вероятного инфицирования:						
Если разница в датах больше 6 месяцев произвести поиск архивных образцов крови от пациента независимо от назначенных исследований:						
3.2 Архивные образцы плазмы/сыворотки						
Пробы крови от пациента за период вероятного инфицирования	Даты					
	№№ заявок:					
	№№ по журналу					
Провести дополнительное исследование образцов крови пациента внутри периода вероятного инфицирования.						
3.3 Расчётная дата вероятного инфицирования (РДВИ) (Дата обнаружения маркера в архивном образце минус 90 дней, заполняется вручную после исследования архивных образцов. Если обнаружить маркер в архивных образцах не удалось, РДВИ вычисляется, как дата первого обнаружения маркера минус 90 дней)						

Инициатор эпидемиологического расследования
(Пользователь, сформировавший карту инициации эпидрасследования)

Карта эпидемиологического расследования случая вероятного трансфузионного инфицирования вирусом гепатит В или С пациента ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

1. Данные пациента, у которого впервые обнаружены маркеры вируса гепатита В или С	
1.1 Ф.И.О. пациента полностью	
1.2 Пол	
1.3 Возраст	
1.4 Отделение	
1.5 Основной диагноз	

1.6 Доп. информация	
1.7 Проживает (зарегистрирован) по адресу	

2. Сбор данных по инфекционным маркерам	
2.1 Дата первичного выявления лабораторных маркеров вирусов гепатитов В и/или С	
2.2 Какие маркеры были выявлены:	

3. Расчет периода вероятного инфицирования пациента	
3.1 Расчетная дата вероятного инфицирования, РДВИ (берётся из карты инициации эпидемиологического расследования)	диалоговое окно
3.2 При инициации эпидемиологического расследования в архивных образцах был выявлен следующий маркер:	
Заполняется вручную (диалоговое окно)	
3.3 Период вероятного инфицирования	РДВИ

4. Поиск трансфузионного источника инфицирования						
4.1 Трансфузионный анамнез пациента в период вероятного инфицирования						
Дата трансфузии	Трансфуз. среда	Донация		Ф.И.О. донора	Есть ли последующие донации, спустя 90 и более дней после РДВИ (да/нет), дата	
		дата	номер		дата	номер
4.2 Доноры, впоследствии отстраненные по причине выявления маркеров вирусных гепатитов						
№ донора		Ф.И.О.		Выявленные маркеры вирусных гепатитов		

Если маркеры, выявленные у донора и у больного, относятся к одному вирусу (либо к вирусу гепатита В, либо к вирусу гепатита С), считать источником инфицирования данного донора	
а. Доноры без последующих донаций (если стоит «нет» в последней графе п.4.1), которые должны быть приглашены на обследование	
№ донора	Ф.И.О. доноров, которых требуется вызвать для обследования, телефон
В случае отсутствия доноров без последующих донаций (то есть все доноры успешно прошли период серонегативного окна и не были отведены по маркерам гепатитов), констатируется, что трансфузионный путь инфицирования исключен	

2. Поиск других возможных случаев трансфузионной передачи				
5.1 Реципиенты компонентов крови, заготовленной от доноров, причастных к эпидемиологическому расследованию				
Ф.И.О. пациента	Отделение	Дата трансфузии, компонент	Ф.И.О. донора, от кого заготовлен компонент	Дата заготовки
Результаты реципиента до трансфузии				
Результаты реципиента после трансфузии				
Ф.И.О. пациента	Отделение	Дата трансфузии, компонент	Ф.И.О. донора, от кого заготовлен компонент	Дата заготовки
Результаты реципиента до трансфузии				
Результаты реципиента после трансфузии				

...
Заключение

Заместитель генерального директора

ФИО

Инициатор эпидемиологического расследования

ФИО