© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Исаева О.В.[1,2], Ильченко Л.Ю.[1,2], Кичатова В.С.[1,2], Потемкин И.А.[1,2], Амон Е.П.[1], Сарыглар А.А.[3], Аль-Шараби Шукри А.С.[4], Кюрегян К.К.[1,2], Михайлов М.И.[1,2]

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТОВ В И D В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ И СУХОЙ КАПЛЕ КРОВИ

[1]ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, 125993, МоскваРоссия;
[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;
[3] ГБУЗ РТ «Инфекционная больница»,667003, Кызыл, Республика Тыва, Россия;
[4] ФГАОУ ВО «Российский университет Дружбы народов», 117198, Москва, Россия

Целью данного исследования явилась оценка частоты выявления основных маркёров инфицирования вирусами гепатитов В и дельта (D) в сыворотке крови, слюне и сухой капле крови (СКК) как возможного варианта для серологических исследований среди населения эндемичного региона в условиях ограниченных лабораторных ресурсов. Для этого исследованы парные образцы сыворотки крови и СКК, сыворотки крови и слюны от больных хроническим гепатитом В с дельта-агентом, проживающих в Республике Тыва, которая является эндемичным по данному заболеванию регионом. В образцах сыворотки крови HBsAg выявлен у 289 (100%) больных, в образцах слюны – у 88/92 (95,7%), в образцах СКК, хранившихся при комнатной температуре 3 года – в 60/80 (75%), образцах СКК, хранившихся в тех же условиях 1 год – в 111/117 (94,9%). Анти-HBcore определили в 209 (100%) образцах сыворотки крови, в то время как в образцах слюны и СКК этот маркёр выявили только в 13,04% (12/92) и 19,7% (23/117), соответственно. Анти-ВГD в сыворотке крови присутствовали в 209 (100%) образцах, собранных от пациентов в 2017-2018 гг. В образцах слюны и СКК антитела к вирусу ГD не были выявлены ни в одном случае. По-видимому, такая разница в выявлении антител к HBcAg и анти-ВГD обусловлена тем, что белок core является более сильным иммуногеном, приводящим к выработке анти-HBcore в высокой концентрации. Вероятно, концентрация антител к вирусу гепатита D значительно ниже, что объясняет их отсутствие в слюне и СКК у больных ХВГ В+D. Образцы биологических сред организма (слюна), а также сухая капля крови могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg не только при скрининге, но и в научных лабораторных исследованиях. В то же время определение анти-ВГD не представляется возможным в связи с получением ложноотрицательных результатов. Ввиду высокой вероятности суперинфицирования вирусом ГD больных с ХГВ на эндемичных территориях, в случае выявлении HBsAg в альтернативных клинических материалах (слюна, СКК) маркеры инфицирования ВГD следует определять в сыворотке крови.

Ключевые слова: *гепатит В; гепатит D; HBsAg; анти-HBcore; анти-ВГD; выявление серологических маркеров; лабораторные исследования.*

Для цитирования: *Исаева О.В., Ильченко Л.Ю. Кичатова В.С., Потемкин И.А., Амон Е.П., Сарыглар А.А., Аль-Шараби Шукри А.С., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D в биологических средах и сухой капле крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 95-99. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99*

Isaeva O.V.[1,2], Ilchenko L.Yu.[1,2], KichatovaV.S.[1,2], Potemkin I.A.[1,2], Amon E.P.[2], Saryglar A.A.[3], Al-Sharabi Shukri A.S.[4], Kyuregyan K.K.[1,2], Mikhailov M.I.[1,2]

DETECTION OF MARKERS OF HEPATITIS B AND D VIRUS INFECTION IN BIOLOGICAL MEDIA AND DRIED BLOOD SPOTS

[1]Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, 125993, Moscow, Russia;
[2] Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;
[3] Infectious Hospital, 667003, Kyzyl, Republic Tyva, Russia;
[4] Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia

The aim of this study was to assess the rates of detection of the major markers of infection with hepatitis B and Delta (D) viruses in serum, saliva and dry blood dots (DBS) as a possible option for serological studies among the population of the endemic region in conditions of limited laboratory resources. For this purpose, paired samples of blood serum and DBS, blood serum and saliva from patients with chronic hepatitis B with Delta agent living in the Republic of Tyva, which is endemic for this disease. HBsAg was detected in 289 (100%) serum samples, in 88/92 (95.7%) saliva samples, in 60/80 (75%) DBS samples, stored three years at room temperature, and in 111/117 (94.9%) DBS stored one year at the same conditions. Anti-HBcore was detected in 209 (100%) serum samples, while in saliva and DBS samples this marker was detected in only 13.04% (12/92) and 19.7% (23/117), respectively. Anti-HDV antibodies in serum were detected in 209 (100%) samples collected from patients in 2017-2018. In saliva and DBS anti-HDV were not detected in any sample. This difference in the detection rates of anti-HBcore and anti-HDV might be accounted for the fact that the HBV core protein is a very strong immunogen, indusing the production of anti-HBcore in high concentrations. Probably, the concentration of anti-HDV is much lower, which explains its absence in saliva and DBS in patients with hepatitis B+D. Samples of biological media (saliva), as well as DBS can serve as an alternative material for the detection of HBsAg in screening and research prevalence studies. Meanwhile, the definition of anti-HDV in such media is not possible due to the false negative results. Due to the high probability of superinfection with HDV in patients with HBV in endemic areas, the detection of HBsAg in alternative media (saliva or DBS) should be followed by testing for anti-HDV in serum samples.

Keywords: *hepatitis B; hepatitis D; HBsAg; anti-HBcore; anti-HDV; detection of serological markers; laboratory tests.*

Для корреспонденции: *Исаева Ольга Владиславовна*, канд. биол. наук, вед. науч.сотр. НИИ молекулярной и персонализированной медицины, вед. науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов НИИВС им. И.И. Мечникова; e-mail: isaeva.06@mail.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99

For citation*: Isaeva O.V., Ilchenko L.Yu., Kichatova V.S., Potemkin I.A., Amon E.P., Saryglar A.A., Al-Sharabi Shukri A.S., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Detection of markers of hepatitis B and D virus infection in biological media and dried blood spots. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 95-99. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99*

For correspondence: *Isaeva O.V.,* PhD. Sci. Biol., leading researcher of the research Institute of molecular and personalized medicine at Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, lead researcher of laboratory of viral hepatitis "I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera"; e-mail: isaeva.06@mail.ru

Information about authors:

Isaeva O.V., https://orcid.org/0000-0002-2656-3667
Kyuregyan K.K., http://orcid.org/0000-0002-3599-117X
Potemkin I.A., https://orcid.org/0000-0001-7559-4219
КичатоваV.S., http://orcid.org/0000-0002-7838-6965
Mikhailov M.I., https://orcid.org/0000-0002-6636-6801

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgments. *The study was carried out within the framework of the State task on the theme: Development of a modern system of diagnosis, treatment and prevention of viral hepatitis B, C and D.*

Received 15.12.2019
Accepted 26.12.2020

Введение. Хронический гепатит В с дельта агентом (ГВ+D) является тяжелым заболеванием печени вирусной этиологии, приводящим к быстрому прогрессированию в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному [1]. Механизмы патогенного действия ВГD, связанные с более тяжелым течением заболевания печени и ускоренным развитием фиброза по сравнению с моноинфекцией ВГВ, остаются неясными [2]. Как и ВГВ, вирус гепатита D передается при контакте с кровью или другими физиологическими жидкостями инфицированного человека [3]. Известно, что в инфицированном вирусом гепатита дельта организме больного хроническим гепатитом В одновременно циркулируют антитела к антигенам обоих возбудителей – анти-ВГD, анти-HBcore, а также обязательно наличие HBsAg. Можно предположить, что анти-ВГD, наряду с маркерами ГВ, присутствуют и в образцах слюны и сухой капли крови СКК больных ГВ+D, однако исследования по выявлению анти-ВГD в таких образцах ранее не проводились. Очевидно, что биологический материал инфицированного человека (например, образцы слюны или СКК) могут служить объектом исследования как в серологических, так и в молекулярных тестах. Такие альтернативные типы клинических образцов преимущественно используются для диагностики и мониторинга терапии хронических вирусных заболеваний, таких как вирусные гепатиты В и С, ВИЧ в регионах, где дорогостоящая лабораторная медицинская инфраструктура на местах не может быть предоставлена по экономическим причинам, а также в силу удаленности от крупных лабораторий [4-8]. Тестирование с использованием образцов сухой капли крови намного проще и не требует удаления клеточных компонентов [5,6]. HBsAg и анти-HBcore успешно выявляются и в слюне, однако результаты могут различаться в зависимости от методики сбора ротовой жидкости и метода обнаружения маркера [9-12]. В РФ подобные исследования впервые были проведены еще в 1997 году [13], их результаты продемонстрировали, что HBsAg и анти-HBcore стабильно выявляются в парных образцах слюны и сыворотки крови при хранении при температуре +4°С в течение одного месяца. Ранее было показано, что результаты выявления HBsAg и анти-HBcore в слюне и СКК могут зависеть от срока хранения образцов, однако опубликованные данные по этому вопросу ограничены периодом хранения, не превышавшим 200 дней [14].

Целью данного исследования являлась оценка частоты выявления маркеров ГВ+D в архивных образцах слюны и СКК по сравнению с образцами сыворотки крови. Для этого исследованы пары образцов сыворотки крови и СКК, а также пары образцов сыворотки крови и слюны от больных хроническим гепатитом В+D, проживающих в Республике Тыва, которая является эндемичным по данному заболеванию регионом [15 – 17]. Все материалы были собраны в 2016-2018 гг. и хранились 1-3 года в соответствующих условиях – образцы СКК при комнатной температуре, образцы сыворотки и слюны – при -70°С.

Материал и методы. Исследованы 289 архивных парных образцов сыворотки крови, 92 образца слюны и 197 образцов сухой капли крови (СКК), собранных в 2016, 2017 и 2018 гг. от больных хроническим гепатитом В с D агентом (ХГ В+D), состоящих на учёте в консультативном кабинете (КК) ГБУЗ Инфекционной больницы Республики Тыва. Образцы сыворотки крови (2016-2018 гг.) и слюны (2017 г.) были доставлены в лабораторию с соблюдением холодовой цепи и хранились при температуре -70° С, а образцы СКК, собранные в 2016 г. и 2018 г. – при комнатной температуре (22-25°С) 3 года и 1 год, соответственно.

Во всех образцах сыворотки крови, слюны и СКК определяли HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» («HBsAg-ИФА-БЕСТ» «Вектор HBcAg-антитела» и «Вектогеп D-антитела») согласно инструкции производителя. Для образцов СКК при расчете оптической плотности в качестве отрицательного контроля использовали образцы СКК, полученные от HBsAg-негативных лиц.

Для проведения исследования образцы слюны после оттаивания центрифугировали при 4 000 об/мин в течение 5 мин, супернатант переносили в чистую пробирку. Для работы с СКК вырезали из листа фильтровальной бумаги с сухой каплей крови участок площадью примерно 1 см². Помещали образец СКК в чистую пробирку с 1 мл фосфатно-солевого буфера с твином. Затем проводили ночную инкубацию при комнатной температуре на шейкере. Центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 2 минут. Супернатант использовали для проведения ИФА.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы EXCEL 2003 и программы статистической обработки данных GraphPad Prism 4. Для оценки достоверности различий значений

показателей в сравниваемых группах использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% – $p < 0,05$).

Результаты. Результаты выявления HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD в парных образцах сыворотки крови и слюны, собранных от пациентов с хроническим гепатитом В + D и хранившихся в течение 2-х лет при -70°С, представлены в табл. 1. В образцах сыворотки крови HBsAg выявлен у 92 (100%) больных, средняя величина коэффициента позитивности – 35,27±8,69, в парных им образцах слюны – в 88/92 (95,7%), средняя величина коэффициента позитивности составила 26,7±14,87 и не отличалась достоверно от аналогичного показателя для образцов сыворотки крови ($p > 0,05$). При этом необходимо отметить отсутствие корреляционной зависимости между показателями коэффициента позитивности при выявлении данного маркера инфицирования в парных образцах сыворотки крови и слюны ($r^2 = 0,084$). Частота выявления суммарных анти-HBcore в образцах слюны составила 13,04% от аналогичного в парных образцах сыворотки крови (100%), различия статистически достоверны ($p < 0,05$). Средняя величина коэффициента позитивности для данного маркера в сыворотке крови составила 0,043±0,008, в образцах слюны – 0,48±0,035 ($p < 0,05$). Корреляционная зависимость между показателями коэффициента позитивности анти-HBcore в парных образцах сыворотки крови и слюны также отсутствовала ($r^2 = 0,084$). Суммарные анти-ВГD определяли в парных образцах сыворотки крови и образцах слюны. Процент выявления составил 100% (92/92) в сыворотках против 0% (0/92) в образцах слюны ($p < 0,05$).

Результаты серологических исследований по выявлению маркеров ГВ+D в парных образцах сыворотки и сухой капли крови (СКК), собранных в 2016 и 2018 г. (сроки хранения при комнатной температуре 3 и 1 год, соответственно) представлены в табл. 2. В сыворотке крови частота выявления HBsAg составила 100% и не зависела от срока хранения. При аналогичных исследованиях образцов сухой капли крови, хранившихся 3 года, частота выявления была достоверно ниже ($p < 0,05$) и составила 75% (60/80), в образцах, хранившихся 1 год, таких различий нет (94,9% против 100%, $p > 0,05$). Среднее значение коэффициентов позитивности при выявлении HBsAg в образцах сыворотки и СКК (3 года хранения) достоверно отличаются ($p < 0,05$), в образцах после одного года эти показатели для образцов сыворотки и СКК схожи ($p < 0,05$). Корреляционная зависимость между показателями коэффициента позитивности по HBsAg в парных образцах сыворотки и СКК не выявлена ($r^2 = 0,02$). Результаты выявления анти-HBcore и антител к вирусу гепатита дельта в образцах СКК проведены только для образцов, хранившихся 1 год. В сыворотке крови анти-HBcore выявлены в 100% случаев (117/117), а в образцах СКК только в 19,7% (23/117), различия статистически достоверны ($p< 0,05$). Корреляционная зависимость между показателями коэффициентов позитивности анти-HBcore в парных образцах сыворотки крови и СКК отсутствовала ($r^2 = 0,028$). Анти-ВГD были выявлены во всех 117 образцах сыворотки крови после одного года хранения при -70°С, в то время как во всех парных им образцах СКК был получен отрицательный результат (0/117), различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Обсуждение. В последнее время образцы СКК используются для изучения распространенности ВГВ в эндемичных районах и в группах повышенного риска инфицирования [18 – 20]. Одна из задач нашего исследования заключалась в определении зависимости частоты выявления основных маркеров инфицирования вирусом гепатита В (HBsAg и анти-HBcore) в парных архивных образцах слюны, сухой капли крови и сыворотки крови в зависимости от длительности их хранения. Результаты выполненного исследования показали, что в образцах сыворотки крови, хранившихся при температуре -70°С, HBsAg выявляется в 100% случаев, независимо от сроков хранения (3 года).

Ранее J.C.Forbi и соавт. [19] сообщали о низкой чувствительности обнаружения HBsAg в СКК по сравнению с образцами сыворотки (78,6%) . В нашем исследовании не отмечена статистически значимая разница в частоте выявления HBsAg между парными образцами сыворотки крови и СКК, хранившимися 1 год при комнатной температуре (100% против 94,9%). Данное наблюдение подтверждается исследованиями L.M. Villar и соавт. [20], которые описывают применение ИФА для определения HBsAg в образцах СКК с клинической чувствительностью 97,62% . В нескольких исследованиях было показано, что образцы СКК остаются стабильными с течением времени, без каких-либо изменений результатов выявления HBsAg до 63 дней после отбора проб при любых температурах хранения [21,22]. Однако, как показали наши исследования, при длительном, до 3 лет, хранении образцов СКК происходит деградация HBsAg, на что указывает снижение частоты выявления этого маркера до 75%.

G. McAllister и соавт. [23] проводили исследования по оценке выявления HBsAg и анти-HBc в образцах СКК в зависимости от температуры (-70°С, -20°С, 4°С, 22-28°С и 37°С) и длительности хранения (200 дней). Было отмечено значительное снижение частоты обнаружения как HBsAg, так и анти-HBcore уже через 14 дней хранения при положительных температурах во всех условиях хра-

Таблица 1

Частота выявления HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD в парных образцах сыворотки крови и слюны, от пациентов с хроническим гепатитом В + D (срок хранения 2 года)

Маркер инфицирования	Тип образца	
	Сыворотка крови	Слюна
HBsAg (%), (Nпоз/Nобщ)	100% (92/92)	95,7% (88/92)
p*	>0,05	
r^2**	0,084	
КПсред	35,27±8,69	26,7±14,87
Анти-HBcore %, (Nпоз./Nобщ.)	100% (92/92)	**13,04% (12/92)**
P*	**<0,05**	
R²**	0,084	
КПсред	0,043±0,008	0,48±0,035
Анти-ВГD % (N поз./N общ.)	100% (92/92)	**0% (0/92)**
p*	**<0,05**	
r^2**	Не рассчитывали	
КПсред	Не рассчитывали	Не рассчитывали

Примечание. * - критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия при сравнении между образцами сыворотки крови и слюны одного года сбора ($p < 0,05$). ** - коэффициент корреляции сравниваемых величин.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99

Таблица 2

Частота выявления HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD в парных образцах сыворотки крови и сухой капле крови (СКК) от пациентов с хроническим гепатитом В + D (3 года и 1 год хранения)

Маркер инфицирования	Тип образца			
	Сыворотка крови (3 года хранения)	СКК (3 года хранения)	Сыворотка крови (1 год хранения)	СКК (1 год хранения)
HBsAg (%), (Nпоз/Nобщ)	100% (80/80)	**75% (60/80)**	100% (117/117)	94,9% (111/117)
*p**	**<0,05**		>0,05	
r^2**	0,02		0,02	
КПсред	25,33±2,69	5,95±6,87	18,93±7,03	10,44±7,62
Анти-HBcore %, (Nпоз./Nобщ.)	Не исследовали	Не исследовали	100% (117/117)	**19,7% (23/117)**
*p**	Не рассчитывали		**<0,05**	
r^2**			0,028	
КПсред			0,12±0,14	0,49±0,24
Анти-ВГD % (N поз./N общ.)	Не исследовали	Не исследовали	100% (117/117)	**0% (0/117)**
*p**	Не рассчитывали		**<0,05**	
r^2**			Не рассчитывали	
КПсред				

Примечание. * - критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия при сравнении между образцами сыворотки крови и СКК одного года сбора ($p < 0,05$). ** - коэффициент корреляции сравниваемых величин.

нения, за исключением образцов, хранящихся при положительных температурах. В то же время образцы, хранившиеся при -20°С или -70°С показали минимальные изменения в выявлении HBsAg и анти-HBcore вплоть до конечной точки времени (200 дней) хранения [23]. Chee Eng Lee и соавт. [24] показали хорошую корреляцию при определении HBsAg в сыворотке крови и свежих образцах СКК ($r^2 = 0,432$; $p < 0.001$). В нашем исследовании, несмотря на высокие показатели совпадения выявления HBsAg в парных образцах СКК и сыворотки крови, было показано отсутствие корреляционной зависимости между показателями коэффициента позитивности в парах образцов что, по всей вероятности, можно объяснить длительностью хранения этих образцов (1-3 года).

Чувствительность выявления анти-HBcore в образцах СКК также зависит от длительности хранения образцов. Так, по данным L.M. Villar и соавт. [20], уже к 63 дню наблюдения образцов, хранившихся при температуре 22-25°С, происходит значительный рост оптической плотности до значений, соответствующих отрицательным результатам. Нами впервые исследованы архивные образцы СКК, хранившиеся в течение года при комнатной температуре, на наличие анти-HBcore. Полученные результаты показали низкую стабильность данного маркера при длительном хранении образцов СКК, так как только в 19,7% образцов был получен положительный результат при частоте выявления 100% в парных образцах сыворотки крови.

Ранее было показано, что метод элюции образцов СКК не оказывает влияния на результаты выявления маркеров ГВ [21]. Таким образом, именно длительность хранения при комнатной температуре является причиной снижения клинической чувствительности выявления маркеров ГВ в образцах СКК.

Для диагностики вирусного ГВ обычно используют образцы сыворотки крови, что требует венопункции, специального персонала и строгого соблюдения условий биологической безопасности. Как альтернатива могут использоваться образцы слюны, к сбору которых нет таких строгих требований [13, 25-27]. Постановка образцов слюны для выявления HBsAg в тест-системах ИФА обычно проводится без изменений относительно стандартного протокола для образцов сыворотки крови, эксперименты по увеличению периода инкубации показали отсутствие преимущества данного подхода [25, 30]. В данной работе при исследовании образцов слюны методом ИФА на маркеры ГВ+D нами также применялись стандартные протоколы, рекомендованные производителем тест-систем для тестирования образцов сыворотки крови.

По данным литературы, клиническая чувствительность выявления HBsAg методом ИФА в слюне серопозитивных пациентов варьирует от 93,6% до 100%, а специфичность – от 92,6% до 100% [25, 28, 29]. Нами также показано выявление HBsAg в 95,7% образцов слюны по сравнению с образцами сыворотки крови этих пациентов при температуре хранения -70°С в течение года, что свидетельствует о возможности использования образцов слюны в качестве альтернативы образцам сыворотки крови при тестировании на данный маркер. В этих же образцах частота выявления анти-HBcore составила всего 13,04%, что значительно отличается от литературных данных – частота выявления этого маркера у серопозитивных лиц обычно составляет 96-100% [14]. Интересно, что у больных, коинфицированных ВГВ/ВИЧ, наблюдается низкая частота выявления анти-HBcore в образцах альтернативных типов [30]. Возможно, что отмеченная в нашем исследовании низкая частота выявления анти-HBcore в образцах слюны у больных хроническим гепатитом В с дельта агентом в также связана именно наличием двух вирусов в организме.

В отличие от маркеров ГВ, определение анти-ВГD в образцах СКК и слюны ранее не проводилось. Нами впервые описано отсутствие анти-ВГD в этих образцах, полученных от больных хроническим гепатитом В и дельта. В то же время, анти-ВГD в сыворотке крови присутствовали в 100% образцов, хранившихся 2-3 года при -70°С. Отсутствие положительных случаев выявления анти-ВГD при успешном выявлении анти-HBcore у части серопозитивных пациентов (13% в образцах слюны и 19,7% в образцах СКК), возможно, обусловлено тем, что белок core вируса гепатита В является более сильным иммуногеном, приводящим к выработке анти-HBcore в высокой концентрации. Известно, что после перенесенной инфекции эти антитела остаются пожизненно [31]. Вероятно, концентрация анти-ВГD значительно ниже, что объясняет отсутствие этих антител в слюне и СКК у больных ХГ В+D.

Заключение. Слюна и СКК могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg при скрининге и в научных сероэпидемиологических исследованиях. Определение анти-HBcore в образцах этих типов у пациентов с хронической инфекцией В+D, на наш взгляд, является нецелесообразным ввиду высокой вероятности

получения ложноотрицательных результатов. По той же причине серологическая диагностика ГD с использованием альтернативных типов образцов не представляется возможной в связи с получением ложноотрицательных результатов в образцах СКК и слюны по сравнению с сывороткой крови. Ввиду высокой вероятности суперинфицирования вирусом ГD больных с ХГВ на эндемичных территориях, в случае выявлении HBsAg в альтернативных клинических материалах (слюна, СКК) маркеры инфицирования ВГD следует определять в сыворотке крови.

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Финансирование. *Исследование выполнено в рамках Государственного задания по теме: Разработка современной системы диагностики, лечения и профилактики вирусных гепатитов B, C и D.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-12, 14, 18-30 см. REFERENCES)

13. Асратян А.А., Павлова И.П., Рейзис А. Р., и др. Маркёры вирусных гепатитов в образцах слюны больных острыми гепатитами A, B and C. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.* 1997; 6: 43–7.
15. Кожанова Т. В., Ильченко Л. Ю., Клушкина В. В. и др. Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов среди «условно» здорового населения Республики Тыва. *Медицинская вирусология*. 2013; XXVII (2): 74–88.
16. Исаева О.В., Ильченко Л.Ю., Кожанова Т.В. и др. Влияние вакцинации против гепатита В на распространенность гепатита дельта в эндемичном регионе. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8, 2 (29): 36-42.
17. Исаева О.В., Кюрегян К.К. Вирусный гепатит дельта: недооцененная угроза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8, 2 (29): 72-9.
31. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. *Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика)*. Москва: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2003.

REFERENCES

1. Alfaiate D., Deny P, Durantel D. Hepatitis delta virus: from biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antivir Res.* 2015; 122: 112–29.
2. Wedemeyer H., Manns M. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. Nat. Rev. *Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 7: 31–40.
3. Sureau C., Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol.* 2016; 64: 102-16.
4. Hirtz Christophe, Sylvain Lehmann. “Blood sampling using “dried blood spot”: a clinical biology revolution underway?.” *Annales de biologieclinique.* 2015; 73(1).
5. Snijdewind Ingrid JM. “Current and future applications of dried blood spots in viral disease management.” *Antiviralresearch.* 2012; 93 (3): 309-21.
6. McDade Thomas W., Sharon Williams, J. Josh Snodgrass. “What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research.” *Demography.* 2007; 44.4: 899-925.
7. Villa E. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research. *Journal of Clinical Pathology.* 1981; 34.7: 809.
8. Lira R., Maldonado-Rodrigues A., Rojas-Montes O. et al. Use of dried blood samples for monitoring hepatitis B virus infection. *Virol. J.* 2009; 6: 153.
9. Cruz H.M., E. F. da Silva, C. A. Ville la-Nogueira et al. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2011; 25 (2): 134–41.
10. Hutse V., Verhaegen E., De Cock L., et al. Oral fluid as a mediumfor the detection of Hepatitis B surface antigen. *J Med Virol.* 2005; 77: 56–63.
11. Thieme T., Yoshihara P., Piacentini S., BellerM. Clinical evaluationof oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1076–9.
12. Zhevachevsky N.G., Nomokonova N.Y., Beklemishev A.B., Belov G.F. Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: Diagnostic and epidemiological significance. *J. Med. Virol.* 2000; 61: 433–8.
13. Asratyan A.A., Pavlova I. P., Re˘ızis A. R. et al. Viral hepatitis markers in saliva specimens from patients with acute hepatitis A, B and C. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, I immunobiologii.* 1997; 6: 43–7. (in Russian)
14. Villar L., Bezerra C., Cruz H., Portilho M., Flores G. Applicability of oral fluid and dried blood spot for hepatitis B virus diagnosis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2019; 2019: 1.
15. Kozhanova T. V., Ilchenko L. Yu., Klyushkina V. V. et al. Serological markers of hepatitis virus infection among the “conditionally” healthy population of the Republic of Tyva. *Meditsinskaya virusologiya.* 2013; XXVII (2): 74-88. (in Russian)
16. Isaeva O. V., Ilchenko L. Yu., Kozhanova T. V. et al. Influence of vaccination against hepatitis B on the prevalence of hepatitis Delta in the endemic region. *Infektsionnye bolezny: novosty, mneniya, obucheniye.* 2019; 8, 2 (29): 36-42. (in Russian)
17. Isaeva O. V., Kyuregyan K. K. Viral hepatitis Delta: an underestimated threat. *Infektsionnye bolezny: novosty, mneniya, obuchenie.* 2019; 8, 2(29): 72-9. (in Russian)
18. Lukacs Z., Dietrich A., Ganschow R., Kohlschutter A., Kruithof R. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots–a feasibility study using a multi-analyte immunoassay. *Clin.Chem. Lab. Med.* 2005; 43: 141–5.
19. Forbi J.C., Obagu J.O., Gyar S.D., Pam C.R., Pennap G.R. et al. Application of dried blood spot in the sero-diagnosis of hepatitis B infection (HBV) in an HBV hyperendemic nation. *Ann. Afr. Med.* 2010; 9: 44–5.
20. Villar L.M., de Oliveira J.C., Cruz H.M., Yoshida C.F., Lampe E. et al. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J .Med Virol*. 2011; 83: 1522–9.
21. Villa E., Cartolari R., Bellentani S., Rivasi P., Casolo G., Manenti F. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool.for epidemiological research. *J. Clin. Pathol* .1981; 34: 809–12.
22. Mendy M., Kirk G.D., Van der Sande M., Jeng-Barry A., Lesi O.A., Hainaut P., Sam O., McConkey S., Whittle H. Hepatitis B surface antigenaemia and alpha-foetoprotein detection from dried blood spots: Applications to field-based studies and to clinical care in hepatitis B virus endemic areas. *J. Viral. Hepat*. 2005; 12: 642–7.
23. McAllister S., Shepherd K. ,Templeton C., Aitken, R. Gunson. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates. *Journal of Clinical Virology.* 2015; 71: 10–7.
24. Chee Eng Lee, Ponnampalavanar S., Omar S., Mahadeva S. et al. Evaluation of the Dried Blood Spot (DBS) Collection Method as a Tool for Detection of HIV Ag/Ab, HBsAg, anti-HBs and anti-HCV in a Malaysian Tertiary Referral Hospital. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 2011; 40: 448-53.
25. Noppornpanth S., Sathirapongsasuti N., Chongsrisawat V., and Poovorawan Y. Detection of HBsAg and HBV DNA in serum and saliva of HBV carriers. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 2000; 31 (2): 419–21.
26. Clemmons R. M., Stewart C., Davis G. et al. Development of a Prototype, Rapid Saliva Test for Hepatitis B Surface Antigen (HBSAg) Utilizing a «Dipstick». *Method, Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993; 694 (1): 272-3.
27. Richards A. L., Perrault J. G., Caringal L. T. et al. A noninvasive assessment of hepatitis B virus carrier status using saliva samples. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1996; 27 (1): 80–4.
28. Cruz H. M., da Silva E. F., Villela-Nogueira C. A. et al. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2011; 25 (2): 134–41.
29. Khadse S. V., Bajaj G., Vibhakar P., Nainani P., Ahuja R., Deep G. Evaluation of specifcity and sensitivity of oral fuid for diagnosis of hepatitis B. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016; 10, 1: BC12–BC14.
30. Geane Lopes Flores, Helena Medina Cruz, Denise Vigo Potsch et al. Evaluation of HBsAg and anti-HBC assays in saliva and dried blood spot samples according HIV status. *Journal of Virological Methods*. 2018; 2018; 90(12): 1863.
31. Shahgildyan I. V., Mikhailov M. I., Onishchenko G. G. Parenteral viral hepatitis (epidemiology, diagnosis, prevention). Moscow: GOU VUNMC MZ RF; 2003. (in Russian)

Поступила 15.12.19
Принята к печати 26.12.19